

Regulation der TNF-Rezeptor-Signaltrans- duktion durch das Zytokin TWEAK

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

vorgelegt von

Steffen Salzmann

aus

Bad Kissingen

Würzburg, 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Professor Dr. Harald Wajant

2. Gutachter: Professor Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

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

Würzburg, den

.....

Steffen Salzmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. Oktober 2006 bis 30. August 2010 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Wajant, der mich während meiner Promotion sehr gut wissenschaftlich betreut hat und durch anregende Diskussionen sowie Ideen für eine gute Zusammenarbeit gesorgt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Müller bedanken, der bereit war als Zweitgutachter aus der biologischen Fakultät diese Dissertation zu betreuen.

Bedanken möchte ich mich auch noch bei unseren Mitarbeiter der Abteilung Molekulare Innere Medizin Isabell Lang, Hilka Rauert, Agnes Wyzgol, Andrea Fick, Claudia Roos, Dr. Axel Seher, Dr. Andreas Wicovsky, Dr. Martin Ehrenschwender, Dr. Nicole Müller-Sienerth, Alevtina Rosenthal und Viktoria Schäfer für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit im Labor und ein angenehmes Betriebsklima, sowie für die netten Stunden außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und beiden Schwestern, Susanne und Sabine, die mich stets unterstützt und motiviert haben in schwierigen Zeiten.

Auch möchte ich meinen Schwiegereltern für die nette Zeit an manchen Wochenenden danken, in der ich mich entspannen und Energie sammeln konnte.

Zuletzt jedoch möchte ich den größten Dank meiner Frau Mela und meiner Tochter Hannah aussprechen, durch die ich täglich neue Energie schöpfen konnte. Vielen Dank für die endlose Geduld, Motivation und Unterstützung während der gesamten Promotion.

Ich liebe euch Beide über Alles

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	4
3.1	<i>Liganden und Rezeptoren der Tumor Nekrose Faktor- (TNF)-Familie</i>	4
3.1.1	Die TNF-Ligandenfamilie	4
3.1.2	Die TNF-Rezeptorfamilie	5
3.2	<i>Intrazelluläre Signalwege, die durch TNF-Rezeptoren aktiviert werden</i>	9
3.2.1	Das TNF/TNF-Rezeptor-System	9
3.2.1.1	<i>Allgemeines</i>	9
3.2.1.2	<i>Die TNF/TNFR1-vermittelte NFκB-Aktivierung</i>	10
3.2.1.3	<i>Die TNFR1-vermittelte Apoptose</i>	13
3.2.2	Das TWEAK/Fn14-System	18
3.2.2.1	<i>Allgemeines</i>	18
3.2.2.2	<i>Die TWEAK/Fn14 vermittelte Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges</i>	19
3.3	<i>NFκB-vermittelte Genexpression, welche die Apoptose beeinflusst</i>	20
3.3.1	Die Proteine der TRAF-Familie	21
3.3.2	Die Proteine der IAP-Familie	22
3.3.3	Die c-FLIP-Proteine	23
3.4	<i>Ziel der Arbeit</i>	24
4	Material	26
4.1	<i>Chemikalien, Reagenzien, Zellkultur</i>	26
4.1.1	Enzyme	27
4.1.2	Oligonukleotide	27
4.2	<i>Antikörper und Antiseren</i>	28
4.3	<i>Zellen</i>	29
4.3.1	Prokaryontische Zellen	29
4.3.2	Eukaryontische Zellen	30
4.4	<i>Plasmide</i>	30
4.5	<i>Verbrauchsmaterialien und Geräte</i>	30

4.6	<i>Kits</i>	31
4.7	<i>Lösungen und Puffer</i>	32
5	Methoden	35
5.1	<i>Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien</i>	35
5.1.1	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	35
5.1.2	Retrovirale Transfektion eukaryontischer Zelllinien	35
5.1.3	Konservierung von Zellen	36
5.2	<i>Zytotoxizitätsassay</i>	36
5.3	<i>Bestimmung der IL8-Produktion mittels ELISA</i>	37
5.4	<i>NFκB-Reporterassay</i>	37
5.5	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	38
5.5.1	Gesamtzelllysate	38
5.5.2	Triton X-100-Lysate	38
5.6	<i>Western Blot</i>	39
5.6.1	SDS-PAGE	39
5.6.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	39
5.6.3	Immunfärbung durch ECL	40
5.7	<i>Durchflusszytometrie</i>	40
6	Ergebnisse	41
6.1	<i>TWEAK moduliert die TNFR1-induzierte Signaltransduktion</i>	41
6.1.1	TWEAK verstärkt die TNFR1-induzierte Apoptose	41
6.1.2	TWEAK sensibilisiert Zellen für den TNFR1-induzierten caspaseunabhängigen Zelltod	45
6.1.3	TWEAK schwächt die TNFR1-, LT β R- und HVEM-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges ab	48
6.2	<i>Oligomerisierte und nicht-oligomerisierte TWEAK-Trimere unterscheiden sich in der Aktivierung der beiden NFκB-Signalwege</i>	50
6.2.1	Trimeres lösliches TWEAK aktiviert den alternativen NF κ B-Signalweg stark, den klassischen aber nicht oder nur schwach	50
6.2.2	Oligomerisiertes TWEAK aktiviert sowohl den alternativen als auch den klassischen NF κ B-Signalweg	51

6.3	<i>TRAF1-Expression verstärkt die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges.....</i>	54
6.3.1	<i>TRAF1-Expression moduliert die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges</i>	54
6.3.2	<i>Endogenes TRAF1 inhibiert die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges in EA.hy926-Zellen.....</i>	60
7	Diskussion	62
7.1	<i>TWEAK und Fn14 modulieren die TNFR1-Signaltransduktion</i>	62
7.2	<i>TWEAK verstärkt den nekrotischen Zelltod.....</i>	65
7.3	<i>TRAF1 verstärkt die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Siganlweges</i>	67
8	Literaturverzeichnis	69
9	Anhang	78
9.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	78
9.2	<i>Publikationen.....</i>	82
9.3	<i>Lebenslauf.....</i>	83

1 Zusammenfassung

Das pleiotrope Zytokin TNF (tumor necrosis factor) kann an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und den TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) binden und mit deren Hilfe seine biologischen Funktionen über verschiedene Signalwege, wie z.B. NF κ B- und MAPK-Aktivierung bzw. Apoptoseinduktion, vermitteln. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des TNFR2 zur proteasomalen Degradation des Adapterproteins TRAF2 führt und dadurch die TNFR1-induzierte Apoptose verstärkt wird. TWEAK (tumor necrosis like weak inducer of apoptosis), das ebenfalls der TNF-Ligandenfamilie angehört und die Interaktion mit dessen Rezeptor Fn14 (fibroblast growth factor-inducible 14), der wie der TNFR2 zur Untergruppe der TRAF-bindenden Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie gehört, zeigten in verschiedenen Arbeiten auch eine TRAF2-degradierende Wirkung. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass dies auch im Falle des TWEAK/Fn14-Systems mit einem verstärkenden Effekt auf die TNFR1-vermittelte Apoptose einhergeht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TWEAK zusätzlich auch die TNFR1-induzierte Nekrose verstärkt, die den Zelltod durch andere Mechanismen als bei der Apoptose induziert.

Von anderen Arbeiten unserer Gruppe war bekannt, dass lösliches TWEAK (sTWEAK) und membranständiges TWEAK (mTWEAK) bezüglich der TRAF2-Depletion wirkungsgleich sind. Da der apoptotische Fn14-TNFR1-„crosstalk“ auf der Depletion von TRAF2-Komplexen beruht wurden auch keine signifikanten Unterschiede zwischen sTWEAK und mTWEAK in Bezug auf die Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose beobachtet. Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit jedoch, dass sTWEAK den klassischen NF κ B-Signalweg gar nicht bzw. nur schwach aktiviert, wohingegen mTWEAK diesen stark induziert. Bei der Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges hingegen ließen sich keine Unterschiede zwischen sTWEAK und mTWEAK erkennen. Die Aktivierung eines Signalweges wird also durch die Oligomerisierung des Liganden nicht moduliert, demgegenüber aber erwies sich die Aktivierung eines anderen Signalweges als stark abhängig von der Liganden-Oligomerisierung. Vor dem Hintergrund, dass das Adapterprotein TRAF1 (TNF-receptor-associated factor 1) Heterotrimere mit TRAF2 bildet, wurde weiterhin untersucht, ob dieses Molekül einen Einfluss auf die Aktivität

der TWEAK-induzierten Signalwege hat. Tatsächlich zeigte sich in TRAF1-exprimierenden Zellen eine Verstärkung der TWEAK-induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges

Zukünftige Studien müssen nun aufklären, inwieweit die hier gefundenen Mechanismen das Zusammenspiel von TNF und TWEAK *in vivo* bestimmen.

2 Summary

The pleiotropic cytokine TNF (tumor necrosis factor) binds to two receptors, TNF-receptor 1 (TNFR1) and TNF-receptor 2 (TNFR2). TNF elicits its biological functions through different signaling pathways, e.g. NF κ B- and MAPK-activation and induction of apoptosis. Previous studies revealed that activation of TNFR2 leads to proteasomal degradation of the adaptor protein TRAF2 and enhanced TNFR1-induced apoptosis. TWEAK (tumor necrosis like weak inducer of apoptosis), a member of the TNF-ligand family and Fn14 which belongs like TNFR2 to the TRAF-binding subgroup of the TNF-receptor family, showed also a TRAF2-degrading effect. In the present thesis it is shown that this is also associated with an enhancement of TNFR1-mediated apoptosis. Furthermore, it was shown that TWEAK also amplifies TNFR1-induced necrosis, a form of cell death that is induced independently and by different mechanisms than apoptosis.

In earlier studies in our group it was found that soluble TWEAK (sTWEAK) and membrane bound TWEAK (mTWEAK) have the same TRAF2-depleting effect. Because the apoptotic crosstalk of Fn14 and TNFR1 bases on the depletion of TRAF2-containing complexes, there were no significant differences observed between sTWEAK and mTWEAK concerning the enhancement of TNFR1-induced apoptosis. Interestingly, it was shown in this thesis that sTWEAK can activate the classical NF κ B pathway not or just weak, whereas mTWEAK can do this very efficiently. However there were no differences between sTWEAK and mTWEAK in the activation of the alternative NF κ B pathway. Thus the activation of one type of signaling pathway is therefore not modulated through ligand oligomerisation, but in contrast the activation of another pathway turned out to be strongly dependent of ligand oligomerisation. It is known that the adaptor protein TRAF1 (TNF-receptor-associated factor 1) builds heterotrimers with TRAF2. It was furthermore investigated, whether this molecule has an influence on the activity of TWEAK-induced pathways. Actually there was increased activity in TWEAK-mediated classical NF κ B signaling observed in TRAF1-expressing cells. Further studies have to clarify to which extend the here found mechanisms affect the TNF-TWEAK interplay *in vivo*.

3 Einleitung

3.1 Liganden und Rezeptoren der Tumor Nekrose Faktor-(TNF)-Familie

3.1.1 Die TNF-Ligandenfamilie

Vor mehr als 100 Jahren berichtete der deutsche Physiker P. Bruns über den Rückgang von Tumoren im Menschen nach einer bakteriellen Infektion (Bruns, 1868). Dies veranlasste den amerikanischen Onkologen W. Coley bakterielle Extrakte zur Behandlung von Krebs beim Menschen einzusetzen. Dieses sogenannte „Coley’s toxin“ konnte in einigen Fällen das Tumorstadium rückläufig machen (Coley, 1891). 1944 wurden Lipopolysaccharide (LPS) aus bakteriellen Extrakten isoliert und es wurde gezeigt, dass LPS den Rückgang der Tumore induzierte. O’Malley zeigte dann 1962, dass die Regression der Tumore kein direkter Effekt von LPS war, sondern durch die Induktion eines Faktors im Serum vermittelt wurde, den er „tumor-necrotizing factor“ nannte. Letztendlich wurde dieser Faktor durch die Arbeitsgruppe von L. Old isoliert und in „tumor necrosis factor“ (TNF) umbenannt (Carswell et al., 1975). Nachdem 1984 die cDNA von TNF kloniert wurde und strukturelle und funktionelle Homologien zu Lymphotoxin- α (LT α) festgestellt wurden, war klar, dass diese beiden Liganden eine neue Zytokin-Familie definieren - die TNF-Ligandenfamilie. Heute umfasst die TNF-Familie insgesamt 19 Zytokine, u.a. APRIL, GITRL, LIGHT, TWEAK, TRAIL, 4-1BBL, OX40L, CD30L, FasL, CD40L, CD27L, LT $\alpha\beta_2$ (Bodmer et al., 2002). Einige Jahre später identifizierte man dann zwei membranständige Rezeptoren, den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2), die die Fähigkeit besaßen sowohl TNF als auch LT α zu binden. Unabhängig von seiner antitumoralen Wirkung wurde TNF als Mediator der Kachexie identifiziert (Beutler et al., 1985a; Beutler et al., 1985b). Als ein weiteres Hauptmerkmal von TNF ist seine immunmodulatorische Wirkung zur Abwehr bakterieller Keime zu erwähnen.

Die strukturellen Gemeinsamkeiten der Liganden der TNF-Familie sind Sequenzhomologien in einem 145 Aminosäuren großen Bereich der extrazellulären Domäne (TNF homology domain, (THD)). Die THD ist ein phylogenetisch konserviertes

Strukturmotiv, das aus zwei antiparallelen β -Faltblättern besteht, die sich zu einer „jelly roll“-förmigen Struktur zusammenlagern (Bazan, 1993). Dieses Strukturmotiv der TNF-Liganden ist verantwortlich für die Rezeptorbindung und die Trimerisierung der Liganden. Die Mitglieder der TNF-Familie, mit Ausnahme von $LT\alpha$, welches als sekretorisches Protein freigesetzt wird, werden als Typ II Transmembran-Proteine mit carboxy-terminaler extrazellulärer und amino-terminaler intrazellulärer Domäne produziert (Armitage, 1994). Aus diesen membranständigen Liganden können sich durch proteolytische Prozesse und/oder durch alternatives Spleißen lösliche Moleküle ableiten (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001). Alle Mitglieder der TNF-Ligandenfamilien bilden Trimere, entweder lösliche Homotrimere z.B. TNF, oder membrangebundene Homotrimere z.B. LIGHT. Es gibt jedoch eine Ausnahme: $LT\alpha\beta_2$, das sich aus dem membrangebundenen Mitglied der TNF-Ligandenfamilien $LT\beta$ und dem löslichen Ligandenfamilien Mitglied $LT\alpha$ zusammensetzt, bildet membranverankerte Heterotimere. Die THD ist im Molekül extrazellulär lokalisiert und ist deshalb auch in proteolytisch gespaltenen Liganden enthalten, was dazu führt, dass die löslichen Liganden in aller Regel in trimerer Form vorliegen. Die Rezeptor-Bindungsstelle der TNF-Liganden wird aus der Kontaktfläche zweier Protomere des trimeren Liganden gebildet, deshalb haben TNF-Liganden drei potentielle Rezeptor-Bindungsstellen. Die membrangebundene Form vieler TNF-Liganden scheint die Fähigkeit zur retrograden Signaltransduktion zu besitzen (Eissner et al., 2000). Das prototypische Zytokin der TNF-Ligandenfamilie, TNF, wird von einem Transkript generiert, welches in unterschiedlichen Zelltypen hauptsächlich in Makrophagen, Monozyten, T- und B-Zellen, Granulozyten und Mast-Zellen abgelesen wird (Echtenacher et al., 1996).

3.1.2 Die TNF-Rezeptorfamilie

Die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie entfalten ihre biologische Funktion durch Interaktion mit membranständigen Rezeptoren, die der so genannten TNF-Rezeptorfamilie (TNFR-Familie) angehören (Locksley et al., 2001). Bis heute sind 29 Mitglieder der TNFR-Familie bekannt. Diese TNF-Rezeptoren sind strukturell verwandte Typ I Transmembranproteine (intrazellulärer Carboxyterminus, extrazel-

lulärer Aminoterminus) und besitzen als charakteristisches Merkmal in ihrer extrazellulären Domäne eine bis sechs Kopien einer cysteinreichen Domäne (CRD) (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001). Ausnahmen sind Osteoprotegerin (OPG) und Decoy-Rezeptor 3 (DcR3), die ausschließlich als lösliche Rezeptoren vorkommen (Abb. 1). Die CRD umfasst ca. 40 AS mit sechs konservierten Cysteinen, die typischerweise drei Cysteinbrücken ausbilden (Naismith und Sprang, 1998; Zhang, 2004). Funktionell wichtig ist die Beteiligung der CRDs an der Ligandenbindung (Smith et al., 1994) und der Rezeptortrimerisierung auch in Abwesenheit von Liganden (Chan et al., 2000). Ebenso wie die TNF-Ligandenfamilie können auch die TNF-Rezeptoren durch proteolytische Prozessierung (z.B. TNFR1, TNFR2) oder durch alternatives Spleißen (z.B. Fas) in ihre lösliche Form übergehen. Die intrazellulären Domänen der Mitglieder der TNFR-Familie besitzen keine intrinsischen katalytischen Eigenschaften, die Aktivierung intrazellulärer Signalwege erfolgt daher durch zytoplasmatische Adaptermoleküle u.a. durch TNF Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAFs) und „death domain“ (DD) Adaptermoleküle wie z.B. „TNFR1 associated death domain“ (TRADD) (Ha et al., 2009). Die Mitglieder der TNFR-Familie können drei Subklassen zugeordnet werden: den TRAF-bindenden Rezeptoren (z.B. TNFR2 und Fn14), den Todesrezeptoren (z.B. TNFR1 und Fas), welche mit DD Adapterproteinen interagieren können und den Decoy Rezeptoren, die keine intrazelluläre Domäne haben, sekretiert werden und daher löslich vorliegen oder membranassoziiert sind. Acht Todesrezeptoren wurden bis heute entdeckt: TNFR1, TRAILR1, TRAILR2, DR3, EDAR, Fas, DR6 und p75-NGFR (Wajant et al., 2003).

Die Mechanismen der TNFR-Aktivierung sind bis heute nur wenig verstanden. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass ein trimere TNF-Ligand sequenziell drei monomere TNF-Rezeptoren rekrutiert und dann einen aktiven trimere Ligand-Rezeptorkomplex bildet. In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass zumindest einige TNF-Rezeptoren wie z.B. TNFR1, TNFR2, CD40 und Fas bereits in vorgeformten Komplexen in der Membran vorliegen. Diese vorherige Zusammenlagerung wird dabei durch die N-terminale „pre-ligand assembly domain“ (PLAD) dieser Rezeptoren vermittelt, die sich von der eigentlichen Ligandenbindungsstelle unterscheidet. Diese Befunde legen nahe, dass die Ligandenbindung zu einer strukturellen Präorganisation der vorgeformten TNF-Rezeptorkomplexe und daher zur Umbildung dieser Komplexe aus einem inaktiven in einen aktiven Zustand führt

(Chan et al., 2000). Hierbei gibt es Hinweise, dass die Präorganisation eines zusammengelagerten TNF-Rezeptorkomplexes durch seinen Liganden noch nicht ausreichend für die Bildung eines aktives Rezeptor-Signalkomplexes ist, sondern dass dieser darüber hinaus die sekundäre Oligomerisierung mehrerer Ligand-Rezeptorkomplexe benötigt. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass auch die Internalisierung und das Zytoskelett bei der Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch TNF-Rezeptoren eine Rolle spielen.

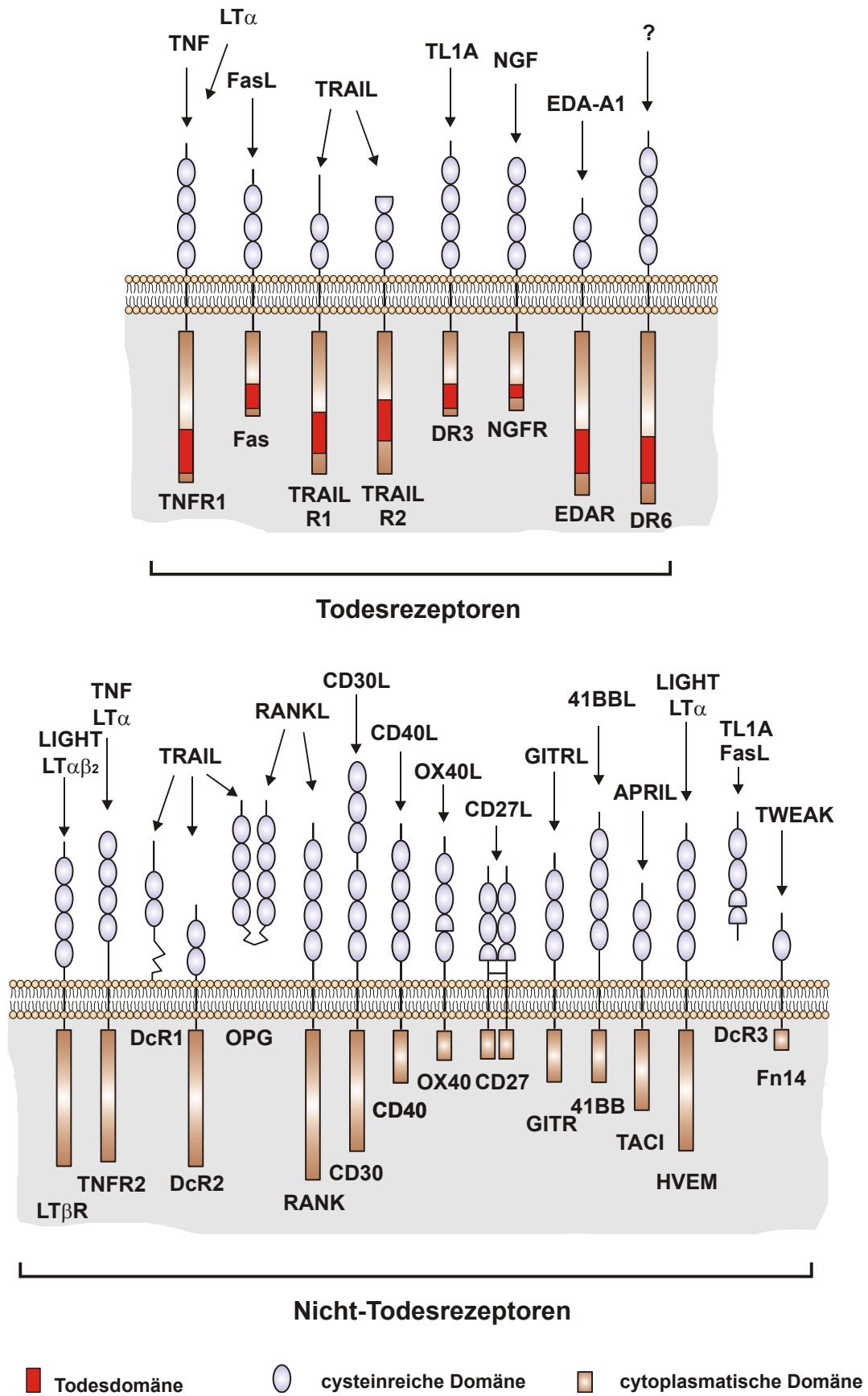


Abb. 1 Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie und ihre Liganden

3.2 Intrazelluläre Signalwege, die durch TNF-Rezeptoren aktiviert werden

In den vergangenen Jahren wurden eine ganze Reihe weiterer Vertreter der TNF-Liganden- und TNF-Rezeptorfamilie entdeckt, die ähnlich wie das TNF-TNFR1/2-System immunregulatorische Funktionen erfüllen. Einige dieser Moleküle sind auch an der Steuerung von Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen beteiligt. Viele dieser Ligand-Rezeptor-Systeme ziehen große Aufmerksamkeit auf sich, da sie potentielle Zielstrukturen für therapeutische Interventionen darstellen. Die von Liganden und Rezeptoren der TNF-Familie regulierten entzündlichen Prozesse wurden mit vielen Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht. So haben sich z.B. TNF-neutralisierende Medikamente (Etanercept, Infliximab) als hochwirksame und weit verbreitete Therapeutika zur Behandlung des Morbus Bechterew, der rheumatoiden Arthritis, und chronischer entzündlicher Darmerkrankungen wie z.B. Morbus Chron durchgesetzt (Schwarz et al., 2000; Taylor, 2001; Van Assche und Rutgeerts, 2000).

Die TNF-Ligandenfamilie umfasst pleiotrope proinflammatorische Zytokine, die unterschiedliche Effekte induzieren können wie z.B. Apoptose, Nekrose, Differenzierung, Angiogenese und Zell-Proliferation (Wajant et al., 2003). Dies beruht hauptsächlich auf Stimulierung von Signalwegen, die Caspasen, „nuclear factor kappaB“ (NF κ B), Akt, „cJun N-terminal kinase“ (JNK), „p38 mitogen-activated protein kinase“ (p38MAPK) und „extracellular signal-regulated kinases“ (ERKs) aktivieren. Die wichtigsten in dieser Arbeit untersuchten Signalwege, die zur NF κ B-Aktivierung (TNFR1 und Fn14) (Kapitel 3.2.1.2 und 3.2.2.2) oder Apoptoseinduktion (TNFR1) (Kapitel 3.2.1.3) führen, werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

3.2.1 Das TNF/TNF-Rezeptor-System

3.2.1.1 Allgemeines

Die membranständige Form von TNF (mTNF) ist in stabilen homotrimeren Molekülen organisiert und kann den Todesrezeptor TNFR1 und den TRAF-interagierenden Rezeptor TNFR2 voll aktivieren. Die lösliche Form von TNF (sTNF) besteht aus drei

157 Aminosäuren (AS) langen und 17 kDa großen TNF-Protomeren, welche gleichfalls stabile Homotrimere bilden. sTNF kann an beide TNF-Rezeptoren binden, jedoch nur den TNFR1 voll aktivieren (Grell et al., 1995). mTNF selbst wird durch proteolytische Spaltung durch die Metalloprotease „TNF alpha converting enzyme“ (TACE) in das homotrimere lösliche Zytokin (sTNF) umgesetzt (Black, 2002; Gearing et al., 1994). TNFR1 ebenso wie TNFR2 trägt vier cysteinreiche Bereiche in seiner extrazellulären Domäne und bildet verlängerte Strukturen, die mit den lateral liegenden Bindungsstellen des trimeren Liganden interagieren (Banner et al., 1993; Naismith und Sprang, 1998). TNFR1 wird auf nahezu allen Geweben exprimiert, wohingegen die Expression des TNFR2 hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems zu finden ist (Wajant et al., 2003). In der Mehrzahl der Zellen scheint der TNFR1 der Schlüssel der TNF-induzierten Signaltransduktion zu sein, jedoch spielt der TNFR2 im lymphoiden System eine übergeordnete Rolle.

3.2.1.2 Die TNF/TNFR1-vermittelte NF κ B-Aktivierung

Das TNF/TNFR-System kann nach der Aktivierung der TNF-Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) eine starke proinflammatorische Wirkung entfalten. Diese entzündlichen Effekte sind zu einem großen Teil der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zuzuschreiben (Luo et al., 2005). Die NF κ B-Familie umfasst eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren, die sich aus verschiedenen Mitgliedern der NF κ B/Rel-Familie zusammensetzt. NF κ B-Proteine sind an der transkriptionellen Aktivierung einer großen Anzahl von inflammatorisch wirksamen Genen nach Stimulation durch Zytokine (TNF, IL1), bakterielle Produkte und einigen Formen von physischem Stress (UV, „reactive oxygen species“ (ROS)) beteiligt (Baud und Karin, 2001). In den letzten Jahren wurde zudem erkannt, dass NF κ B-Dimere eine Vielzahl antiapoptotischer Faktoren regulieren. In Säugierzellen wurden fünf verwandte Mitglieder der NF κ B/Rel-Familie gefunden, nämlich: NF κ B1 (p50), das konstitutiv durch Proteolyse des Vorläufers p105 prozessiert wird, NF κ B2 (p52), welches aus seinem Vorläufer-Protein p100 prozessiert wird, c-Rel, RelA (p65) und RelB. Als strukturelle Gemeinsamkeit der NF κ B/Rel-Familie ist ihre konservierte „Rel homology domain“ (RHD) zu erwähnen. Diese vermittelt die Dimerisierung, DNA-Bindung und Kernlokalisierung der NF κ B-Transkriptionsfaktoren sowie deren Interaktion mit ihren

Inhibitoren der „inhibitor of kappaB“- ($\text{I}\kappa\text{B}$)-Familie (Verma et al., 1995). Die $\text{I}\kappa\text{B}$ -Familie ist durch sechs oder sieben sogenannte „ankyrin repeats“ charakterisiert und zu ihr gehören $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$, $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$, Bcl-3, p105 und p100 (Baldwin, 1996). Zwei Signalwege können zur Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Dimeren führen, der klassische und der alternative $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg (Abb. 2) Im Folgenden wird zunächst die Aktivierung des klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges anhand des TNF/TNFR1-Systems näher beschrieben.

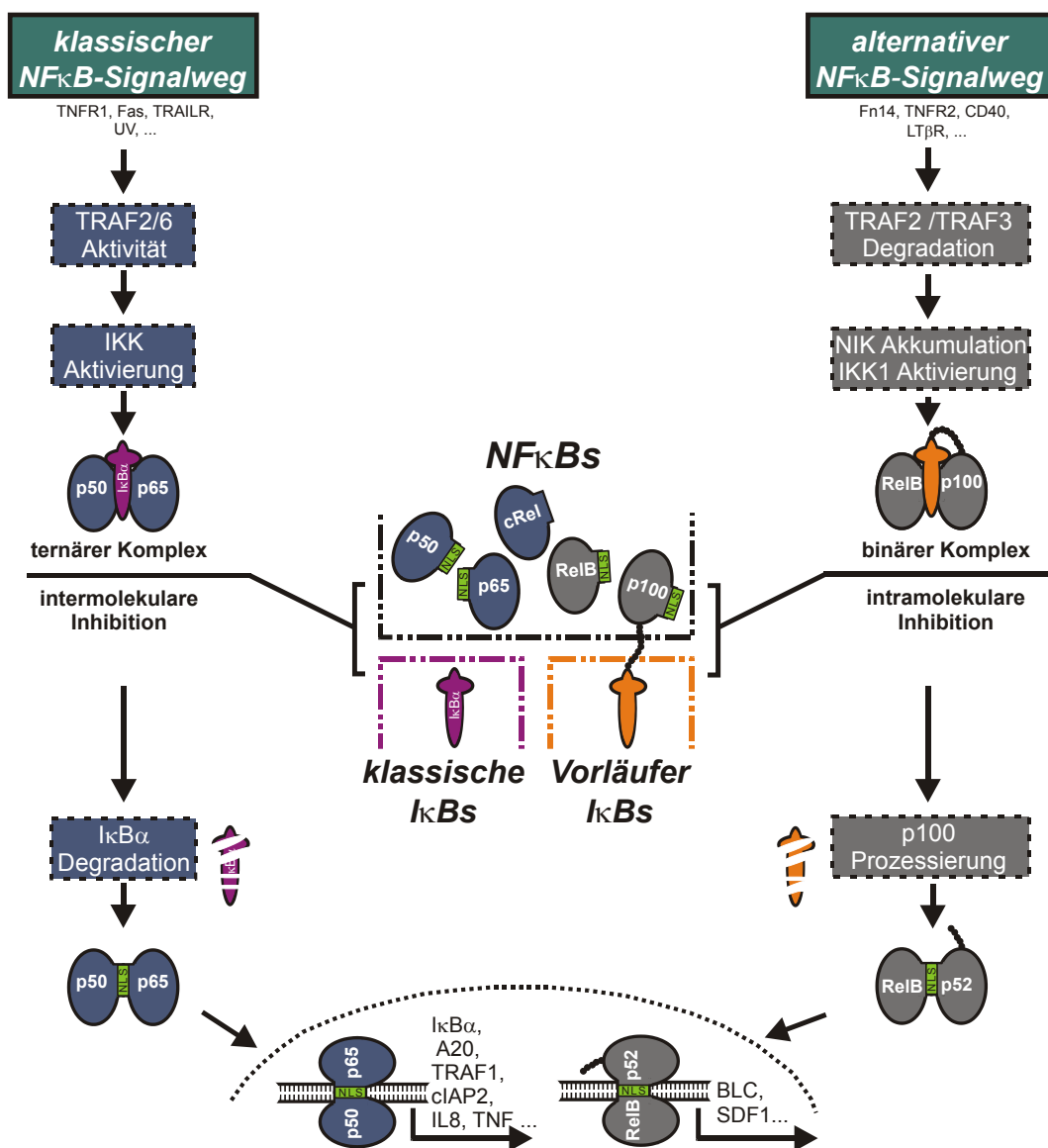


Abb. 2 Schematisch vereinfachte Darstellung der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwege

Dargestellt sind die unterschiedlichen Formen der Inhibition sowie die Signalkaskaden des klassischen und des alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges

In unstimulierten Zellen interagieren die I κ B-Proteine mit den dimeren NF κ B-Transkriptionsfaktoren, maskieren deren Kernlokalisationssequenz und halten somit die ternären Komplexe aus NF κ B-Dimeren und I κ B-Proteinen im Zytoplasma zurück. TNF sowie eine Vielzahl anderer Zytokine der TNF-Ligandenfamilie können die proteolytische Degradation der I κ B-Proteine durch die 26S-Untereinheit des Proteasoms induzieren. Die Stimulation vieler NF κ B-aktivierender Rezeptoren führt zunächst zur Aktivierung von Vertretern der „mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) Familie, z.B. „NF κ B-inducing kinase“ (NIK) und „mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 (MEKK1), MEKK2 und MEKK3 (Karin, 1999). Diese Proteine aktivieren einen multikomponenten Protein Kinase Komplex, den I κ B Kinase (IKK) Komplex, der I κ B-Proteine phosphorylieren kann. Der IKK Komplex besteht aus einem Kinase-Dimer, das sich aus zwei verwandten I κ B Kinasen (IKK1 und IKK2) zusammensetzt (Zandi et al., 1997), einer regulatorischen Untereinheit (NEMO) (Yamaoka et al., 1998) und einem „heat shock protein-90“ (Hsp90) Homodimer (Chen et al., 2002). Der aktivierte IKK Komplex phosphoryliert zwei konservierte Serin-Reste in der N-terminalen Domäne der I κ Bs, was dann zur Polyubiquitinierung der I κ B-Proteine und deren schnellen Degradation durch das Proteasom führt (Palombella et al., 1994; Verma et al., 1995). Dadurch wird die Kernlokalisationssequenz des NF κ B-Dimers zugänglich und es kann dann in den Zellkern translozieren und unterschiedliche Zielgene anschalten (Chen und Ghosh, 1999; Verma et al., 1995).

Der initiale Schritt der TNF-induzierten Aktivierung des IKK Komplexes ist die Liganden-abhängige Reorganisation des zusammengelagerten TNFR1 Komplexes. Die Liganden-unabhängige Aktivierung der TNFR1 Komplexe wird durch Maskierung der Rezeptor-DDs mit dem „inhibitor protein silencer of death domains“ (SODD) verhindert. Nach Ligandenbindung dissoziiert SODD vom präassemblierten TNFR1 Komplex und das Adapterprotein „TNF receptor-associated death domain“ (TRADD) wird an den TNFR1 Komplex rekrutiert. TNFR1-gebundenes TRADD dient dann als Plattform, um weitere Adapterproteine zu rekrutieren. TRADD enthält neben der DD weitere Protein-Protein Interaktionsmotive, welche die Anlagerung weiterer Proteine ermöglicht (Wilson et al., 2009). TRADD initiiert v.a. nicht-apoptotische Signale über die Rekrutierung von „receptor interacting protein 1“ (RIP1) (Festjens et al., 2007) und die E3-Ubiquitin Ligasen TRAF2 und „cellular inhibitor of apoptosis proteins“

(cIAP1/2) (Varfolomeev et al., 2008). Diese Proteine bewirken dann die Aktivierung von proinflammatorischen und antiapoptotischen Signalwegen wie NF κ B, JNK und p38. TNFR1 kann aber auch die Bildung eines TRADD/RIP Komplexes mit „fas associated death domain“ (FADD) bewirken, der wiederum die Initiatorcaspase-8 und -10 binden kann. Diese aktivieren dann das apoptotische Programm der Zelle, welches später (Kapitel 3.2.1.3) genauer beschrieben wird.

RIP1 ist eine Kinase, die für den TNF-vermittelten NF κ B-Signalweg notwendig ist und durch Lysin 63 (K63)-verknüpfte Polyubiquitinketten modifiziert wird (Hayden und Ghosh, 2008). Die Polyubiquitinketten von RIP1 dienen als Gerüst für die Rekrutierung weiterer Proteine. So bindet z.B. der TAK Komplex, der aus „transforming growth factor- β activated kinase-1“ (TAK1) und den Partnerproteinen „TAK1 binding protein-2“ (TAB2) und TAB3 besteht (Kanayama et al., 2004), bevorzugt an K63-verknüpfte Polyubiquitinketten. Durch die Anlagerung an RIP1 (Abb. 4) kommt der TAK1 Komplex in unmittelbare Nähe des IKK Komplexes und kann so durch dessen Aktivierung das NF κ B-aktivierende Signal weiterleiten (Ea et al., 2006; Wang et al., 2001).

3.2.1.3 Die TNFR1-vermittelte Apoptose

Die Rezeptoren der Todesrezeptorfamilie können, wie es der Name schon sagt, Zelltod induzieren. Beim Zelltod unterscheidet man zwischen Apoptose, Nekrose und Autophagie. Autophagie beschreibt eine Zellfunktion, bei der ähnlich einer Phagozytose Bestandteile einer Zelle abgebaut werden. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der der Zellinhalt durch ein Anschwellen und Platzen der Zelle in das umliegende Gewebe freigesetzt wird und dadurch Entzündungsreaktionen hervorruft, bleibt bei der Apoptose die Zellmembran erhalten. Es werden stattdessen apoptotische Vesikel gebildet, die dann von Makrophagen aufgenommen und verdaut werden können (Hengartner, 2000). Der in diesem Kapitel beschriebene Signalweg führt zur Apoptose und wird im Folgenden ausführlich dargelegt.

Unter Apoptose versteht man den kontrolliert ablaufenden programmierten Zelltod, der von der Zelle selbst durchgeführt wird. Dabei unterliegt die Apoptose strengen Kontrollmechanismen, die dazu führen, dass das Nachbargewebe nicht beschädigt wird. Die Induktion der Apoptose kann auf zwei Wegen passieren: dem extrinsischen

Weg, bei dem die Zelle durch äußere Signale und einer darauffolgenden intrazellulären Signalkaskade Apoptose induziert, bzw. dem intrinsischen Weg, der durch intrazelluläre Faktoren, wie z.B. DNA-Schäden und Freisetzung von Cytochrom c, Apoptose auslöst (Waterhouse et al., 2002) (Abb. 3). Hauptmerkmale der Apoptose sind das Schrumpfen der Zelle, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Kondensation der DNA, die in ca. 180 Basenpaar (bp) große Stücke gespalten wird. In der Apoptose sind „cysteiny-l-aspartate-specific proteases“ sogenannte Caspasen von zentraler Bedeutung, die sich in Initiator- (Caspase-8, -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -7) einteilen lassen (Wilson et al., 2009). Die Familie der Caspasen ist hochkonserviert, gehört zu den Cysteinproteasen und trägt in ihrem aktiven Zentrum entsprechend einen Cystein-Rest. Caspasen spalten ihr Substrat C-terminal an Aspartat-Resten. Am Anfang der Apoptose stehen die Initiatorcaspasen, die nach Bindung an Todesrezeptoren dimerisieren und sich dadurch in einem zweistufigen autokatalytischen Prozess selbst aus einer Procaspase-Form in eine enzymatisch, heterotetramere aktive Form überführen (Wilson et al., 2009). Die aktivierten Initiatorcaspasen können dann durch Proteolyse die Effektorcaspasen aktivieren, welche dann wiederum durch Spaltung wichtiger zellulärer Struktur- und Signalproteine die Fragmentierung der DNA und den apoptotischen Zelltod herbeiführen.

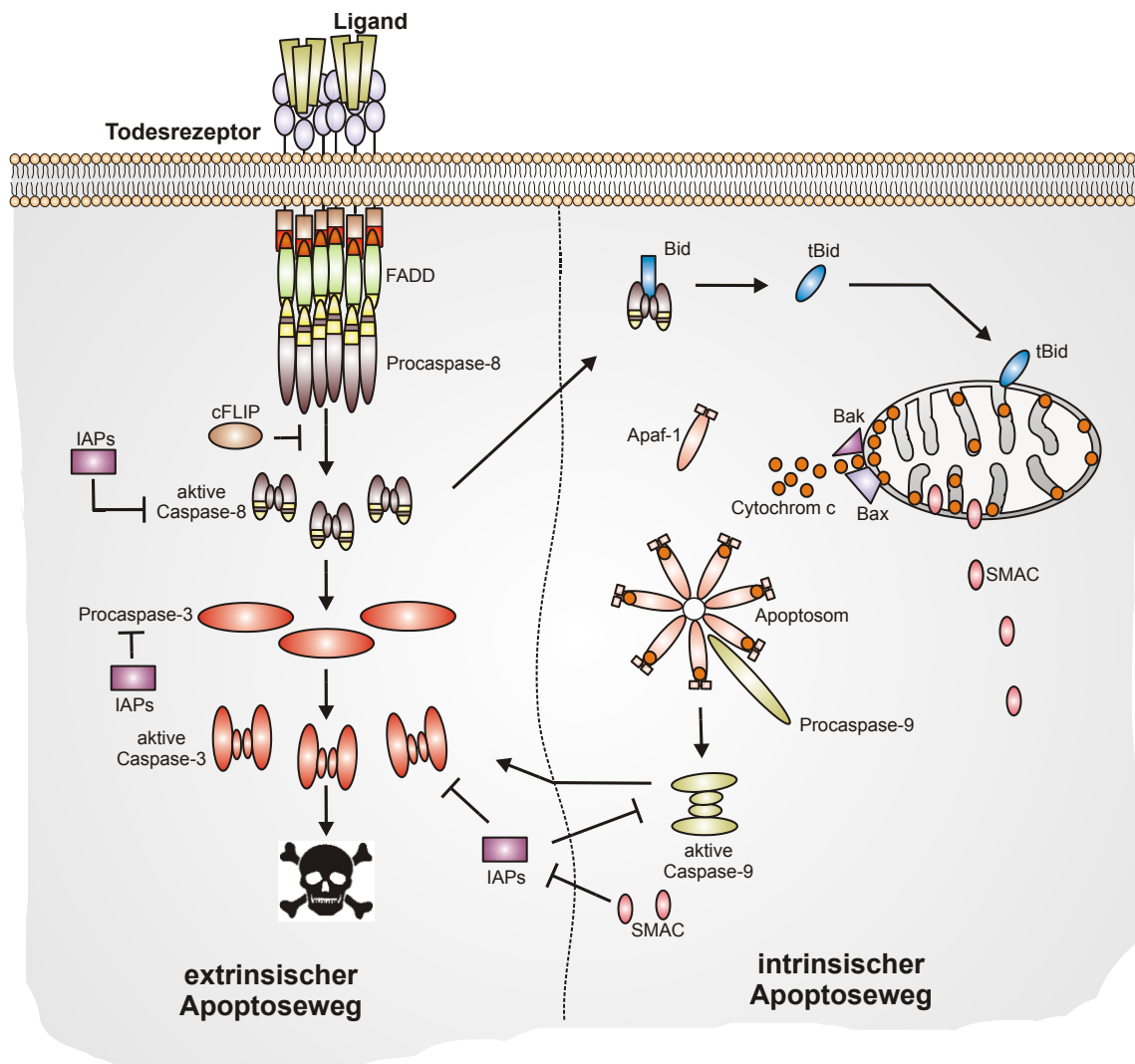


Abb. 3 Schematisch vereinfachte Darstellung des extrinsischen bzw. intrinsischen Apoptose-Signalweg

Extrinsische Apoptose: Nach Ligandenbindung oligomerisiert der Todesrezeptor und FADD und Procaspase-8 werden rekrutiert. Dabei kommt es zu einer autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8. Dieser Schritt kann durch cFLIP inhibiert werden. Aktivierte Caspase-8 kann zur Aktivierung der Procaspase-3 führen, die dann die Apoptose induziert.

Intrinsische Apoptose: Bid ist ein Substrat aktivierter Caspase-8, das in tBid gespalten wird. tBid bindet an die proapoptotischen Proteine Bax und Bak, die dafür sorgen, dass die mitochondriale Membran permeabel wird und Cytochrom c, und SMAC ins Zytoplasma entlässt. Cytochrom c bildet zusammen mit „apoptotic protease-activating factor 1“ (Apaf1) und Procaspase-9 das Apoptosom, das Procaspase-9 in eine aktive Form überführt. Aktive Caspase-9 kann ebenfalls Caspase-3 aktivieren und die extrinsische Apoptose wird verstärkt. IAP-Proteine können Caspase-8, -3, und -9 inhibieren. IAPs selbst werden durch SMAC wiederum inhibiert.

Das TNF/TNFR1-System kann wie im Kapitel zuvor beschrieben den klassischen NFκB-Signalweg aktivieren und dadurch proinflammatorische und proliferative Genprodukte induzieren. TNFR1 gehört jedoch zur Familie der Todesrezeptoren und kann deshalb auch Apoptose induzieren. Der apoptotische Signalweg spielt

allerdings typischerweise eine untergeordnete Rolle, da er von den nicht-apoptotischen Signalwegen (NF κ B-, MAPK-Aktivierung) überlagert wird (Ashkenazi, 2002). Dabei kann der TNFR1 das Adapterprotein TRADD und RIP1 an die Todesdomäne rekrutieren, welche dann nach Freisetzung aus dem TNFR1 Komplex in der Lage sind FADD, Caspase-8 und „cellular FLICE inhibitory protein“ (c-FLIP) zu binden (Abb. 4) (Barnhart und Peter, 2003; Micheau und Tschopp, 2003; Petersen et al., 2007). Von c-FLIP existieren zwei gut charakterisierte Spleißvarianten, die eine hohe Sequenzhomologie zur Initiatorcaspase (Caspase-8) zeigen und unterschiedliche Schritte der Caspaseaktivierung inhibieren (Kapitel 3.3.3) (Krueger et al., 2001). Der TRADD-RIP1-FADD-Caspase-8 Komplex führt nicht immer zur Aktivierung proapoptotischer Signalwege. So kann beim TNFR1-vermittelten Apoptose-Signalweg der antiapoptotische Effekt von c-FLIP in diesem Komplex so stark sein, dass das apoptotische Programm nicht aktiviert wird. Kommt es jedoch zur Aktivierung von Caspase-8, so kann die Caspasekaskade bis hin zur Apoptose weiterlaufen. Auf dem Weg zur Exekutionsphase des programmierten Zelltodes gibt es jedoch noch weitere Mechanismen, die den Zelltod verhindern können (Hengartner, 2000). Hier sind z.B. die Proteine der „inhibitor of apoptosis“ (IAP)-Familie zu nennen (Kapitel 3.3.2) (LaCasse et al., 2008).

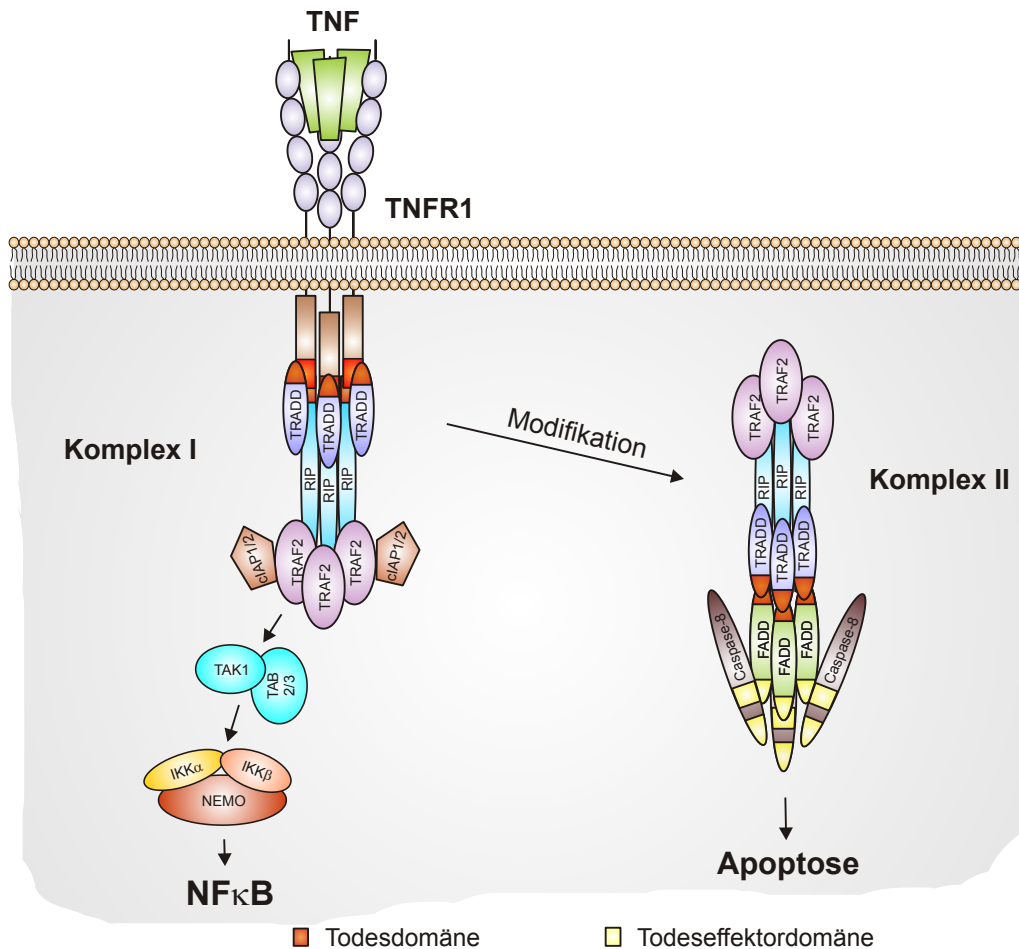


Abb. 4 **Sequentielles Modell der Rezeptoraktivierung am TNFR1**

Dargestellt sind Komplex 1, der das proinflammatorische und antiapoptotische Programm aktiviert und Komplex 2, welcher Apoptose induziert. TRADD rekrutiert RIP1, cIAP1, cIAP2 und TRAF2 und bildet den Komplex 1. RIP1 rekrutiert wiederum den TAK1 Komplex, der dadurch den IKK Komplex aktivieren kann. TRADD und RIP1 können auch freigesetzt werden und den Komplex 2 ausbilden, bei dem das Adapterprotein FADD und Caspase-8 zusätzlich rekrutiert werden. Die Proteinbindungen zwischen TRADD und FADD werden durch die DD vermittelt, die zwischen FADD und Caspase-8 durch die „death effector domain“ (DED).

Die aktivierte Caspase-8 führt zur Spaltung und Aktivierung der Caspase-3, die dann das apoptotische Programm einleitet. In manchen Fällen jedoch reicht diese Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Caspase-3 nicht aus, um Apoptose zu induzieren, deshalb kann durch den intrinsischen Apoptose-Signalweg die Aktivierung von Caspase-3 verstärkt werden. Dabei wird das Caspase-8 Substrat “Bcl-2 homology domain 3-interacting domain death agonist” (Bid) in “truncated Bid” (tBid) gespalten. Das C-terminal gespaltene Fragment von Bid (tBid) transloziert dann zum Mitochondrium, bindet an die Membran und verursacht eine Aggregation von Bax und Bak, die zur Bcl-2-Familie gehören (Hengartner, 2000). Dadurch wird die äußere Mitochondrienmembran destabilisiert und es kommt zur Freisetzung von

proapoptotischen Faktoren wie z.B. „second mitochondria-derived activator of apoptosis“ (Smac) und Cytochrom c, welches zusammen mit Caspase-9 und „apoptosis inducing factor-1“ (Apaf-1) ATP-abhängig das sog. Apoptosom bildet (Waterhouse et al., 2002). Die aktivierte Caspase-9 kann dann die Caspase-3 zusätzlich aktivieren. Durch diesen Mechanismus wird eine Brücke vom extrinsischen zum intrinsischen Weg der Apoptose geschlagen (Abb. 3) (Yin, 2006).

3.2.2 Das TWEAK/Fn14-System

3.2.2.1 Allgemeines

„Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis“ (TWEAK) und sein Rezeptor „fibroblast growth factor-inducible 14“ (Fn14) sind Mitglieder der TNF-Liganden- bzw. TNF-Rezeptorfamilie. Die Interaktion von TWEAK und Fn14 führt zu vielen unterschiedlichen biologischen Antworten wie z.B. Proliferation, Migration, Apoptose, Gewebereparatur, Angiogenese und Induktion proinflammatorischer Zytokine (Burkly et al., 2007; Winkles, 2008). TWEAK kann als membranständiges, homotrimeres Typ II Transmembranprotein exprimiert werden oder liegt, nach Proteolyse durch eine Furin-Protease, als löslicher Ligand vor (Chicheportiche et al., 1997). TWEAK hat eine C-terminal liegende extrazelluläre 206 Aminosäuren (AS) umfassende Region mit einer Stalk-Region und einer THD, eine 25 AS lange Transmembrandomäne und eine N-terminale intrazelluläre Domäne von 18 AS (Chicheportiche et al., 1997). TWEAK wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert u.a. in Astrozyten, Makrophagen, Monozyten und verschiedenen humanen Tumorzelllinien (Marsters et al., 1998).

Der Rezeptor Fn14 ist mit 129 AS das kleinste Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie (27 AS Leader, matures Protein 102 AS) (Wiley et al., 2001). Die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle ist 53 AS lang und umfasst nur eine CRD. Die zytoplasmatische Domäne von Fn14 ist 28 AS lang und trägt nur ein TRAF-bindendes Motiv, das TRAF1, TRAF2, TRAF3, und TRAF5 binden kann (Brown et al., 2003; Han et al., 2003). Fn14 wird ubiquitär in nahezu allen Geweben exprimiert mit Ausnahme primärer B- und T-Lymphozyten (Nakayama et al., 2002). Für das TWEAK/Fn14-System ist die Nutzung verschiedener Signalwege, wie des klassischen und

alternativen NF κ B-Signalweges, der Apoptose, des ERK- und JNK-Signalweges in der Literatur beschrieben (Donohue et al., 2003; Nakayama et al., 2002). Jedoch scheint die Aktivierung der NF κ B-Signalwege die generelle zelluläre Antwort zu sein, wobei die anderen Signalwege eher gewebespezifisch bzw. zelltypabhängig aktiviert werden. Im Folgenden wird der alternative NF κ B-Signalweg und dessen Aktivierung am Beispiel des TWEAK/Fn14-Systems näher erläutert.

3.2.2.2 Die TWEAK/Fn14 vermittelte Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges

Wie schon im Kapitel 3.2.1.2 erwähnt wurde, können zwei Signalwege zur Aktivierung von NF κ B-Transkriptionsfaktoren führen. In diesem Kapitel soll die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges am Beispiel des TWEAK/Fn14-Systems näher erläutert werden. Der alternative NF κ B-Signalweg kann durch Rezeptoren wie z.B. Fn14, CD40, „lymphotoxin beta receptor“ (LT β R) und TNFR2 aktiviert werden und generiert dimere NF κ B-Transkriptionsfaktoren, die eine Genexpression induzieren, welche die Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe und das Überleben von B- und T-Lymphozyten kontrollieren (Brown et al., 2008).

Bei den durch den klassischen NF κ B-Signalweg regulierten NF κ B-Dimeren handelt es sich um solche, die mit Inhibitorproteinen intermolekular unter Bildung eines ternären Komplexes interagieren. Es gibt jedoch auch NF κ B-Dimere, die durch intramolekulare Interaktion mit einer I κ B-analogen Domäne blockiert werden. Dies ist möglich, da insbesondere die NF κ B-Untereinheit p52 initial in Form eines 100 kDa Vorläuferproteins exprimiert wird. Das p100 Vorläuferprotein enthält wie alle Mitglieder der NF κ B-Familie in seinem N-terminalen Bereich eine hoch konservierte „Rel homology domain“ (RHD), die für Dimerisierung, den Kerntransport und die Bindung an die DNA verantwortlich ist (Verma et al., 1995). Ebenso trägt p100 aber in seinem C-terminalen Bereich „ankyrin repeats“, wie sie typischerweise in allen Mitgliedern der I κ B-Familie zu finden sind (Baldwin, 1996). Die Faltung dieser I κ B-ähnlichen Domäne erlaubt p100, analog zur intermolekularen Inhibition von NF κ B-Dimeren durch I κ B-Proteine, die Maskierung der „nuclear localisation sequence“ (NLS) innerhalb eines p100-RelB bzw. p100/p50 Heteromers. Die Aktivierung solcher

autoinhibierten p100-enhaltenden NF κ B-Dimere erfolgt nun dadurch, dass die „ankyrin repeats“ durch limitierte Proteolyse durch das Proteasom abgebaut werden (Betts und Nabel, 1996; Heusch et al., 1999). Dadurch wird p100 zu p52 prozessiert und das resultierende NF κ B-Transkriptionsfaktor-Dimer p52/RelB kann in den Kern translozieren. Die limitierte Proteolyse der p100-Untereinheit in einem p100-RelB-Dimer wird allerdings durch einen anderen Signalweg reguliert als die Degradation der klassischen I κ B-Proteine (Dejardin, 2006). Dieser sogenannte alternative NF κ B-Signalweg läuft folgendermaßen ab: In unstimulierten Zellen wird die MAPKKK „NF κ B-inducing kinase“ (NIK) konstitutiv durch einen Komplex aus TRAF2, TRAF3, cIAP1 und cIAP2 ubiquitinyliert und so durch proteasomale Degradation abgebaut. Es wird also durch einen permanent stattfindenden Prozess NIK degradiert (Qing und Xiao, 2005; Xiao et al., 2001). NIK kann nun IKK1 phosphorylieren, welches wiederum p100 durch Phosphorylierung für die limitierte Proteolyse durch das Proteasom markiert. Entsprechend führt die Inhibition der NIK-Degradation zur Aktivierung der limitierten Proteolyse von p100. Die Inhibition der NIK-Degradation kann ligandeninduziert erfolgen, nämlich dadurch, dass zum Beispiel TWEAK durch Bindung an Fn14 zu einer Rekrutierung des TRAF2/cIAP-Komplexes führt (Vince et al., 2008). Dadurch sind diese Moleküle aus dem Zytoplasma depletiert und stehen für die Degradation von NIK nicht weiter zur Verfügung. Neusynthetisierte NIK-Moleküle werden daher nicht degradiert, können akkumulieren, dann IKK1 phosphorylieren, und die p100-Proteolyse aktivieren. Es kommt zur Aktivierung p52-enhaltender NF κ B-Dimere. Dieser aus TRAF2-Degradation, NIK-Akkumulation, IKK1-Aktivierung und limitierter Proteolyse von p100 sich konstituierende Signalweg wird als alternativer NF κ B-Signalweg bezeichnet.

3.3 NF κ B-vermittelte Genexpression, welche die Apoptose beeinflusst

Die antiapoptotische Aktivität des klassischen NF κ B-Signalweges hängt von seiner Geninduktion ab. So kann der klassische NF κ B-Signalweg die Expression unterschiedlicher Gene induzieren, deren Produkte wie z.B. cIAPs, cFLIP, TRAF1 und TRAF2 die Apoptose inhibieren. TRAF1 und TRAF2 sind Adapterproteine, die für

eine optimale NF κ B und JNK Aktivierung nötig sind. Ihre antiapoptotische Wirkung erreichen sie dabei zu einen durch die Fähigkeit die Aktivierung des NF κ B-Signalweges zu verstärken und zum anderen durch die Rekrutierung von IAP-Proteinen an TNFR1 (Baud und Karin, 2001). Die anderen genannten antiapoptotischen Proteine können die apoptotische Signalkaskade in unterschiedlichen Abschnitten inhibieren. Im Folgenden werden die einzelnen Proteine bzw. die zugehörigen Proteinfamilien näher erläutert.

3.3.1 Die Proteine der TRAF-Familie

Die TRAF-Proteine umfassen eine Familie von genetisch konservierten Adapterproteinen, von denen in Säugetieren bisher sechs (TRAF1-6) identifiziert werden konnten (Arch et al., 1998) (Abb. 5). Es wurden aber auch TRAF-Proteine in anderen mehrzelligen Organismen wie *Drosophila* (Arch et al., 1998; Liu et al., 1999; Zapata et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (Wajant et al., 1998), *Dictyostelium discoideum* (Regnier et al., 1995) und *Hydractinia echinata* (Mali und Frank, 2004) beschrieben. TRAF-Proteine spielen in Signalwegen, die NF κ B und MAPK aktivieren, eine wichtige Rolle. Die Familie der TRAF-Proteine charakterisiert sich durch ihre C-terminal liegende konservierte TRAF-Domäne von 200 AS, welche sich in eine variable N-terminale- (TRAF-N) und eine hochkonservierte C-terminale (TRAF-C) Subdomäne unterteilt (Rothe et al., 1994). Die TRAF-Domäne vermittelt die Bindung an Rezeptoren, die Homo- und Heterotrimerisierung von TRAF-Proteinen und dient auch als Protein-Protein-Interaktionsdomäne für andere intrazelluläre Proteine. Mit Ausnahme von TRAF1 besitzt der N-terminale Teil der TRAF-Proteine ein RING-Finger-Motiv (Freemont, 2000; Saurin et al., 1996), das von fünf bis sieben Zink-Finger-Motiven gefolgt wird (Chung et al., 2002). Dabei vermittelt dieser N-terminale Teil die Aktivierung NF κ B- und JNK-stimulierender Kinasen (Rothe et al., 1995; Dadgostar und Cheng, 1998). TRAF1 fehlt das RING-Finger-Motiv und besitzt auch nur ein Zink-Finger-Motiv. Deletionsmutanten der RING- bzw. und/oder des Zink-Finger-Motives führen zu dominant-negativen Mutanten.

Durch die TRAF-vermittelte Induktion von Überlebenssignalen und Proliferation wird eine weite Bandbreite von biologischen Funktionen wie z.B. adaptive und

angeborene Immunität, Embryonalentwicklung und Knochenmetabolismus erreicht. TRAFs können entweder direkt oder indirekt über Adapterproteine mit Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie interagieren. Durch das Adapterprotein TRADD z.B. werden TRAF1 und TRAF2 an TNFR1 rekrutiert (Hsu et al., 1996). TRAFs können als Gerüstproteine zur Bildung zytosolischer und rezeptorassoziierter Signalkomplexe dienen. Neben dieser Funktion können sie auch durch ihre „really interesting new gene“ (RING)-Domäne als E3 Ubiquitin-Ligase enzymatisch wirksam werden (Deng et al., 2000; Shi und Kehrl, 2003).

3.3.2 Die Proteine der IAP-Familie

Die Familie der IAP-Proteine umfasst im Menschen sieben Mitglieder: XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, BRUCE, Survivin und Livin. IAP-Proteine unterdrücken, wie es ihr Name schon sagt, effizient den Apoptose-Signalweg z.B. nach Todesrezeptor-Aktivierung, Fehlen von Wachstumsfaktoren, ionisierende Strahlung, virale Infektion und DNA-Schädigung (Cheung et al., 2006; Hunter et al., 2007; LaCasse et al., 1998). Die IAP-Proteine sind die einzigen bekannten endogenen Proteine, die die Aktivität von sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen regulieren (LaCasse et al., 1998).

Charakteristisch für die Proteine der IAP-Familie ist eine N-terminal gelegene „baculovirus internal repeat“ (BIR)-Domäne. IAPs besitzen eine bis drei BIR-Domänen von 70-80 AS Länge, die ein Zink-Finger-Motiv enthalten, das sich wiederum aus vier bis fünf α -Helices und verschiedenen β -Faltblättern zusammensetzt (Hinds et al., 1999; Sun et al., 1999). Neben der BIR-Domäne tragen die Proteine der IAP-Familie noch weitere Domänen: z.B. XIAP, cIAP1 und cIAP2 besitzen ein C-terminal liegendes RING-Finger-Motiv, das E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität zeigt (Cheung et al., 2008; Silke et al., 2005). Eine weitere Domäne, die cIAP1 und cIAP2 gemeinsam haben, ist die „caspase-recruitment domain“ (CARD), die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Martin, 2001) (Abb. 5). XIAP ist das am besten charakterisierte Mitglied der Familie und gilt als stärkster Caspaseinhibitor der IAP-Familie (Holcik und Korneluk, 2001). XIAP kann direkt an die Caspasen-3, -7 und -9 binden. Dabei wird die Interaktion mit der Initiatorcaspase-9 über die BIR3-Domäne vermittelt, während die Anlagerung an die Effektorcaspasen-3 und -7 über

Regionen zwischen BIR1 und BIR2 stattfindet (Salvesen und Duckett, 2002). Durch die IAP-Bindung wird das reaktive Zentrum der Caspasen blockiert. Dieser inhibitorische Effekt von XIAP kann durch Smac, das aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, aufgehoben werden (Chai et al., 2000).

3.3.3 Die c-FLIP-Proteine

Ein weiteres Protein, das die Fähigkeit besitzt Caspasen zu inhibieren und dadurch die Apoptose-Kaskade zu unterbrechen, ist das „cellular FLICE-inhibitory protein“ (c-FLIP). Bis heute wurden elf Spleißvarianten von c-FLIP identifiziert, von denen drei auf Proteinebene nachgewiesen und charakterisiert werden konnten: das 55 kDa c-FLIP-Long (c-FLIP_L), das 26 kDa c-FLIP-Short (c-FLIP_S) und das 24 kDa c-FLIP-Raji (c-FLIP_R) (Golks et al., 2005; Scaffidi et al., 1999). Alle FLIPs besitzen als Strukturhomologie zwei N-terminal liegende DEDs (Abb. 5). Die kürzeren Formen tragen C-terminal unterschiedlich lange Regionen, die mit der Ubiquitinierung und Degradation von c-FLIP-Proteinen in Verbindung gebracht werden. c-FLIP_L weist C-terminal eine Caspase-ähnliche Domäne auf, die aber katalytisch inaktiv ist (Bagnoli et al., 2010). Diese drei FLIP-Isoformen sind anti-apoptotische Proteine, die durch ihre DED an die Adaptorproteine FADD und TRADD binden können (Thome et al., 1997) und so an die Todesrezeptoren TNFR1, Fas, TRAILR rekrutiert werden. Dort konkurrieren sie mit Caspase-8 und -10 um die Bindung an den Rezeptorsignalkomplex. Dabei verhindern sie die autoproteolytische Spaltung der Procaspase in die aktivierte Caspase-Form und inhibieren somit die Transduktion des Apoptosesignals. Die Art und Weise der Caspase-8 Inhibition und die physiologische Funktion variieren zwischen den einzelnen Isoformen. Die kurze Isoform c-FLIP_S verhindert gänzlich die Prozessierung von Caspase-8, c-FLIP_L jedoch lässt noch den ersten Schritt der Prozessierung, die Spaltung zwischen der p20- und p10-Untereinheit zu. Dabei bildet c-FLIP_L mit der teilweise prozessierten Caspase-8 heteromere Komplexe, die sich nicht vom Todesrezeptor ablösen und daher keine Apoptose induzieren, aber auch rezeptorassoziierte Proteine spalten können (Wajant, 2003).

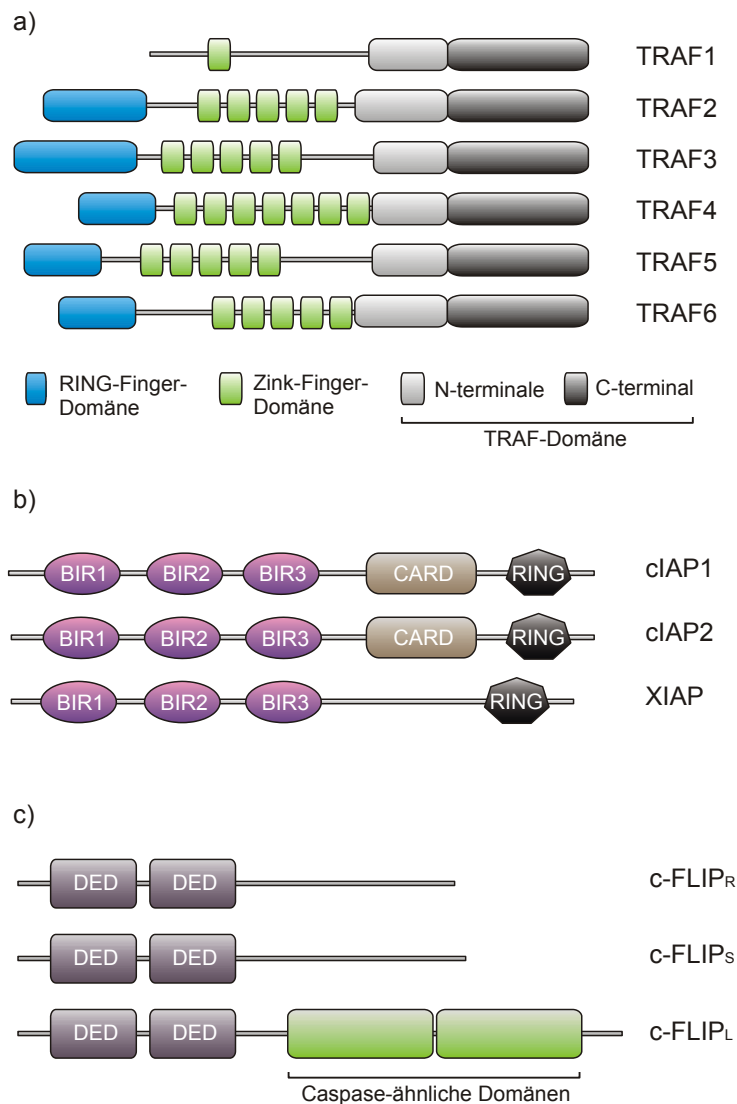


Abb. 5 Struktur der antiapoptotischen Proteine a) TRAFs, b) IAPs, c) cFLIPs

3.4 Ziel der Arbeit

Das pleiotrope Zytokin TNF kann sehr unterschiedliche zelluläre Effekte und biologische Funktionen durch die Interaktion mit seinen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 induzieren. Dabei aktivieren diese Rezeptoren Signalwege, die zur Stimulation von NFκB und JNK und Induktion von Apoptose führen. In früheren Studien zeigte sich, dass TNFR1 und TNFR2 miteinander kommunizieren und dabei insbesondere TNFR2 durch seine TRAF2-Degradation TNFR1-vermittelte Signalwege (NFκB und Apoptose) moduliert. Da nun in den letzten Jahren das Zytokin TWEAK durch seine TRAF2-depletierende Wirkung als starker Aktivator des

alternativen NF κ B-Signalweges identifiziert wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ein analoger „crosstalk“ zwischen TNFR1 und Fn14 besteht. Es ist weiterhin bekannt, dass TRAF1 mit TRAF2 interagieren kann und die TNFR2-vermittelte Aktivierung von NF κ B verstärkt. Deshalb sollte die Frage untersucht werden, ob die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges gleichfalls von TRAF1 verstärkt wird.

4 Material

4.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkultur

Acrylamid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin (100x)	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-Flag mAK M2-Agarose	Sigma, Deisenhofen
APS	Sigma, Deisenhofen
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
DMEM	PAA, Pasching, Österreich
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
DTT	Applichem, Darmstadt
ECL-Kit	Amersham, Braunschweig
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Flag-Peptid	Sigma, Deisenhofen
G418	Carl Roth, Karlsruhe
Gaussia Luciferase Assay Kit	New England Biolabs, Frankfurt
Gelfiltrationsmarker SEC 1	Phenomenex, Aschaffenburg
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MG132	Calbiochem, Schwabach
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
MTT	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
PHA	Sigma, Deisenhofen

Phosphataseinhibitor I und II	Sigma, Deisenhofen
Polybren	Sigma, Deisenhofen
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching, Österreich
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
TPCA-1	Biozol, Eching
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	PAA, Pasching, Österreich
TWEEN-20	Carl Roth, Karlsruhe
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe
z-VAD-fmk	Bachem, Heidelberg

4.1.1 Enzyme

Für Klonierungen vorgesehene Restriktionsenzyme wurden von Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen.

Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
T4-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

4.1.2 Oligonukleotide

Die für die Klonierungen der rekombinanten Liganden- und TRAF1-Vektoren notwendigen PCR-Primer wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

4.2 Antikörper und Antiseren

Anti-Caspase-3, Maus monoklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Caspase-8, Kaninchen polyklonal	Schulze-Osthoff, Universität Düsseldorf
Anti-Caspase-9, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-CD14-Beads	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Anti-CD3-Beads	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Anti-c-Jun, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Flag M2, Maus IgG1 monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-HVEM, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-I κ B α , Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-IKK1, Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IL8 (OptEIA ELISA)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IL8, biotinyliert	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-JNK, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Kaninchen HRP, Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen HRP, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-LT β R, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus HRP, Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark

Anti-Maus IgG (whole molecule)-PE	Sigma, Deisenhofen
Anti-p100/52, Maus monoklonal	Upstate/Millipore, Schwalbach
Anti-phospho-c-Jun, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-phospho-I κ B α , Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-phospho-JNK, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-RIP, Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Smac, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TNFR1, Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TNFR2, Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAF1, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAF2, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAF3, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Tubulin, Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Ansbach
Streptavidin-HRP	BD Biosciences, Heidelberg

4.3 Zellen

4.3.1 Prokaryontische Zellen

One Shot^R Top10

Invitrogen, Karlsruhe

chemically competent *E. coli*

Genotyp:

F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)
7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

4.3.2 Eukaryontische Zellen

Alle verwendeten humanen Zelllinien waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden oder wurden von der American Culture Collection (ATCC) erworben.

HEK293	Institutseigener Stock	embryonale Nierenzelllinie
HEK293-T	Institutseigener Stock	embryonale Nierenzelllinie
HT1080	Institutseigener Stock	Fibroblastenzelllinie (Fibrosarkoma)
EA.hy926	ATCC	Endothelzelllinie aus Nabel- schnur
HT29	Institutseigener Stock	kolorektale Adenokarzinom- zelllinie
HT29 TRAF1	eigene Herstellung	kolorektale Adenokarzinom- zelllinie
HeLa-TNFR2	(Weiss et al., 1998)	Zervixkarzinom
HeLa-TNFR2		
TRAF1	eigene Herstellung	Zervixkarzinom
Kym-1	Institutseigener Stock	Rhabdomyosarkomzelllinie

4.4 Plasmide

Die verwendeten Plasmide zur Produktion löslicher Liganden, sowie die Plasmide, mit denen stabile Zelllinien generiert wurden, wurden selbst bzw. von den Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin in Würzburg kloniert. Die Proteine (Liganden) wurde in HEK293-Zellen produziert.

4.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Das Plastikmaterial, welches zur Kultivierung der Zelllinien benutzt wurde, wurde von der Firma Greiner (Frickhausen) bezogen:

Plastikmaterial:

Kryoröhrchen
 Polypropylenröhrchen
 Zellkulturflaschen
 Zellkulturplatten
 Zellkulturschalen

Geräte:

Agfa Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa, Düsseldorf
Begasungsschrank Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau
BioSep-SEC 3000 (Gelfiltrationssäule)	Phenomenex, Aschaffenburg
Dialyseschlauch "Viking", MWCO 15kDa	Roth, Karlsruhe
DNA-Gel	
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD, Heidelberg
Durchflusszytometrie Röhrchen	Falcon, Heidelberg
Elektrophoresesystem "Mini-Protean Tetra Cell"	BioRad, München
Elektroporator Equibio Easyject Plus	PeqLab, Erlangen
Gellaufkammern SDS-PAGE	PeqLab, Erlangen
Heizblock	PeqLab, Erlangen
HPLC-Anlage BioLogic Duoflow	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Luminometer/ELISA-Reader Lucy 2	Anthos, Krefeld
Nitrocellulosemembran, 0,2 µM Porengröße	Whatman, Dassel
PCR-Thermocycle Primus	MWG Biotech, Ebersberg
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Semi-Dry-Blotkammer	PeqLab, Erlangen
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

4.6 Kits

NucleoSpin Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren
OptEIA IL8-ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
peqGOLD RNAPure	PeqLab, Erlangen

Pure Yield Plasmid Miniprep/ Midiprep System	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase-Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Venor [®] GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin

4.7 Lösungen und Puffer

4x Probenpuffer SDS-PAGE	10 % Glycerin 0,1 M Tris pH 8,0 1 % SDS 0,1 M DTT Bromphenolblau
6x Probenpuffer DNA-Gel	10 mM Tris-HCl pH 7,6 60 % Glycerin 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol
Assay Diluent	PBS 10 % FCS
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
Coating Buffer	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5
Dialyseschlauch-Kochlösung	2 % Natriumhydrogencarbonat 1 mM EDTA

Kristallviolettlösung	20 % Methanol 0,5 % Kristallviolett
Laufpuffer SDS-PAGE	50 mM Tris 380 mM Glycin 4 mM SDS pH 8,3
LB-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g/l NaCl
LB-Platten	LB-Medium 15 g/l Agar
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
MTT-Färbelösung	MTT-Stocklösung 1:5 in PBS verdünnt
MTT-Lysispuffer	50 % Dimethylformamid 15 % SDS pH 4,7 (mit Essigsäure)
MTT-Stocklösung (5x)	50 mg/ml MTT in DMSO
Lysispuffer für Zellen	30 mM Tris pH 7,5 10 % Glycerin 120 mM NaCl 1 % TritonX-100

PBS (phosphate buffered saline)	20 mM Na-Phosphat 0,7 % NaCl pH 7,2
PBS-EDTA	PBS 0,2 mM EDTA
PBST	PBS 0,05 % Tween-20
PBST-Milch	PBS 0,05 % Tween-20 5 % Magermilch
Sammelgelpuffer SDS-PAGE	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8
TAE-Puffer (50-fach)	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
Trenngelpuffer SDS-PAGE	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8
TBS (Tris buffered saline)	0,02M Tris, 8 % NaCl, pH 7,6

5 Methoden

5.1 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

5.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (HT1080, HT29, HeLa-TNFR2) wurden in RPMI1640 Zellkulturmedium, supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (30 min bei 56°C) in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. Die Zelllinie EA.hy926 wurde stattdessen in DMEM (10 % inaktiviertes FCS) gehalten. Abhängig von der Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit PBS gespült, danach mit Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) abgelöst und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt.

5.1.2 Retrovirale Transfektion eukaryontischer Zelllinien

Mittels retroviraler Transfektion mit der cDNA von hTRAF1 wurden stabile HeLa-TNFR2- sowie HT29-Zellen etabliert. Dazu wurde in den retroviralen Vektor p95.1 (bereitgestellt von Dr. Max Topp, Klinische Forschergruppe, Universitätsklinik Würzburg) die hTRAF1-cDNA mit den Restriktionsenzymchnittstellen Hind III/NotI kloniert. Durch eine Transfektion mittels Lipofektamin 2000 (Durchführung nach Herstellerprotokoll, Invitrogen) wurde diese cDNA mit dem Verpackungsplasmid pCL-10A1, welches für die Hüllproteine und die Enzyme reverse Transkriptase und Invertase der Viruspartikel kodiert, in HEK293-T-Zellen eingebracht. 18 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und 24 Stunden später der Mediumüberstand entnommen, der dann sterilfiltriert (0,2 µm) wurde. Im Überstand befanden sich Viruspartikel (S2), die zur Infektion der meisten humanen Zellen befähigt waren. Um HeLa-TNFR2- bzw. HT29-Zellen zu infizieren, wurden 2×10^5 Zellen zusammen mit dem Virusüberstand in ein 15 ml Falcon gegeben und bei 2300 rpm und 32°C für 2 Stunden in Anwesenheit von 10 mg/ml Polybren (Sigma) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Virusüberstand in eine 6-Well-

Platte überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da der p95.1-Vektor nach erfolgreicher Infektion als Selektionsmarker die extrazelluläre Domäne des NGF-Rezeptors auf der Zelloberfläche exprimiert, konnten die Zellen mit anti-NGFR-PE Antikörper markiert werden. Dadurch ließ sich zum einen die Infektionseffizienz durch Durchflußzytometrie (FACS) bestimmen und zum anderen konnten die Zellen durch das Zellsortierungs-System MACS-Sort (Miltenyi Biotech GmbH) einer positiven Selektion unterzogen werden. Durch diese Methode erreichte man die Generierung stabil exprimierender hTRAF1-Zelllinien.

5.1.3 Konservierung von Zellen

Um Zelllinien längerfristig zu lagern, wurde das Zellpellet kryokonserviert. Dabei wird das Zellpellet in 800 µl Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C weggefroren.

5.2 Zytotoxizitätsassay

Zur Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung mit zytotoxischen Agenzien wie z.B. TNF, TRAIL oder FasL, wurden zunächst 2×10^4 Zellen pro Well in einer 96-Well Flachbodenplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag war es bei einigen Zelllinien notwendig diese vorher für 30 min mit Cycloheximid (CHX) vorzubehandeln und dadurch für den TNF-induzierten Zelltod zu sensitivieren. Die Zellen wurden anschließend mit konstanter Konzentration an Flag-TWEAK vorstimuliert, woraufhin die zytotoxischen Reagenzien (Fc-TNF(32W/86T) oder KillerTRAIL) entweder in sequentiellen Verdünnungen oder in konstanten Konzentrationen zugegeben wurden. Jede Gruppe wurde in Triplets angesetzt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde nach über Nacht-Inkubation mittels Kristallviolett-färbung ermittelt. Dabei wurde der Überstand verworfen und die adhärennten Zellen für 15 min mit Kristallviolettlösung inkubiert. Danach wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten mehrmals mit Wasser gewaschen, so dass die von den Zellen nicht aufgenommene Kristallviolettlösung abgewaschen wurde. Nach ca. einer Stunde Trocknung an der Luft wurden die Wells mit je 150 µl Methanol versetzt, um das

Kristallviolett zu lösen. Die Platten konnten im Anschluss bei 590 nm im ELISA-Reader analysiert werden.

Bei allen angesetzten Zytotoxizitätsassays wurde eine Tod-Kontrolle mitgeführt, die sich aus einem Mix von Fc-FasL, KillerTRAIL und CHX zusammensetzte.

5.3 Bestimmung der IL8-Produktion mittels ELISA

Bei der Bestimmung der Produktion von IL8, einem Zielgen des klassischen NF κ B-Signalweges, wurden $2,0 \times 10^4$ Zellen pro Well in einer 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Verdünnungsreihe der entsprechenden Liganden für 6 h stimuliert. Der Zellüberstand, in den das Zytokin IL8 sezerniert wurde, wurde daraufhin entnommen und bei -20°C weggefroren. Am gleichen Tag wurden zudem die 96-Well-ELISA-Platten mit dem anti-hIL8-Antikörper beschichtet und bei 4°C gelagert. Am Tag 2 wurden die ELISA-Platten mit dem Überstand der Zellen und IL8-Standardlösungen (2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml) für 2 h bei RT inkubiert. Die Produktion von IL8 konnte dann mit einer Mischung aus biotinyliertem anti-IL8-Antikörper und Streptavidin-Meerrettichperoxidase (-HRP), die für eine Stunde auf der Platte binden konnte, und einem farbigen HRP-Substrat (ABTS) am ELISA-Reader bei 405 nm gemessen werden.

5.4 NF κ B-Reporterassay

Um die NF κ B-Promotoraktivität in stimulierten Zellen zu messen, wurde ein Plasmid verwendet, das einen NF κ B-Promotor enthält, dem eine sekretierbare Gaussia-Luciferase nachgeschaltet ist. Im Falle einer Aktivierung von NF κ B-Dimeren kann die Aktivität des NF κ B-Promotors anhand der im Überstand vorhandenen Gaussia-Luciferase ermittelt werden. Dabei wurden 2×10^7 Zellen mit 30 μ g Reporterplasmid durch Elektroporation transfiziert, anschließend ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen in 96-Well-Flachbodenplatten mit je 2×10^4 Zellen pro Well überführt und am Abend mit

Verdünnungsreihen der entsprechenden Liganden über Nacht bei 37°C stimuliert. Nach Ablauf der gewünschten Stimulationszeit wurde der Überstand entnommen, mit Gaussia-Substrat (Durchführung nach Herstellerprotokoll, New England Biolabs) versetzt und anschließend die Gaussia-Aktivität im Luminometer ermittelt. Beim Vergleich verschiedener Zelllinien (z.B. HeLa-TNFR2 Vec. und HeLa-TNFR2 TRAF1) wurde die X-fach Induktion der NFκB-Promotoraktivität verglichen mit unstimulierten, transfizierten Zellen ermittelt.

5.5 Herstellung von Zelllysaten

5.5.1 Gesamtzelllysate

Bei der Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden 2×10^6 Zellen pro Ansatz ausgesät und am nächsten Tag mit den angegebenen Konzentrationen an entsprechenden Stimulanzen für die angegebene Zeit behandelt. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS gespült, mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach der Zentrifugation (4 min, 2000 rpm bei 4°C) wurde das Medium abgezogen und das Zellpellet in 50-150 µl 4x Probenpuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und für 15 Sekunden sonifiziert. Bei Lysaten, die für die Detektion von phospho-spezifischen Antikörpern verwendet wurden, wurde zusätzlich zu den Proteaseinhibitoren noch Phosphataseinhibitoren in den 4x Probenpuffer zugegeben. Das sonifizierte Zellpellet wurde anschließend für 5 min bei 96°C aufgeköcht, 10 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert und zur Aufbewahrung bei -20°C weggefroren.

5.5.2 Triton X-100-Lysate

Bei Herstellung von Lysaten der Triton X-100 löslichen Bestandteile wurden nach Versuchsende die Zellen (3×10^6) mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und in 100 µl Triton X-100-Lysispuffer aufgenommen. Der Lysispuffer wurde mit Proteaseinhibitoren versetzt, um Degradation von Proteinen zu verhindern. Die Proben wurden im Lysispuffer resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert, mit drei

sequentiellen Zentrifugationsschritten (5000 U/min, 5 min, 4°C; zweimal 14.000 U/min, 20 min, 4°C) wurden unlösliche Membranbestandteile abgetrennt, der verbliebene Überstand mit 4x Probenpuffer versetzt und bei 96°C aufgekocht. Bis zur Analyse konnten die Proben bei -20°C gelagert werden.

5.6 Western Blot

5.6.1 SDS-PAGE

Zur Größenauftrennung der Proteine aus den Zelllysaten wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei setzte sich das Trenngel aus der Trenngellösung (375 mM Tris pH 8,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) und 8-12 % Acrylamid (je nach Proteingröße) zusammen. Die Polymerisation des Acrylamids wurde mit 0,1 % TEMED gestartet. Um die Proben jedoch vor der Auftrennung zu sammeln wurde das Trenngel mit einem Sammelgel (6 % Acrylamid in 125 mM Tris pH 6,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) überschichtet und vor der Auspolymerisierung der Gelkamm eingesetzt. Nach Beladung der Gele wurde eine Spannung von 90-130 Volt für ca. 90 min angelegt.

5.6.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Um die Proteine in einem Western Blot sichtbar zu machen, mussten die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Dies wurde mit einer horizontalen „semi-dry“-Blotkammer (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran und das Whatman-Filterpapier wurde in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) getränkt und wie folgt auf die Blotkammer gelegt:

Anode/ 2 Blatt Whatman-Papier/ Nitrozellulose/ Gel/ 2 Blatt Whatman-Papier/ Kathode. Der Proteintransfer wurde bei RT und einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm² Gelfläche in 90-120 min durchgeführt.

5.6.3 Immunfärbung durch ECL

Die auf die Nitrozellulosemembran geblotteten Proteine konnten durch spezifische Antikörper detektiert werden. Dazu wurde die Membran nach dem Proteintransfer zunächst in Blockpuffer (5 % Magermilch in PBST bzw. TBST) für ca. 1 Stunde auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran mit PBST bzw. TBST gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem ersten, Protein-spezifischen Antikörper in PBST bzw. TBST inkubiert. Nach diesem Schritt kam ein Waschschrift (3 x 5 Minuten mit PBST bzw. TBST), auf den dann die Inkubation für 1 Stunde bei RT mit dem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper in PBST bzw. TBST-Milch folgte. Nachdem die Membran erneut dreimal gewaschen wurde, erfolgte die Nachweisreaktion mit einem luminolbasierten Substrat (ECL Western Blotting Detection System; GE Healthcare, Garching) und Röntgenfilmen (Amersham, Kodak-Entwicklermaschine), auf denen die Chemolumineszenz detektiert werden konnte.

5.7 Durchflusszytometrie

Der Nachweis der Oberflächenexpression der TNF-Rezeptoren LT β R, HVEM, NGFR, TNFR1 und TNFR2 auf den verwendeten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie erbracht. Hierfür wurden 2×10^5 Zellen mit den zugehörigen PE-konjugierten Antikörpern und den entsprechenden Isotypkontrollen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS-BSA (PBS mit 0,5 % BSA) wurde die Fluoreszenz der gebundenen Antikörper am BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert.

6 Ergebnisse

6.1 TWEAK moduliert die TNFR1-induzierte Signaltransduktion

6.1.1 TWEAK verstärkt die TNFR1-induzierte Apoptose

Wie schon in früheren Arbeiten u.a. von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, führt die TNFR2-induzierte TRAF2-Depletion zu einer Verstärkung der TNFR1-vermittelten Apoptose. Die TRAF2-Depletion kann aber auch eine verminderte Aktivierung von NF κ B und JNK zur Folge haben (Wang et al., 1998; Chan und Lenardo, 2000; Wu et al., 2005; Fotin-Mleczek et al., 2002). Der TNF-ähnliche Ligand TWEAK wurde in den letzten Jahren als starker Aktivator des alternativen NF κ B-Signalweges identifiziert (Saitoh et al., 2003). Gleichzeitig zeigte sich auch, dass die Depletion von TRAF2 ein zentrales Ereignis in der TWEAK-induzierten Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher u.a. untersucht werden, ob TWEAK/Fn14 auch die TRAF2-Depletion induziert und zu einer Verstärkung des TNFR1-vermittelten Zelltodes führt. Um dies zu testen, wurden verschiedene Zelllinien mit löslichem Flag-TWEAK (Flag-sTWEAK) vorstimuliert und anschließend mit Fc-TNF-(32W/86T) und Killer-TRAIL behandelt. Bei Fc-TNF-(32W/86T) handelt es sich dabei um eine TNFR1-spezifische Mutante von TNF (Loetscher et al., 1993). Killer-TRAIL aktiviert die TNFR1-verwandten Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 und wurde ebenfalls untersucht, um festzustellen, inwieweit eine Kooperation von TNF-(32W/86T) und TWEAK gegebenenfalls spezifisch für den TNFR1 ist. Die TWEAK Vorbehandlung führte zu einer starken Sensibilisierung der Zellen für den TNF-induzierten Zelltod, was sich darin zeigte, dass sich die ED50 für die TNF-(32W/86T)-induzierte Apoptose in TWEAK vorstimulierten Zellen verringert hat. Der TRAIL-induzierte Zelltod blieb jedoch praktisch unbeeinflusst (Abb. 6). Um eine deutliche Induktion des Zelltodes durch TNF und TRAIL zu erreichen, wurden wie in Abb. 6 dargestellt alle untersuchten Zelllinien mit Cycloheximid (CHX) vorbehandelt. CHX verhindert die Synthese der kurzlebigen Caspase-8 inhibierenden FLIP-Proteine und erleichtert so

die Todesrezeptor-induzierte Apoptose (Wajant et al., 2000; Leverkus et al., 2000; Siegmund et al., 2002)

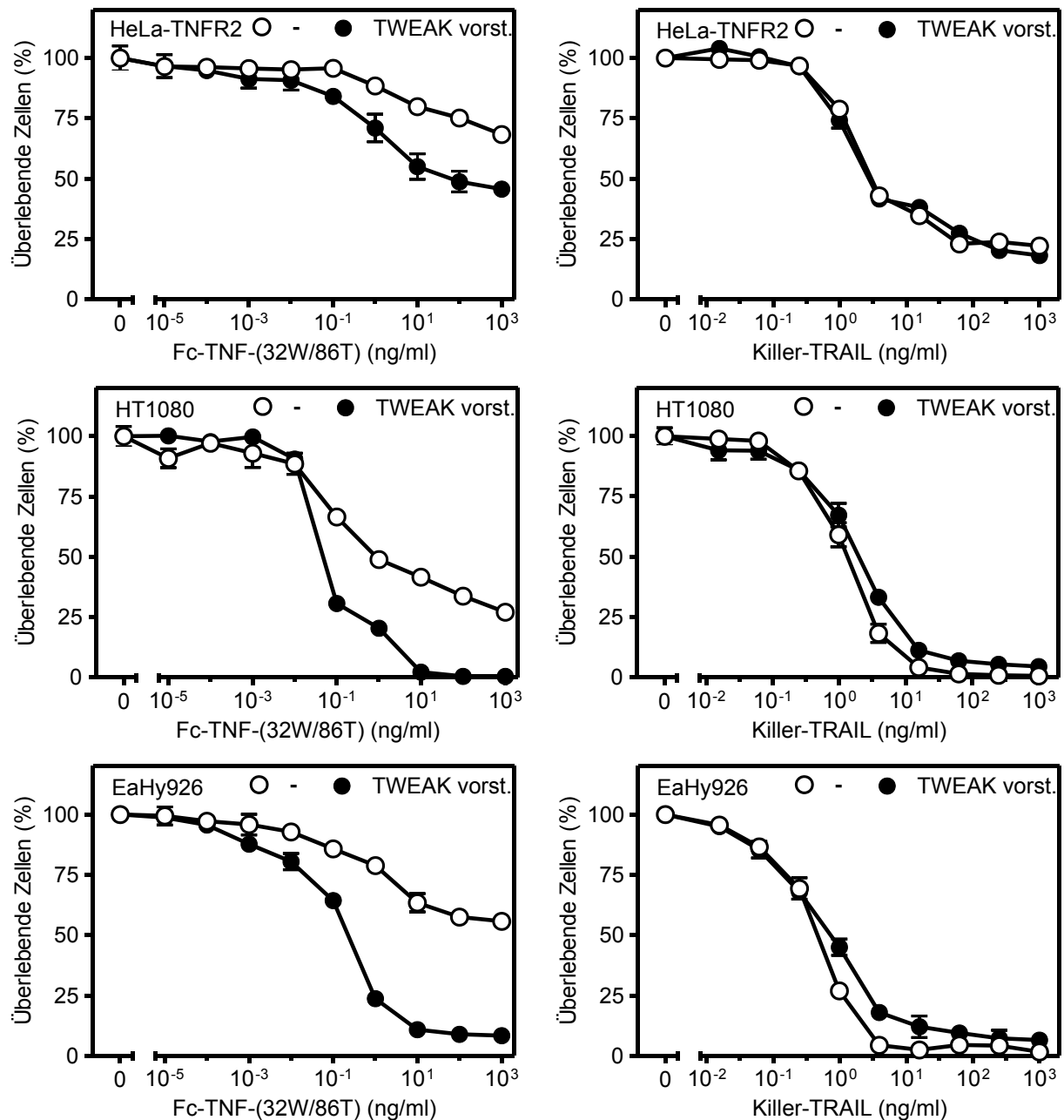


Abb. 6 Zytotoxizität von TNF-(32W/86T) und Killer-TRAIL auf verschiedenen Zelllinien nach Flag-TWEAK Vorstimulation

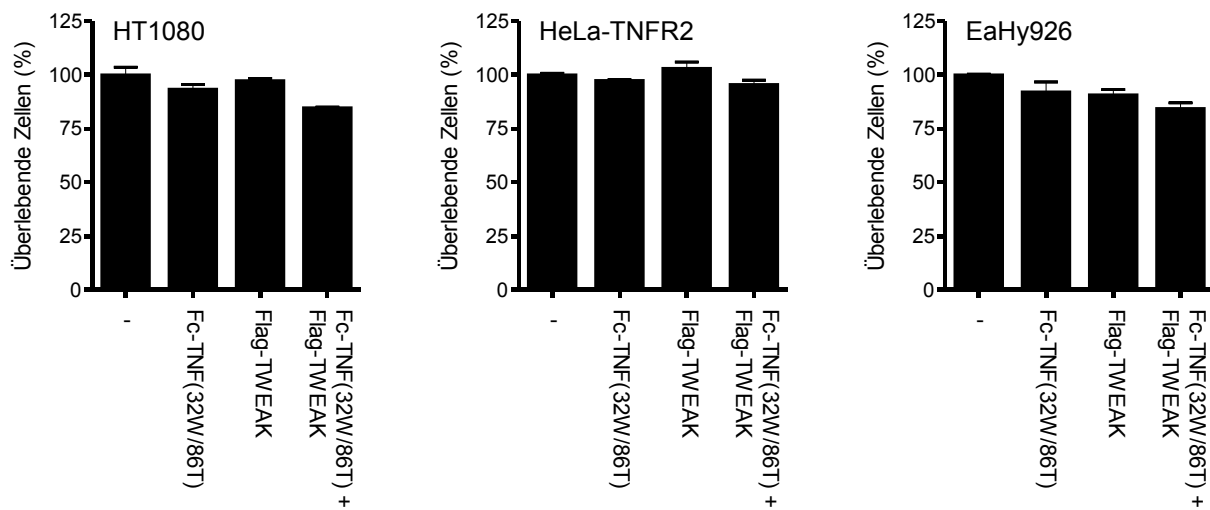
Verschiedene Zelllinien wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) für 6 h vorstimuliert oder blieben unbehandelt. Danach wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen (Dreifachwerte) an Fc-TNF-(32W/86T) und Killer-TRAIL unter Zugabe von 2,5 µg/ml CHX behandelt. Nach 18 h wurde der Anteil überlebender Zellen mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt.

Um zu prüfen, ob die TWEAK Behandlung die sensitivierende Wirkung von Cycloheximid ersetzt, wurden Experimente durchgeführt in denen die verschiedenen

Zelllinien ohne CHX einer Ko-Behandlung mit TNF und TWEAK unterzogen wurden. Dabei zeigte sich in allen Fällen, dass die TWEAK Vorbehandlung nicht ausreichend war, um in Abwesenheit von CHX die TNFR1-induzierte Apoptose zu ermöglichen. Auch in TWEAK sensibilisierten Zellen war weiterhin eine Sensitivierung mit CHX notwendig (Abb. 7a). Dies ist ein Hinweis darauf, dass TWEAK nicht auf die antiapoptotische Wirkung der FLIP-Proteine einwirkt. Darüber hinaus ist dies in guter Übereinstimmung mit dem Umstand, dass TWEAK die TRAIL-induzierte Apoptose nicht verstärkte (Abb. 6).

Die Tatsache, dass die TWEAK-Sensitivierung auf zellulärer Ebene anders wirken muss als CHX, zeigte sich darin, dass die TNF-induzierte Apoptose in Kym-1-Zellen, die keine Sensitivierung durch CHX benötigen, ebenfalls durch eine TWEAK Vorbehandlung verstärkt wurde. Auch in diesem Zelltyp zeigte die TWEAK Vorbehandlung keinen Effekt auf die Apoptose-Induktion der TNFR1-verwandten TRAIL-Todesrezeptoren (Abb. 7b).

a)



b)

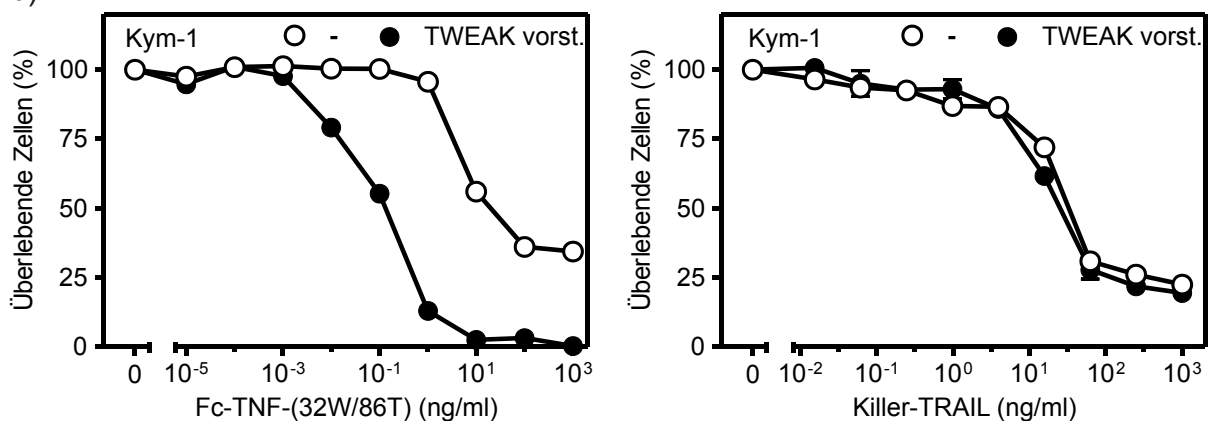


Abb. 7 Zytotoxizität von TNF-(32W/86T) und Killer-TRAIL auf verschiedenen Zelllinien nach Flag-TWEAK Vorstimulation ohne CHX-Sensitivierung

a) Unterschiedliche Zelllinien wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) für 6h vorstimuliert oder blieben unbehandelt und anschließend mit Fc-TNF-(32W/86T) (1 µg/ml) ohne Zugabe von CHX stimuliert.

b) Kym-1-Zellen wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) für 2 h vorstimuliert oder blieben unbehandelt. Danach wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen (Dreifachwerte) an Fc-TNF-(32W/86T) und Killer-TRAIL für 6 h behandelt. Die überlebenden Zellen wurden mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt.

Um zu prüfen, ob der durch TNF/TWEAK-induzierte Zelltod caspaseabhängig erfolgt, wurden die in Abb. 6 gezeigten Zelllinien mit einem Caspaseinhibitor (z-VAD-fmk) koinkubiert. Hierzu wurden die Zelllinien mit TWEAK vorstimuliert, danach in An- bzw. Abwesenheit von z-VAD-fmk mit TNF-(32W/86T) inkubiert und dann anschließend wurde die Zellviabilität bestimmt. Bei Zellen, die mit z-VAD-fmk behandelt wurden, konnte der Zelltod, verglichen zu den unbehandelten Zellen, verhindert werden. Der in diesen Zellen durch TNF/TWEAK-induzierte Zelltod ist also caspaseabhängig (Abb. 8).

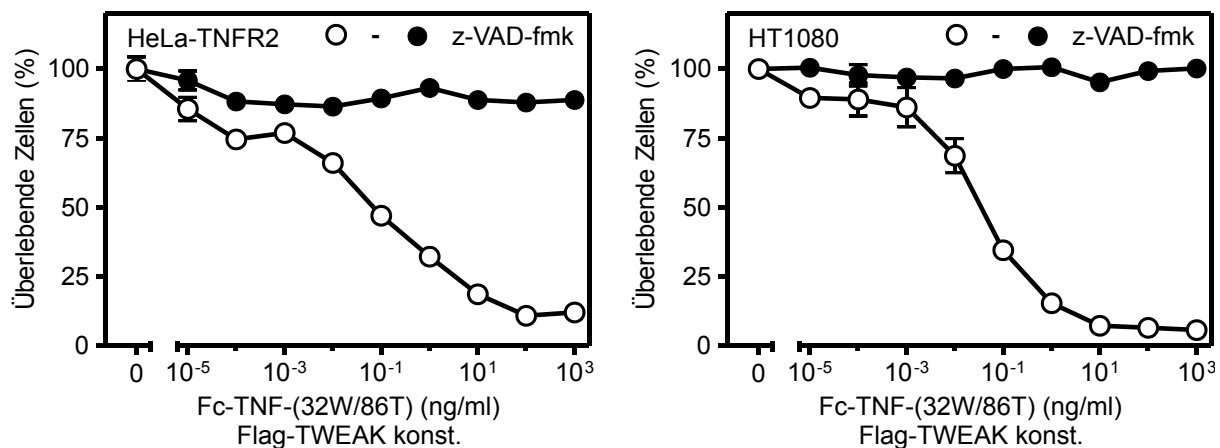


Abb. 8 Caspase-Abhängigkeit der Zytotoxizität von TNF-(32W/86T) und Killer-TRAIL auf verschiedenen Zelllinien nach Flag-TWEAK Vorstimulation

HeLa-TNFR2 und HT1080 Zellen wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) für 6 h vorstimuliert und danach in Triplets mit den angegebenen Konzentrationen Fc-TNF-(32W/86T) unter Zugabe von 2,5 µg/ml CHX mit bzw. ohne z-Vad-fmk (20 µM) behandelt. Nach 18 h wurden die überlebenden Zellen mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

6.1.2 TWEAK sensibilisiert Zellen für den TNFR1-induzierten caspaseunabhängigen Zelltod

TNF kann nicht nur caspaseabhängige Apoptose induzieren, sondern in manchen Zelltypen, z.B. HT29, auch caspaseunabhängige Nekrose auslösen (Nakayama et al., 2002; Wilson und Browning, 2002). In den bisher untersuchten Zelllinien beruhte der durch TNF/TWEAK ausgelöste Zelltod auf der Induktion von Apoptose, wie sich mit Hilfe des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk, der diese Zellen vollständig vor TNF- oder TNF/TWEAK-induziertem Zelltod schützte, zeigen ließ. Um zu prüfen, ob TWEAK auch die TNF-induzierte Nekrose verstärkt, wurden HeLa-TNFR2- und HT29-Zellen im Detail vergleichend betrachtet. In HeLa-TNFR2-Zellen erfolgt das TNF-induzierte Zellsterben (Abb. 9a) durch caspaseabhängige Apoptose (Fotin-Mleczeck et al., 2002). In HT29-Zellen können TNF und andere Todesliganden jedoch nicht nur Caspasen aktivieren, sondern nach deren Hemmung auch Nekrose induzieren (Nakayama et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesen Studien konnte der Caspaseinhibitor z-VAD-fmk den TNF/TWEAK-induzierten Zelltod in HeLa-TNFR2-Zellen komplett verhindern, wohingegen eine Protektion vor Zelltod in HT29-Zellen durch z-VAD-fmk nicht festgestellt werden konnte, sondern es war eher eine leichte Verstärkung zu verzeichnen (Abb. 9a). Trotz erfolgreicher Blockade der

Caspasen-Aktivierung waren die HT29- gegenüber den HeLa-TNFR2-Zellen sehr sensitiv bezüglich des TNF-induzierten Zelltodes (Abb. 9b). Um die Hypothese zu festigen, dass TWEAK auch die TNF-induzierte Nekrose in HT29-Zellen verstärkt, wurde der RIP-Inhibitor Necrostatin-1 genutzt, der die Rezeptor-induzierte RIP-vermittelte Nekrose unterbindet. Obwohl Necrostatin-1 nur einen geringen Effekt auf das Überleben von HeLa-TNFR2-Zellen nach TWEAK-Vorstimulation und nachfolgender TNF-Behandlung zeigte, konnten HT29-Zellen vor TNF/TWEAK-induziertem Zelltod geschützt werden, wenn gleichzeitig der Caspaseinhibitor z-VAD-fmk appliziert wurde (Abb. 9c). Diese Studien zeigten somit auf, dass TWEAK sowohl TNF-induzierte caspaseabhängige Apoptose als auch Nekrose verstärken kann.

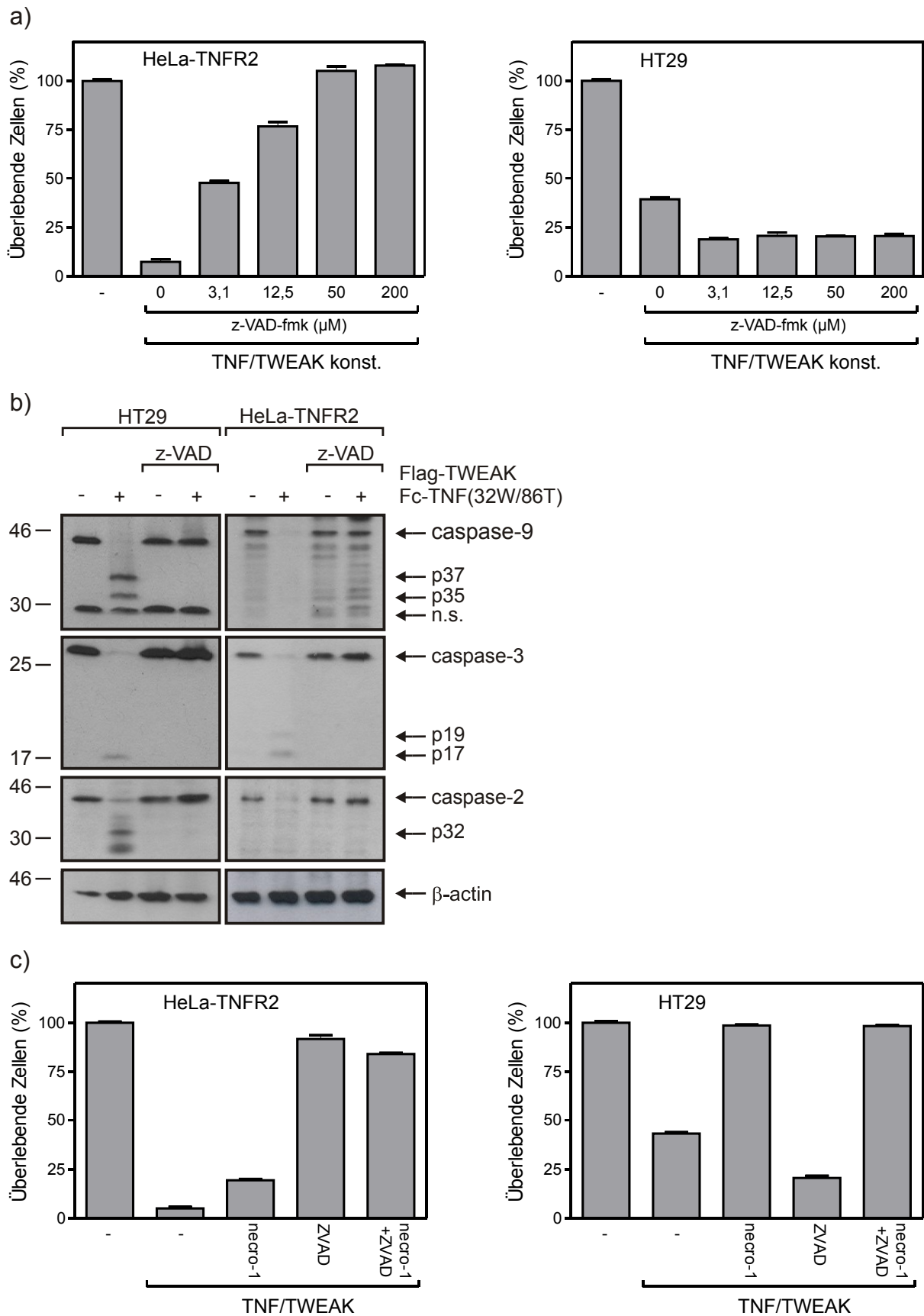


Abb. 9 TWEAK sensibilisiert HT29-Zellen für den TNFR1-induzierten caspaseunabhängigen Zelltod

a) HT29- und HeLa-TNFR2-Zellen blieben unbehandelt oder wurden 6 h mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) vorbehandelt. Unter Zugabe von CHX wurden die Zellen dann 18 h mit Fc-TNF-(32W/86T) (50 ng/ml) in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen von z-VAD-fmk stimuliert. Das Überleben der Zellen wurde mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt.

b) Die Zellen wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) vorbehandelt und unter Zugabe von CHX anschließend mit Fc-TNF-(32W/86T) in An- bzw. Abwesenheit von z-VAD-fmk stimuliert. Nach 5 h wurden die Zellen geerntet und die Prozessierung der angegebenen Caspasen mittels Western Blot Analyse ermittelt.

c) TWEAK (200 ng/ml, 6 h) sensibilisierte HeLa-TNFR2- und HT29-Zellen wurden für 1 h mit den angegebenen Mischungen aus z-VAD-fmk (40 μ M) und Necrostatin-1 (90 μ M) inkubiert und dann mit 50 ng/ml Fc-TNF-(32W/86T) und CHX über Nacht stimuliert. Das Überleben der Zellen wurde mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt.

6.1.3 TWEAK schwächt die TNFR1-, LT β R- und HVEM-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges ab

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe fanden wir, dass die Aktivierung des TNFR2 nicht nur zur Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose, sondern aufgrund der Degradation bzw. Depletion von TRAF2 auch zur Inhibition der TNFR1-induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges führen kann (Wang et al., 1998; Chan und Lenardo, 2000; Wu et al., 2005; Fotin-Mleczek et al., 2002). Da nun TWEAK bzw. das TWEAK/Fn14-System wie der TNFR2 die TNFR1-induzierte Apoptose verstärkt, war es naheliegend, dass TWEAK und Fn14 in analoger Weise zu TNFR2 auch die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TNFR1 abschwächen. Um dies zu prüfen, wurden HT29-Zellen mit TWEAK vorstimuliert bzw. unbehandelt gelassen und anschließend untersucht, inwieweit die TNFR1-induzierte NF κ B-Aktivierung inhibiert war. Auf der Ebene der I κ B α -Degradation zeigte sich in der Tat auch eine deutliche Abschwächung. Dies spiegelt sich in dem Umstand wieder, dass nach fünf Minuten noch deutliche Mengen an I κ B α in der TWEAK-vorbehandelten Gruppe zu finden waren, in der unbehandelten Gruppe dagegen nicht (Abb. 10a). Da nicht nur der TNFR1, sondern auch weitere Mitglieder der TNFR-Familie TRAF2-abhängig den klassischen NF κ B-Signalweg aktivieren, wurde weiterhin untersucht, ob auch andere TNF-Rezeptoren in ihrer Fähigkeit den klassischen NF κ B-Signalweg zu aktivieren, inhibiert werden. Hierzu wurden ebenfalls HT29-Zellen mit TWEAK vorstimuliert und anschließend diese Zellen mit LT $\alpha\beta_2$, einem Aktivator des LT β -Rezeptors (LT β R) bzw. mit LIGHT, welches sowohl den LT β R als auch den Rezeptor HVEM aktiviert, stimuliert. In beiden Fällen zeigte sich,

dass eine TWEAK-Vorstimulation zu einer deutlichen Inhibition der durch diese Liganden induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges führt (Abb. 10b). Dies spricht dafür, dass die durch TWEAK (möglicherweise auch TNFR2) induzierte Degradation bzw. Depletion von TRAF2 generell zu einer Abschwächung der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TRAF2-bindende NF κ B-aktivierende TNF-Rezeptoren führt.

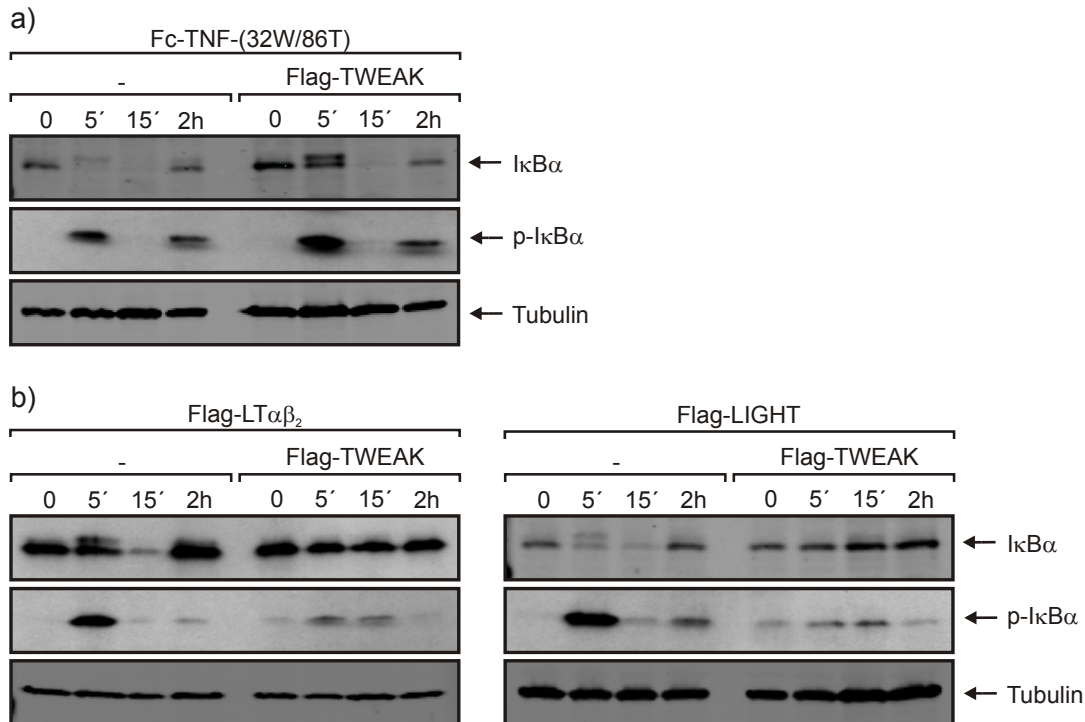


Abb. 10 TWEAK inhibiert durch verschiedene TNF-Rezeptoren die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges

HT29-Zellen wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) für 6 h vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit a) Fc-TNF-(32W/86T) (50 ng/ml) bzw. b) Flag-LT $\alpha\beta_2$ (200 ng/ml) und Flag-LIGHT (200 ng/ml) für den angegebenen Zeitraum stimuliert. Danach wurden Gesamtzelllysate auf die Phosphorylierung und die Degradation von I κ B α mittels Western Blot untersucht. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

6.2 Oligomerisierte und nicht-oligomerisierte TWEAK-Trimere unterscheiden sich in der Aktivierung der beiden NF κ B-Signalwege

6.2.1 Trimeres lösliches TWEAK aktiviert den alternativen NF κ B-Signalweg stark, den klassischen aber nicht oder nur schwach

Ogleich TWEAK seinen Namen nicht zuletzt aufgrund des Umstandes bekommen hat, dass es in einigen Studien schwach Apoptose induziert und nur eine schwache proinflammatorische Wirkung hervorruft, wurde in anderen Arbeiten eine starke Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TWEAK gezeigt (Brown et al., 2003; Chicheportiche et al., 1997; Saitoh et al., 2003). Letzteres ist aufgrund des Umstandes, dass TWEAK stark TRAF2 degradiert, etwas unerwartet, da TRAF2 eine wichtige Rolle in der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges spielt. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob TWEAK in unseren Systemen den alternativen und auch den klassischen NF κ B Signalweg zu stimulieren vermag.

Zu diesem Zweck wurden HT29-Zellen mit steigenden Konzentrationen an TWEAK stimuliert und die Prozessierung von p100 zu p52 mittels Western Blot bestimmt (Abb. 11a). Als Marker für die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges wurde die Phosphorylierung von I κ B α detektiert, gleichfalls per Western Blot. Es zeigte sich, dass Flag-TWEAK die Prozessierung von p100 mit ED₅₀ Werten von ca. 20 ng/ml sehr gut induziert, es fand jedoch keine bzw. eine nur sehr geringe Phosphorylierung von I κ B α statt (Abb. 11b).

Diese Experimente zeigten somit eine starke TWEAK-induzierte Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges, jedoch nur eine sehr geringe Wirkung von TWEAK auf den klassischen NF κ B-Signalweg.

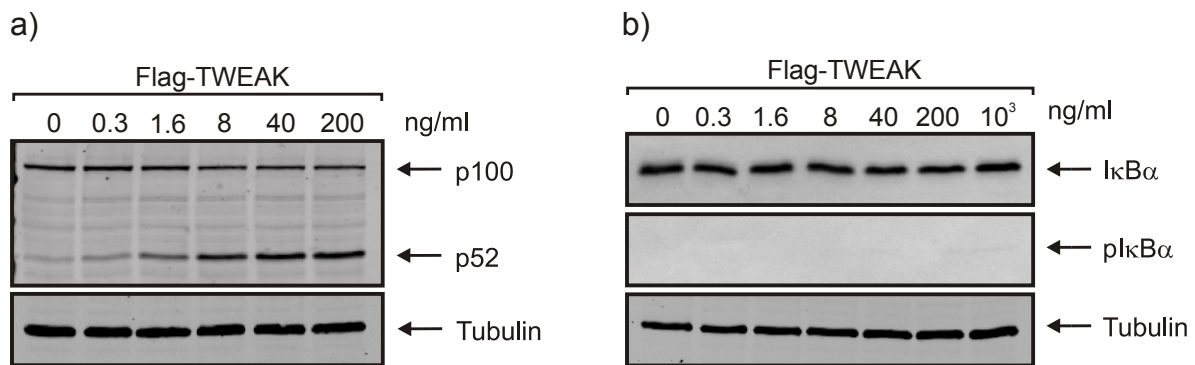


Abb. 11 Trimeres lösliches TWEAK aktiviert den alternativen, aber nicht den klassischen NFκB-Signalweg in HT29-Zellen

a) HT29-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TWEAK für 8 h stimuliert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt, die auf die Prozessierung von p100 zu p52 hin im Western Blot untersucht wurden. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

b) HT29-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TWEAK für 15 min stimuliert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate auf Phosphorylierung und Degradation von IκBα hin untersucht.

6.2.2 Oligomerisiertes TWEAK aktiviert sowohl den alternativen als auch den klassischen NFκB-Signalweg

Für eine Reihe von TNF-Liganden wurde in den vergangenen Jahren gezeigt, dass eine Oligomerisierung dieser Moleküle zu einer Steigerung deren Aktivität führt (Wyzgol et al., 2009). Es wurde daher im Folgenden auch untersucht, inwieweit eine Oligomerisierung von Flag-TWEAK Trimeren durch Quervernetzung mit einem anti-Flag-Antikörper eine erhöhte Aktivität des TWEAK-Moleküls zur Folge hat. Hierbei wurde beobachtet, dass die Oligomerisierung von Flag-TWEAK keinerlei Einfluss auf die TWEAK-induzierte Prozessierung von p100 hat (Abb. 11a, Abb. 12a). Überraschenderweise zeigte sich jedoch eine deutliche Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges durch oligomerisiertes TWEAK verglichen mit nicht quervernetztem TWEAK (Abb. 11b, Abb. 12b). Es ergab sich somit die interessante Situation, dass die Aktivierung eines Signalweges durch die Oligomerisierung des Liganden nicht moduliert wird, wohingegen die Aktivierung eines anderen Signalweges sich als stark abhängig von der Liganden-Oligomerisierung erwies.

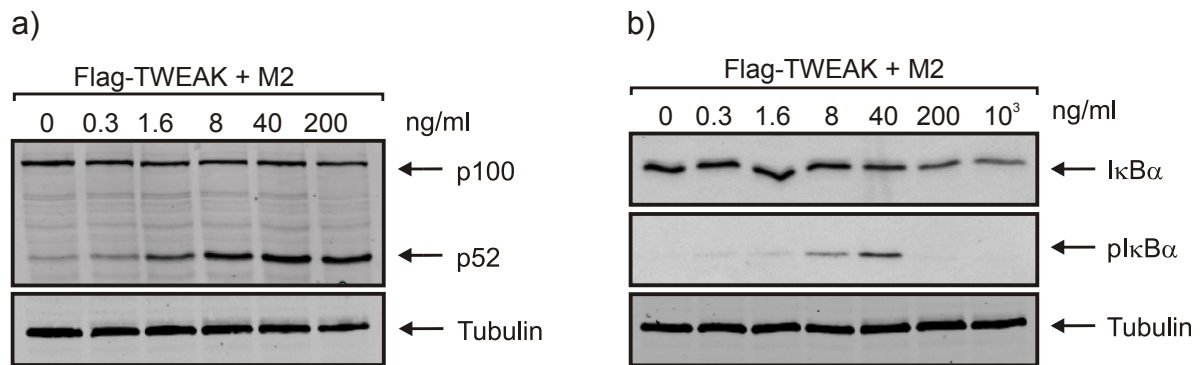


Abb. 12 Oligomerisiertes trimeres lösliches TWEAK aktiviert den alternativen und den klassischen NF κ B-Signalweg

a) HT29-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an quervernetztem Flag-TWEAK für 8 h stimuliert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt, die auf die Prozessierung von p100 zu p52 hin im Western Blot untersucht wurden. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

b) HT29-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen mit oligomerisiertem Flag-TWEAK für 15 min stimuliert. Anschließend wurden Totalzelllysate hergestellt, die mittels Western Blot auf die Phosphorylierung und Degradation von I κ B α hin untersucht wurden.

Da die Oligomerisierung von Flag-TWEAK zu einer stärkeren Phosphorylierung von I κ B α und daher zu einer stärkeren Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges führt, war es interessant die Induktion des Zytokins IL8, welches in dominanter Weise durch den klassischen NF κ B-Signalweg reguliert wird, zu untersuchen. Es wurden deshalb verschiedene Zellen mit oligomerisiertem bzw. nicht quervernetztem TWEAK stimuliert und die Induktion von IL8 gemessen. Es zeigte sich auch hier eine deutlich höhere Aktivität des oligomerisierten TWEAK (Abb. 13).

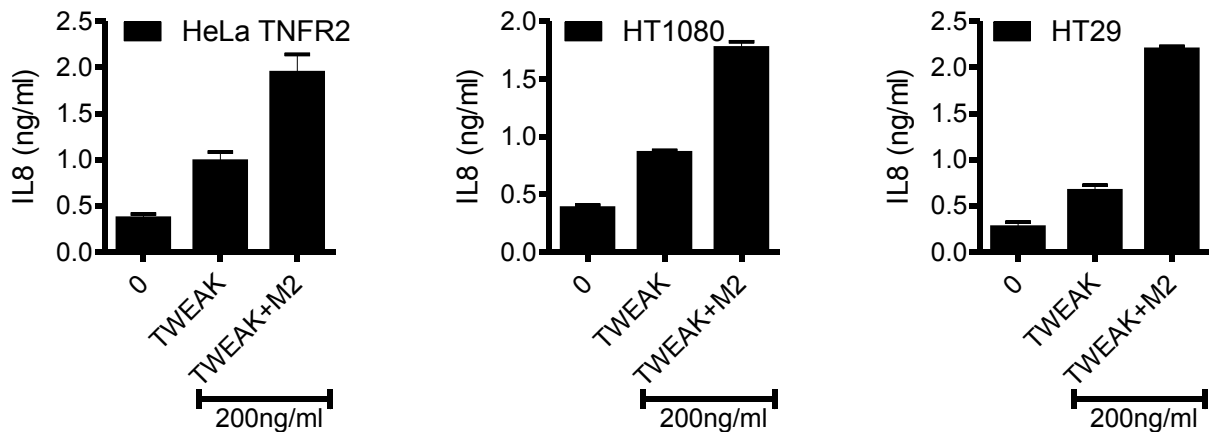


Abb. 13 Oligomerisierung von trimerem löslichem TWEAK führt zur Verstärkung der IL8-Induktion

Die angegebenen Zelllinien wurden mit oligomerisiertem und nicht-oligomerisiertem löslichem TWEAK (200 ng/ml) für 8 h stimuliert. Anschließend wurde der Überstand und die IL8 Induktion mittels IL8-ELISA gemessen.

Aufgrund der beobachteten Unterschiede bei der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch oligomerisiertes bzw. nicht-oligomerisiertes lösliches TWEAK, wurde nochmals die Verstärkung des TNFR1-induzierten Zelltodes untersucht. Es wurden Zellen mit löslichem TWEAK, wie auch mit oligomerisiertem löslichem TWEAK vorstimuliert und anschließend wie in Abb. 6 die Induktion der TNFR1-vermittelten Apoptose untersucht (Abb. 14). Diese Experimente zeigten, dass die Verstärkung des TNFR1-induzierten Zelltodes durch Vorstimulation mit TWEAK als auch die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges unabhängig von einer Oligomerisierung des löslichen Liganden ist.

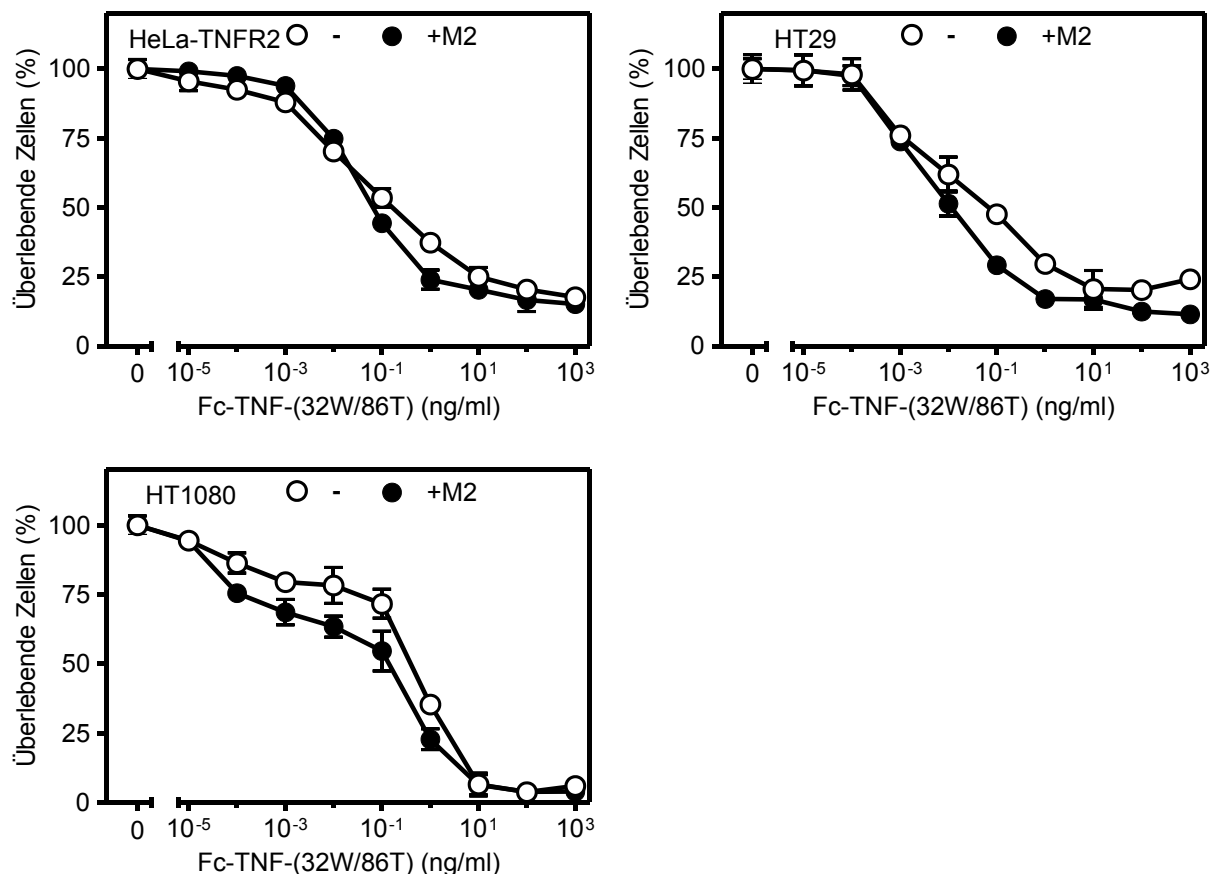


Abb. 14 Zytotoxizität von TNF-(32W/86T) auf verschiedenen Zelllinien nach Vorstimulation mit Flag-TWEAK bzw. oligomerisiertem Flag-TWEAK

Verschiedene Zelllinien wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) bzw. mit anti-Flag-Antikörper quervernetztem Flag-TWEAK (200 ng/ml) für 6 h vorstimuliert und danach mit den angegebenen Konzentrationen (Dreifachwerte) an Fc-TNF-(32W/86T) unter Zugabe von 2,5 µg/ml CHX behandelt. Nach 18 h wurden die überlebenden Zellen mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt.

6.3 TRAF1-Expression verstärkt die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges

6.3.1 TRAF1-Expression moduliert die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass sich lösliches trimeres TWEAK bzw. das TWEAK/Fn14-System allgemein ähnlich wie eine Aktivierung des TNFR2, die wir bereits früher untersucht haben, auf den TNFR1-induzierten Signalweg ausübt. Mit unseren Untersuchungen zur TNFR2-induzierten Signaltransduktion fanden wir heraus, dass die Expression des TRAF1-Proteins zu einer Verstärkung der TNFR2-induzierten Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges führt (Wicovsky et al.,

2009a). In Anbetracht der bisher gefundenen ähnlichen Funktionsweise von TWEAK/Fn14 und TNFR2-Aktivierung fragten wir uns im Folgenden, ob TRAF1 möglicherweise auch die TWEAK-Rezeptor bzw. Fn14-vermittelte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges verstärkt. TRAF1 wird in unstimulierten Zellen typischerweise nicht exprimiert, kann jedoch durch den klassischen NF κ B-Signalweg induziert werden (Schwenzer et al., 1999). Es ist daher anzunehmen, dass TRAF1 seine regulatorische Funktionen insbesondere nach der NF κ B-Induktion ausübt. Da nach NF κ B-Aktivierung neben TRAF1 auch die Expression einer Vielzahl anderer Proteine induziert wird, wurden stabil TRAF1-exprimierende HeLa-TNFR2- und HT29-Zellen hergestellt, um die Funktion von TRAF1 auf die TNFR-Signaltransduktion gezielt untersuchen zu können. Diese Zellen wurden stabil mit TRAF1 bzw. mit Kontroll-Vektor-Plasmid transfiziert. Um zu gewährleisten, dass mögliche beobachtete Effekte von TRAF1 in diesen Transfektanten nicht von einer extremen Überexpression des Moleküls verursacht wurden, selektionierten wir hierbei zuvor auf Transfektanten, deren TRAF1-Expression vergleichbar zu der Expression an TRAF1 war, wie sie in den entsprechenden Zellen durch TWEAK induziert werden konnte (Abb. 15).

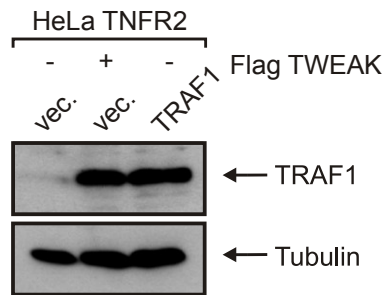


Abb. 15 TRAF1-Expression der HeLa-TNFR2-TRAF1 Transfektanten verglichen zur Flag-TWEAK induzierten TRAF1-Expression

HeLa-TNFR2-Zellen wurden stabil mit TRAF1 bzw. zur Kontrolle mit dem leeren Vektor-Plasmid mittels retroviraler Transfektion transfiziert. Um die TRAF1-Expression zu vergleichen, wurden die Kontrollzellen für 18 h mit Flag-TWEAK (0,5 µg/ml) stimuliert.

Um zu prüfen, ob die TRAF1-Expression einen verstärkenden Effekt auf die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges hat, wurden die Transfektanten mit unterschiedlichen Konzentrationen an oligomerisiertem TWEAK stimuliert. Auf der Ebene des IκBα-Proteins zeigte sich eine klare Verstärkung der IκBα-Degradation, die sich auch in einer beschleunigten IκBα-Phosphorylierung widerspiegelte (Abb. 16a). In anderen Arbeiten unserer Gruppe wurde bereits gezeigt, dass eine TRAF1 Expression in HeLa-TNFR2 keinen Einfluß auf die TNFR1 vermittelte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges hat (Wicovsky et al., 2009a). So zeigte sich auch hier nach einer TNFR1 Stimulation kein verstärkender Effekt auf die Aktivierung des klassischen Signalweges durch TRAF1 (Abb. 16b). Jedoch diente dies als Kontrolle für die Spezifität der Effekte die durch Stimulation des TWEAK/Fn14-Systems gezeigt werden konnten.

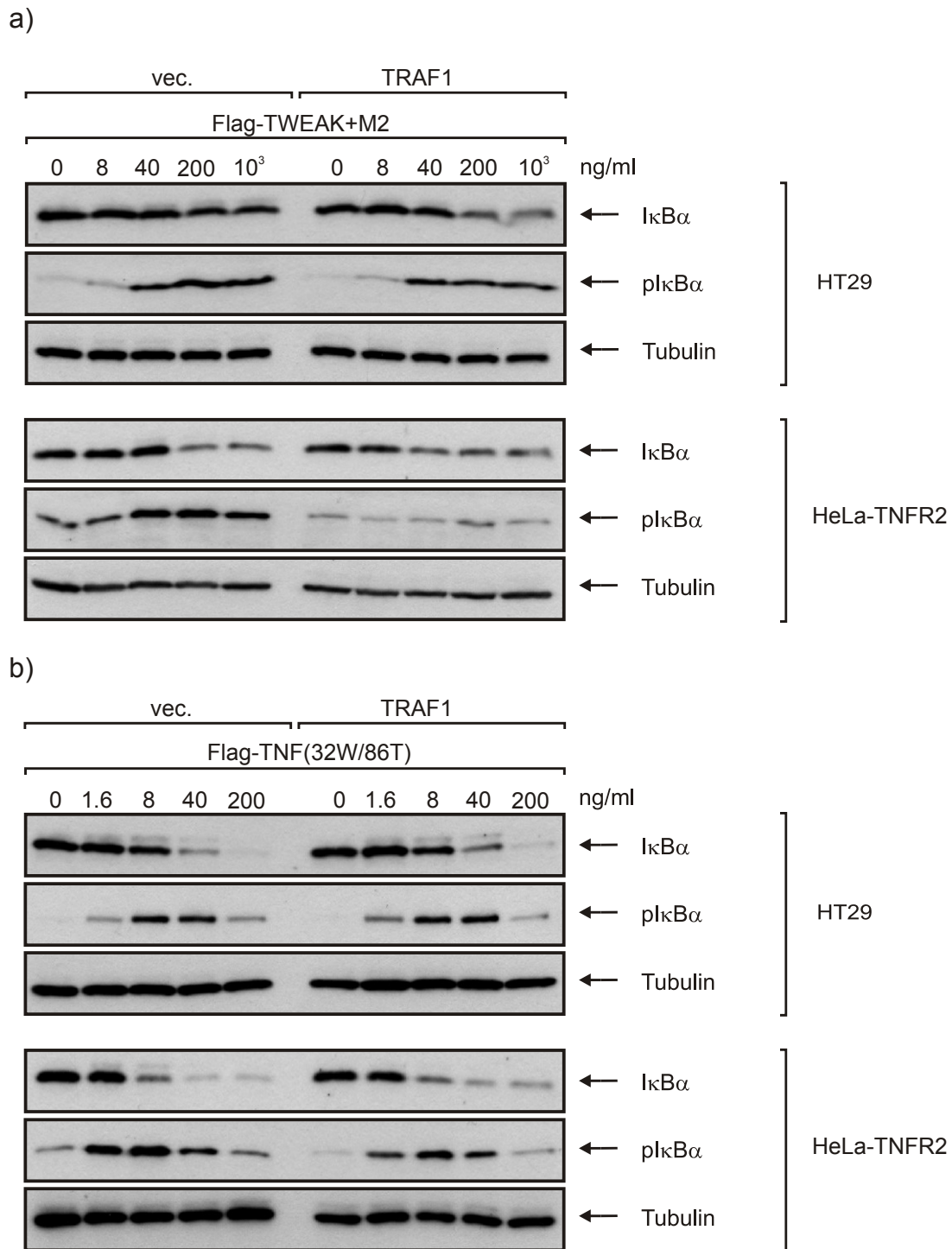


Abb. 16 TRAF1-Expression verstärkt die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges auf der Ebene der IκBα-Degradation durch oligomerisiertes TWEAK.

HeLa-TNFR2- und HT29-Transfektanten wurden mit den angegebenen Konzentrationen an oligomerisiertem TWEAK (a) bzw. einer TNFR1-spezifischen TNF-Mutante (b) für 30 min (a) bzw. 15 min (b) stimuliert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate auf die Degradation und Phosphorylierung von IκBα untersucht. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

Weiterhin erwies sich auch die Induktion des NF κ B-regulierten Zielgenes IL8, wie auch die Synthese eines Reporter-Plasmids, das unter der Kontrolle eines NF κ B-Promotors steht, als stärker induzierbar durch TWEAK in den TRAF1 exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 17). Sowohl auf der Ebene des Zielgenes IL8, als auch in den NF κ B-Reporter Experimenten zeigte sich aber keine signifikante Modulation des klassischen NF κ B-Signalweges nach einer TNFR1 Stimulation.

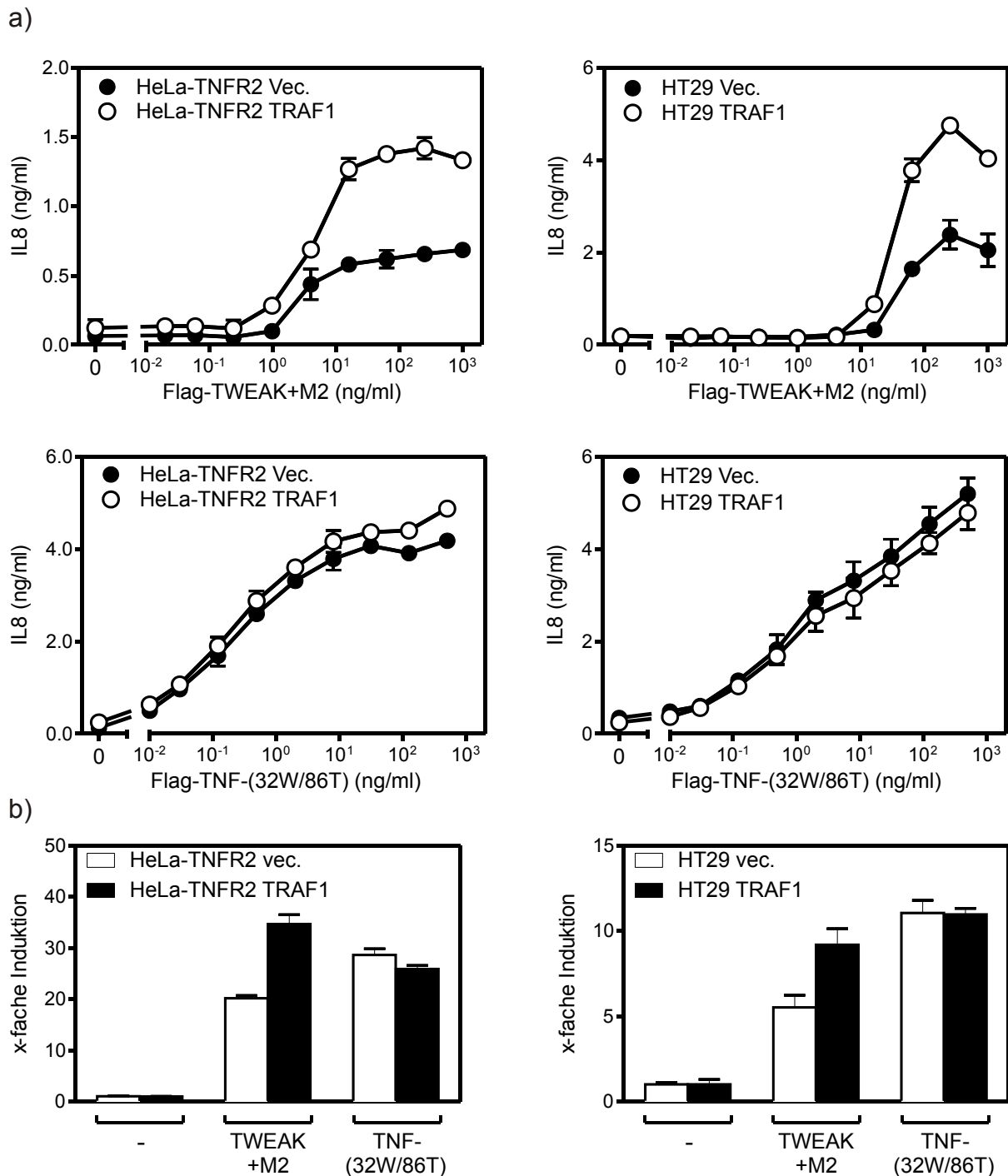


Abb. 17 Oligomerisiertes TWEAK, aber nicht TNF(32W/86T) zeigt verstärkte IL8-Produktion und höhere NF κ B-Promotoraktivität in TRAF1-exprimierenden Zellen

a) HeLa-TNFR2- bzw. HT29 TRAF1-Zellen und Vektor-Kontroll-Zellen wurden 6 h mit den angegebenen Konzentrationen an oligomerisiertem Flag-TWEAK stimuliert. Anschließend wurde die Menge des produzierten IL8 mittels ELISA bestimmt.

b) HeLa-TNFR2- bzw. HT29 TRAF1-Zellen und Vektor-Kontroll-Zellen wurden einen Tag vorher mittels Elektroporation mit pNF κ B-Gaussia-Reporter Plasmid (30 μ g) transfiziert. Am nächsten Tag wurden diese Zellen 18h mit 200 ng/ml (HT29-Zellen) und 62,5 ng/ml (HeLa-TNFR2-Zellen) an oligomerisiertem Flag-TWEAK stimuliert. Anschließend wurde das relative Verhältnis der NF κ B-Aktivität der nichtstimulierten zu den stimulierten Zellen im Luminometer ermittelt.

6.3.2 Endogenes TRAF1 inhibiert die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges in EA.hy926-Zellen

Um nun weiterhin nachzuweisen, dass auch endogen exprimiertes TRAF1 die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TWEAK begünstigt, haben wir im Folgenden EA.hy926-Zellen untersucht. Diese endotheliale Zelllinie zeichnet sich durch eine vergleichbar hohe basale TRAF1-Expression aus und ist zudem unserer Erfahrung nach effizient transfizierbar. Die Transfektion mit TRAF1 spezifischen siRNA-Oligonukleotiden führte zu einer deutlichen Reduktion des endogenen TRAF1-Levels (Abb. 18a). Wurden nun EA.hy926-Zellen, in denen die TRAF1-Expression mit TRAF1 spezifischen siRNA-Oligonukleotiden reprimiert wurde mit oligomerisiertem TWEAK stimuliert, so zeigte sich im Vergleich zu EA.hy926-Zellen, die mit Kontroll-siRNA-Oligonukleotiden behandelt wurden, eine deutliche Verzögerung der I κ B α -Degradation (Abb. 18b), als auch eine deutliche Reduzierung der IL8-Produktion (Abb. 18c). Daraus kann geschlossen werden, dass zumindest auch in EA.hy926-Zellen das endogen exprimierte TRAF1 einen positiven Effekt auf die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges hat. Es konnte also in insgesamt drei Zelltypen (HeLa-TNFR2, HT29, EA.hy-926) ein positiver modulatorischer Einfluss von TRAF1 auf die TWEAK/Fn14 vermittelte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges gezeigt werden.

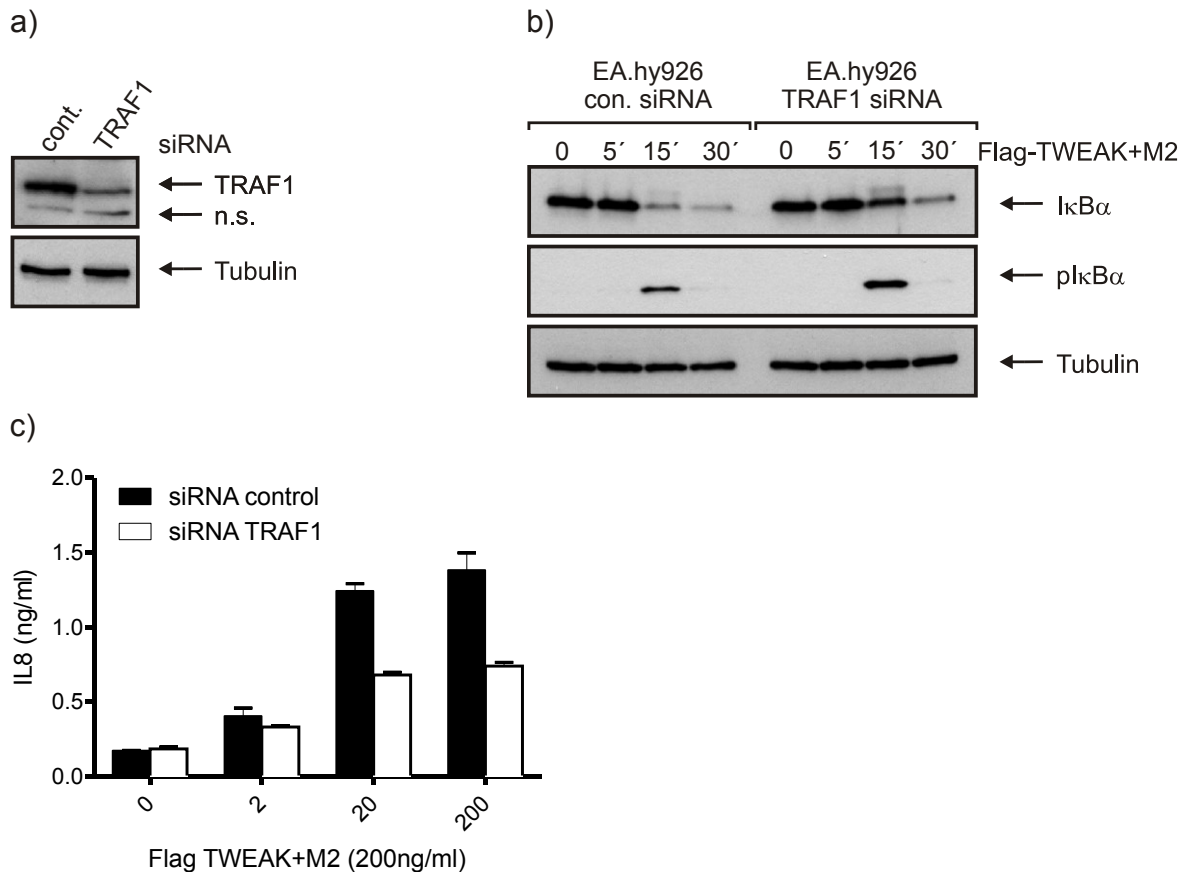


Abb. 18 Abschwächung der endogenen TRAF1-Expression durch TRAF1 spezifische siRNA-Oligonukleotide in EA.hy926-Zellen verstärkt die durch oligomerisiertes TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges

a) EA.hy926-Zellen wurden mit TRAF1 spezifischen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Nach 53 h wurde von diesen Zellen Gesamtzelllysate hergestellt, die mittels Western Blot auf die TRAF1-Expression untersucht wurden.

b) Die Zellen wurden 53 h nach der Transfektion mit oligomerisiertem Flag-TWEAK für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate hergestellt, die auf die Degradation und Phosphorylierung von I κ B α untersucht wurden. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

c) EA.hy926-Zellen aus a) und b) wurden für 6 h mit den angegebenen Konzentrationen an oligomerisiertem Flag-TWEAK stimuliert. Anschließend wurde die Menge des produzierten IL8 in Zellüberständen mittels ELISA bestimmt.

Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse könnte an dem Umstand liegen, dass das TRAF1 Molekül mit TRAF2 heteromere Komplexe bildet und diese Komplexe ähnlich gut wie TRAF2 Homotrimere an den TWEAK-Rezeptor rekrutieren, im Gegensatz zu letztgenannten jedoch nicht so stark degradiert werden. Diese Hypothese passt zu Befunden, die zeigen, dass die TRAF1-Expression mit einer geringeren TRAF2-Degradation einhergeht (Wicovsky et al., 2009a; Wicovsky et al., 2009b). Es sind jedoch zusätzliche Studien nötig, um diese Annahme letztendlich zu untermauern.

7 Diskussion

7.1 TWEAK und Fn14 modulieren die TNFR1-Signaltransduktion

„Tumor necrosis factor“ (TNF) das namensgebende Zytokin der TNF-Ligandenfamilie spielt in inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle (Karin und Lin, 2002). TNF kann sehr unterschiedliche biologische Wirkungen wie z.B. Induktion proinflammatorischer Zytokine, Zellproliferation, Differenzierung oder Zelltod auslösen (Hayden und Ghosh, 2008; Kovalenko und Wallach, 2006). Dabei werden die durch TNF ausgelösten Signale durch Bindung an die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 in die Zellen vermittelt. Die TNF-Rezeptoren können durch verschiedene Mechanismen miteinander kommunizieren.

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine TNFR2-vermittelte Depletion und Degradation des Adapterproteins TRAF2 (Fotin-Mleczek et al., 2002). Da das genannte Adapterprotein TRAF2 aber auch in der Signaltransduktion des TNFR1 eine wichtige Rolle spielt, hat die TNFR2-induzierte Depletion/Degradation des Moleküls Auswirkungen auf die TNFR1-vermittelten Signalwege. So führt die Vorstimulation des TNFR2 und die damit verbundene Depletion von TRAF2 dazu, dass nach Stimulation des TNFR1 der klassische NF κ B-Signalweg deutlich schlechter aktiviert wird. Dadurch werden die „entzündlichen Eigenschaften“ der TNFR1-Signaltransduktion reduziert. Weiterhin kann man in manchen Zellen nach der TNFR2-vermittelten Depletion von TRAF2 eine Sensitivierung der Zellen für die TNFR1-induzierte Apoptose beobachten. Letzteres rührt daher, dass TRAF2 notwendig ist, um die antiapoptotischen IAP-Proteine zum TNFR1 zu rekrutieren. Unter kostimulatorischen Bedingungen kommt es zwar zu einer Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose, jedoch läuft die TNFR1-vermittelte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges normal ab. Dies liegt daran, dass die Aktivierung des NF κ B-Signalweges durch TNFR1 schneller erfolgt als die durch den TNFR2-induzierte Depletion von TRAF2 (Fotin-Mleczek et al., 2002).

Vor dem dargelegten Hintergrund konnte nun in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation des Rezeptors Fn14, der wie der TNFR2 zur TNF-Rezeptorfamilie gehört und ebenso über keine Todesdomäne verfügt, aber mit

TRAF2 interagieren kann, nach Stimulation mit TWEAK zu einer starken Depletion oder auch Degradation von TRAF2 führen kann (Roos et al., 2010). Dementsprechend verhalten sich Zellen, die durch den Rezeptor Fn14 stimuliert wurden ähnlich zu solchen, in denen der TNFR2 aktiviert wurde. So sensitivieren beide Rezeptoren Zellen für die Induktion der TNFR1-vermittelten Apoptose bzw. inhibieren die TNFR1-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges sehr stark (Abb. 6, Abb. 10). Im Übrigen zeigte sich, dass die Verstärkung der TNFR1-vermittelten Apoptose durch TWEAK, wie auch im Falle des TNFR2, selektiv für die TNFR1-vermittelte Apoptose ist. Die Apoptoseinduktion wird nämlich nicht durch die TNFR1-verwandten Todesrezeptoren TRAILR1/2 und CD95 durch Kostimulation des Rezeptors Fn14 im wesentlichen verstärkt (Abb. 6). Dieser Befund passt gut zu der Annahme, dass sich der TNFR1/Fn14 „crosstalk“ auf der Ebene des TRAF2-Moleküls abspielt, da dieses in der Regulation der TRAILR1/2- bzw. CD95-induzierten Apoptose keine Rolle spielt (Abb. 19). Letzteres rührt daher, dass die Initiatorcaspase-8 mit dem Adapterprotein FADD interagiert, welches direkt an die genannten Todesrezeptoren binden kann, jedoch nicht direkt vom TNFR1 rekrutiert wird. Dieser braucht stattdessen ein weiteres Adapterprotein (TRADD), das ihn an den FADD-Caspase-8-Komplex koppelt. TRADD ist aber nun auch in der Lage einen protektiven Komplex zu rekrutieren, der aus TRAF2 und den Caspase-inhibitorischen E3-Ligasen cIAP1 und 2 besteht, so dass dieser Komplex nur im Falle des TNFR1-induzierten Zelltodes eine Rolle spielen kann, da er ja nicht an die Todesrezeptoren TRAILR1/2 und CD95 binden kann (Abb. 19).

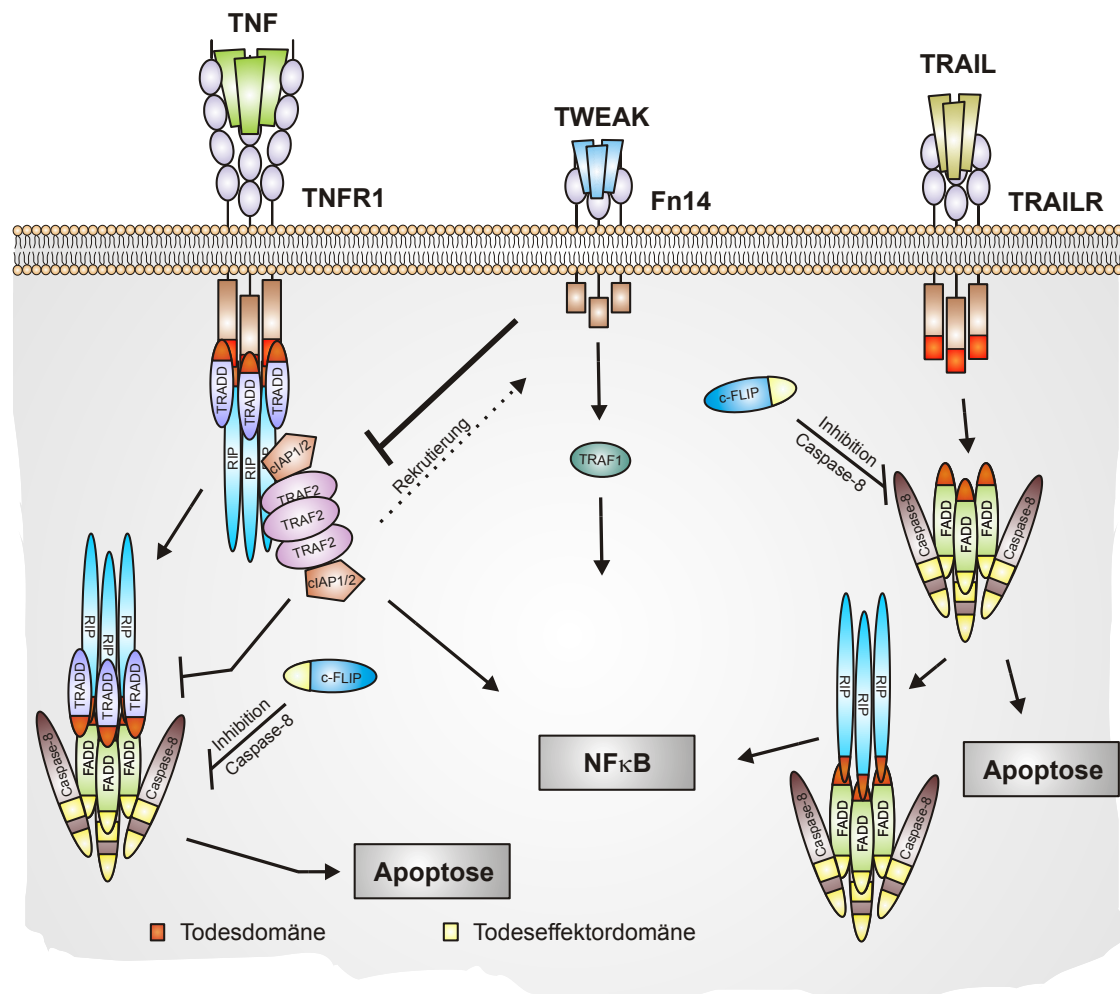


Abb. 19 Der TRAF2/cIAP Komplex inhibiert selektiv die TNFR1-induzierte Apoptose

In anderen Arbeiten unserer Gruppe haben sich lösliches TWEAK (sTWEAK) und membranständiges TWEAK (mTWEAK) interessanterweise bezüglich der TRAF2-Depletion und der Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose als wirkungsgleich erwiesen, unterschieden sich jedoch in der Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges (Roos et al., 2010; Wicovsky et al., 2009b). So aktiviert lösliches TWEAK den Fn14-vermittelten klassischen NFκB-Signalweg kaum (Abb. 11), wohingegen oligomerisiertes TWEAK, das die Wirkung von mTWEAK mimikriert, diesen Signalweg stark aktiviert (Abb. 12). Es ist daher naheliegend zu spekulieren, dass die Kombination sTWEAK und TNF, bzw. die Kombination mTWEAK und TNF unterschiedliche Wirkungen auf eine Zelle haben. Treffen sowohl lösliches TNF wie auch lösliches TWEAK auf eine Zelle, erwartet man im Vergleich zu einer Situation, in der nur TNF vorliegt, eine Abschwächung der Aktivität des klassischen NFκB-Signalweges. Dies sollte besonders ausgeprägt sein, wenn lösliches TWEAK früher

zu wirken beginnen kann als lösliches TNF und so eine Situation geschaffen wird, in der TRAF2 depletiert ist und TNF deshalb kaum die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges induzieren kann. TWEAK selbst trägt hierbei nicht oder nur sehr wenig zur Aktivierung dieses Signalweges bei. Es entsteht somit in der Summe der Effekt, dass TWEAK die entzündliche Aktivität von TNF inhibiert. Im Falle der Kostimulation mit sTNF und mTWEAK ist die Situation jedoch komplexer. Hier kommt es auf Grund der TRAF2-Depletion zwar dazu, dass mTWEAK die TNFR1-induzierte klassische NF κ B-Aktivierung inhibiert. Gleichzeitig kommt es aber durch die nun stärkere Fn14-vermittelte Aktivierung dieses Signalweges dazu, dass dieser inhibitorische Effekt kompensiert wird, so dass eine geringere Inhibition der entzündlichen Aktivität von TNF entsteht, oder sogar die entzündliche Antwort der Zelle in der Summe verstärkt wird. Die dargelegten Unterschiede in der Wirkung zwischen löslichem TWEAK und löslichem TNF bzw. membranständigen TWEAK und löslichem TNF könnten in vivo möglicherweise dazu beitragen, entzündliche Prozesse lokal zu beschränken. Da bekannt ist, dass sowohl TNF als auch TWEAK sehr früh in entzündlichen Prozessen produziert werden (Wajant et al., 2003) und das weitere entzündliche Geschehen regulieren, ist folgendes Szenario vorstellbar: Im Entzündungsherd werden Zellen aktiviert, die sowohl TNF produzieren als auch mTWEAK exprimieren, was zu einer starken klassischen NF κ B-Aktivierung und dadurch zur Ausschüttung einer Vielzahl von inflammatorischen Mediatoren führt. Proteolytisch prozessiertes sTWEAK kann sich aber auch gemeinsam mit TNF aus dem Gebiet der unmittelbaren Gewebeschädigung durch Diffusion entfernen und in Randbereichen des Entzündungsherdes daraufhin die proinflammatorischen Effekte von TNF inhibieren. Das Zentrum der Entzündung würde so von einem peripheren Bereich umgeben, in dem das entzündliche Potential von TNF durch den anti-inflammatorische Effekt von löslichem TWEAK attenuiert wird. Es könnte dadurch zu einer Begrenzung des entzündlichen Geschehens kommen.

7.2 TWEAK verstärkt den nekrotischen Zelltod

Todesrezeptoren, wie der TNFR1 können nicht nur apoptotischen, sondern auch nekrotischen Zelltod induzieren. Die Apoptoseinduktion beruht hierbei auf der FADD-

vermittelten Aktivierung von Caspase-8 (Abb. 8), wohingegen die Induktion von Nekrose unabhängig von Caspase-8 erfolgt und von der Aktivierung der RIP1-Kinase abhängt (Abb. 9). RIP1 kann mit dem verwandten Molekül RIP3 interagieren, welches wiederum eine sich selbst verstärkende Signalkette aus Radikal-Generierung und c-Jun Kinase (JNK) aktiviert, die dann das typische Erscheinungsbild nekrotischer Zellen induziert (Feng et al., 2007; Cho et al., 2009; Zhang et al., 2009). Da nun Caspase-8 RIP1 spaltet und dadurch inhibiert ist es in aller Regel so, dass eine Stimulation von Todesrezeptoren zur Induktion der Apoptose führt (Festjens et al., 2007). Allerdings kann es nach Caspase-8-Inhibition dann in RIP3-exprimierenden Zellen zur Aktivierung von Nekrose kommen (He et al., 2009). RIP3-negative Zellen werden daher durch Caspaseinhibitoren vor dem Todesrezeptor-induzierten Zelltod geschützt, wohingegen Zellen, die RIP3 exprimieren und in denen dadurch potentiell das nekrotische Programm ablaufen kann, auf eine Inhibition von Caspasen mit einer verstärkten Zelltodinduktion über den nekrotischen Signalweg reagieren. Interessanterweise haben wir nun beobachtet, dass TWEAK den TNF-induzierten Zelltod auch in HT29-Zellen verstärkt. Von HT29-Zellen ist bekannt, dass in diesen die Induktion von Nekrose durch Todesrezeptoren besonders effektiv erfolgt (Wilson und Browning, 2002). In der Tat zeigte sich in HT29-Zellen nach Behandlung mit Caspaseinhibitoren eine vollständige Blockade der TNF-induzierten Caspaseaktivierung. Diese Behandlung war jedoch nicht ausreichend, um diese Zellen vor dem TNF-induzierten Zelltod zu schützen, bzw. dieser wurde sogar noch etwas verstärkt. Stimuliert man HT29-Zellen nun zusätzlich mit TWEAK, so führt dies zu einer Verstärkung des TNF-induzierten Zelltodes und zwar auch dann, wenn die Aktivierung von Caspasen in diesen Zellen durch Inhibitoren vollständig blockiert ist (Abb. 9). TWEAK kann also auch den durch Todesrezeptoren induzierten nekrotischen Zelltod verstärken. Welche Mechanismen daran beteiligt sind, ist jedoch noch unklar. Es ist allerdings offensichtlich, dass der TWEAK-induzierte Verstärkungsmechanismus der Nekrose im Detail verschieden sein muss von dem Mechanismus, der zur Verstärkung der TNFR1-induzierten Caspase-8 Aktivierung führt. Im letzteren Fall sorgen die TRAF2-assoziierten IAP-Proteine dafür, dass es zu einer verminderten Caspaseaktivierung kommt. Da die TRAF2-assoziierten IAP-Proteine im Kontext des TNFR1-Signalkomplexes RIP1 durch K63-verknüpfte Ketten ubiquitinylieren (Wertz und Dixit, 2010), ist es denkbar, dass diese auch für die Inhibition des nekrotischen Signalweges verantwortlich sind.

Die Depletion von TRAF2 und IAPs durch TWEAK würde dann dazu führen, dass RIP1 nicht mehr ubiquitinyliert wird und in diesem nicht modifizierten Zustand besser in der Lage ist mit RIP3 zu interagieren. Somit könnte erklärt werden, dass die Depletion von TRAF2 und IAP-Proteinen sowohl zur Verstärkung des apoptotischen Zelltodes, wie auch zur Verstärkung des nekrotischen Signalweges führt. Dieses Konzept muss jedoch noch in zukünftigen Arbeiten verifiziert werden.

7.3 TRAF1 verstärkt die TWEAK-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges

Die Ähnlichkeit zwischen Fn14 und TNFR2 beschränkt sich nicht nur auf deren Zusammenspiel mit der TNFR1-Signaltransduktion. So wurde in unserer Arbeitsgruppe gefunden, dass das TRAF1-Molekül die Degradation von TRAF2 durch den TNFR2 abschwächt und dadurch zu einer Verstärkung der TNFR2-vermittelten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges führt (Wicovsky et al., 2009a). Dieselbe Beobachtung konnte nun auch in dieser Arbeit mit mTWEAK gemacht werden. So wurde in Anwesenheit von TRAF1 die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch mTWEAK deutlich verstärkt (Abb. 17). Dabei konnte eine Aktivierung erreicht werden, die beinahe vergleichbar war zu der, die durch den starken proinflammatorischen Induktor TNF induziert werden kann. Dieser verstärkende Effekt des TRAF1-Moleküls konnte in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls für die schwache, aber dennoch nachweisbare Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch sTWEAK gezeigt werden (unveröffentlichte Daten). Die verstärkende Wirkung ist also nicht spezifisch für oligomerisiertes TWEAK, sondern kann als allgemeiner Effekt auf die TWEAK-induzierte NF κ B-Aktivierung betrachtet werden. Es scheint daher ein generelles Prinzip zu sein, dass Rezeptoren wie z.B. TNFR2 und Fn14, die effektiv TRAF2 rekrutieren und somit aus dem Zytoplasma entfernen bzw. degradieren, die TNFR1-vermittelte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges inhibieren. Gleichzeitig aktivieren diese Rezeptoren aber selbst, auf Grund der TRAF2 Degradation, diesen Signalweg kaum. TRAF1 kann diese Situation nun insofern modulieren, dass es zwar noch immer zu einer deutlichen TRAF2 Depletion kommt und somit immer noch zu einer Inhibition der TNFR1-

induzierten NF κ B-Aktivierung, aber auf Grund der reduzierten Degradation von TRAF2 durch die TRAF2-interagierenden Rezeptoren diese selbst in die Lage versetzt werden, den klassischen NF κ B-Signalweg zu aktivieren. Zusammengefasst kann also festgestellt werden, dass das Zusammenspiel von TNFR1, TRAF1, TRAF2 und TRAF2-interagierenden Rezeptoren das Vermögen von Zellen bestimmen entzündliche Mediatoren freizusetzen, die durch NF κ B-Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Die dargelegte Situation wird noch komplexer durch weitere Regulationsmechanismen, die sich mit den hier dargelegten Regulationsprinzipien überlagern. So z.B. dem Umstand, dass der NF κ B-Signalweg die Gene für TNF und TRAF1 reguliert und dadurch die wichtigsten Moleküle in dem in dieser Arbeit untersuchten Regulationssystem durch positive und negative „feedback“-Mechanismen miteinander verknüpft sind.

8 Literaturverzeichnis

Arch, R. H., R. W. Gedrich, und C. B. Thompson. 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 12: 2821-2830.

Armitage, R. J. 1994. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 6: 407-413.

Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2: 420-430.

Bagnoli, M., S. Canevari, und D. Mezzanzanica. 2010. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 210-213.

Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.

Banner, D. W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher, und W. Lesslauer. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73: 431-445.

Barnhart, B. C., und M. E. Peter. 2003. The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell* 114: 148-150.

Baud, V., und M. Karin. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11: 372-377.

Bazan, J. F. 1993. Emerging families of cytokines and receptors. *Curr Biol* 3: 603-606.

Betts, J. C., und G. J. Nabel. 1996. Differential regulation of NF-kappaB2(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol Cell Biol* 16: 6363-6371.

Beutler, B., D. Greenwald, J. D. Hulmes, M. Chang, Y. C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, und A. Cerami. 1985a. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316: 552-554.

Beutler, B., J. Mahoney, N. Le Trang, P. Pekala, und A. Cerami. 1985b. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 161: 984-995.

Black, R. A. 2002. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1-5.

Bodmer, J. L., P. Schneider, und J. Tschopp. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27: 19-26.

- Brown, K. D., E. Claudio, und U. Siebenlist. 2008. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10: 212.
- Brown, S. A., C. M. Richards, H. N. Hanscom, S. L. Feng, und J. A. Winkles. 2003. The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *Biochem J* 371: 395-403.
- Bruns, P. 1868. Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste. *Beitrag Klinischer Chirurgie* 3: 443-446.
- Burkly, L. C., J. S. Michaelson, K. Hahm, A. Jakubowski, und T. S. Zheng. 2007. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 40: 1-16.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, und B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-3670.
- Chai, J., C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang, und Y. Shi. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406: 855-862.
- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, und M. J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288: 2351-2354.
- Chan, F. K., und M. J. Lenardo. 2000. A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30: 652-660.
- Chen, F. E., und G. Ghosh. 1999. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18: 6845-6852.
- Chen, G., P. Cao, und D. V. Goeddel. 2002. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9: 401-410.
- Cheung, H. H., N. Lynn Kelly, P. Liston, und R. G. Korneluk. 2006. Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs. *Exp Cell Res* 312: 2347-2357.
- Cheung, H. H., S. Plenchette, C. J. Kern, D. J. Mahoney, und R. G. Korneluk. 2008. The RING domain of cIAP1 mediates the degradation of RING-bearing inhibitor of apoptosis proteins by distinct pathways. *Mol Biol Cell* 19: 2729-2740.
- Chicheportiche, Y., P. R. Bourdon, H. Xu, Y. M. Hsu, H. Scott, C. Hession, I. Garcia, und J. L. Browning. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272: 32401-32410.
- Cho, Y. S., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T. D. Ray, M. Guildford, und F. K. Chan. 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137: 1112-1123.

- Chung, H. R., U. Schafer, H. Jackle, und S. Bohm. 2002. Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C2H2 zinc-finger genes in *Drosophila*. *EMBO Rep* 3: 1158-1162.
- Coley, W. B. 1891. Contribution to the knowledge of Sarcoma. *Annals of Surgery* 14: 199-220.
- Dadgostar, H., und G. Cheng. 1998. An intact zinc ring finger is required for tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated nuclear factor-kappaB activation but is dispensable for c-Jun N-terminal kinase signaling. *J Biol Chem* 273: 24775-24780.
- Dejardin, E. 2006. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 72: 1161-1179.
- Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, und Z. J. Chen. 2000. Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103: 351-361.
- Donohue, P. J., C. M. Richards, S. A. Brown, H. N. Hanscom, J. Buschman, S. Thangada, T. Hla, M. S. Williams, und J. A. Winkles. 2003. TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 594-600.
- Ea, C. K., L. Deng, Z. P. Xia, G. Pineda, und Z. J. Chen. 2006. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22: 245-257.
- Echtenacher, B., D. N. Mannel, und L. Hultner. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381: 75-77.
- Eissner, G., S. Kirchner, H. Lindner, W. Kolch, P. Janosch, M. Grell, P. Scheurich, R. Andreesen, und E. Holler. 2000. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 164: 6193-6198.
- Feng, S., Y. Yang, Y. Mei, L. Ma, D. E. Zhu, N. Hoti, M. Castanares, und M. Wu. 2007. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal* 19: 2056-2067.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis, und P. Vandenabeele. 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* 14: 400-410.
- Fotin-Mleczeck, M., F. Henkler, D. Samel, M. Reichwein, A. Hausser, I. Parmryd, P. Scheurich, J. A. Schmid, und H. Wajant. 2002. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 115: 2757-2770.
- Freemont, P. S. 2000. RING for destruction? *Curr Biol* 10: R84-87.

- Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon, und et al. 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370: 555-557.
- Golks, A., D. Brenner, C. Fritsch, P. H. Krammer, und I. N. Lavrik. 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 14507-14513.
- Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, und P. Scheurich. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802.
- Ha, H., D. Han, und Y. Choi. 2009. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol* Chapter 11: Unit11 19D.
- Han, S., K. Yoon, K. Lee, K. Kim, H. Jang, N. K. Lee, K. Hwang, und S. Young Lee. 2003. TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF-kappa B through TNF receptor-associated factors. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 789-796.
- Hayden, M. S., und S. Ghosh. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344-362.
- He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, und X. Wang. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137: 1100-1111.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Heusch, M., L. Lin, R. Geleziunas, und W. C. Greene. 1999. The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene* 18: 6201-6208.
- Hinds, M. G., R. S. Norton, D. L. Vaux, und C. L. Day. 1999. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 6: 648-651.
- Holcik, M., und R. G. Korneluk. 2001. XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 550-556.
- Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan, und D. V. Goeddel. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84: 299-308.
- Hunter, A. M., E. C. LaCasse, und R. G. Korneluk. 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 12: 1543-1568.
- Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng, und Z. J. Chen. 2004. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15: 535-548.
- Karin, M. 1999. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867-6874.

- Karin, M., und A. Lin. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-227.
- Kovalenko, A., und D. Wallach. 2006. If the prophet does not come to the mountain: dynamics of signaling complexes in NF-kappaB activation. *Mol Cell* 22: 433-436.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer, und S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276: 20633-20640.
- LaCasse, E. C., S. Baird, R. G. Korneluk, und A. E. MacKenzie. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3259.
- LaCasse, E. C., D. J. Mahoney, H. H. Cheung, S. Plenchette, S. Baird, und R. G. Korneluk. 2008. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27: 6252-6275.
- Leverkus, M., M. Neumann, T. Mengling, C. T. Rauch, E. B. Brocker, P. H. Krammer, und H. Walczak. 2000. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res* 60: 553-559.
- Liu, H., Y. C. Su, E. Becker, J. Treisman, und E. Y. Skolnik. 1999. A Drosophila TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr Biol* 9: 101-104.
- Locksley, R. M., N. Killeen, und M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
- Loetscher, H., D. Stueber, D. Banner, F. Mackay, und W. Lesslauer. 1993. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 268: 26350-26357.
- Luo, J. L., H. Kamata, und M. Karin. 2005. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 115: 2625-2632.
- Mali, B., und U. Frank. 2004. Hydroid TNF-receptor-associated factor (TRAF) and its splice variant: a role in development. *Mol Immunol* 41: 377-384.
- Marsters, S. A., J. P. Sheridan, R. M. Pitti, J. Brush, A. Goddard, und A. Ashkenazi. 1998. Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 8: 525-528.
- Martin, S. J. 2001. Dealing the CARDs between life and death. *Trends Cell Biol* 11: 188-189.
- Micheau, O., und J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-190.
- Naismith, J. H., und S. R. Sprang. 1998. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23: 74-79.

- Nakayama, M., K. Ishidoh, N. Kayagaki, Y. Kojima, N. Yamaguchi, H. Nakano, E. Kominami, K. Okumura, and H. Yagita. 2002. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J Immunol* 168: 734-743.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg, and T. Maniatis. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78: 773-785.
- Petersen, S. L., L. Wang, A. Yalcin-Chin, L. Li, M. Peyton, J. Minna, P. Harran, and X. Wang. 2007. Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell* 12: 445-456.
- Qing, G., and G. Xiao. 2005. Essential role of IkappaB kinase alpha in the constitutive processing of NF-kappaB2 p100. *J Biol Chem* 280: 9765-9768.
- Regnier, C. H., C. Tomasetto, C. Moog-Lutz, M. P. Chenard, C. Wendling, P. Basset, and M. C. Rio. 1995. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* 270: 25715-25721.
- Roos, C., A. Wicovsky, N. Muller, S. Salzmann, T. Rosenthal, H. Kalthoff, A. Trauzold, A. Seher, F. Henkler, C. Kneitz, and H. Wajant. 2010. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappaB pathway. *J Immunol* 185: 1593-1605.
- Rothe, M., M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres, and D. V. Goeddel. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83: 1243-1252.
- Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel, and D. V. Goeddel. 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78: 681-692.
- Saitoh, T., M. Nakayama, H. Nakano, H. Yagita, N. Yamamoto, and S. Yamaoka. 2003. TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 278: 36005-36012.
- Salvesen, G. S., and C. S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 401-410.
- Saurin, A. J., K. L. Borden, M. N. Boddy, and P. S. Freemont. 1996. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 21: 208-214.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 1541-1548.
- Schwarz, E. M., R. J. Looney, and R. J. O'Keefe. 2000. Anti-TNF-alpha therapy as a clinical intervention for periprosthetic osteolysis. *Arthritis Res* 2: 165-168.
- Schwenzer, R., K. Siemienski, S. Liptay, G. Schubert, N. Peters, P. Scheurich, R. M. Schmid, and H. Wajant. 1999. The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand

- family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 274: 19368-19374.
- Shi, C. S., und J. H. Kehrl. 2003. Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem* 278: 15429-15434.
- Siegmund, D., P. Hadwiger, K. Pfizenmaier, H. P. Vornlocher, und H. Wajant. 2002. Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol Med* 8: 725-732.
- Silke, J., T. Kratina, D. Chu, P. G. Ekert, C. L. Day, M. Pakusch, D. C. Huang, und D. L. Vaux. 2005. Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16182-16187.
- Smith, C. A., T. Farrah, und R. G. Goodwin. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76: 959-962.
- Sun, C., M. Cai, A. H. Gunasekera, R. P. Meadows, H. Wang, J. Chen, H. Zhang, W. Wu, N. Xu, S. C. Ng, und S. W. Fesik. 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401: 818-822.
- Taylor, P. C. 2001. Anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Mol Biotechnol* 19: 153-168.
- Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinel, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter, und J. Tschopp. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386: 517-521.
- Van Assche, G., und P. Rutgeerts. 2000. Anti-TNF agents in Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 103-111.
- Varfolomeev, E., T. Goncharov, A. V. Fedorova, J. N. Dynek, K. Zobel, K. Deshayes, W. J. Fairbrother, und D. Vucic. 2008. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 283: 24295-24299.
- Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp, und S. Miyamoto. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9: 2723-2735.
- Vince, J. E., D. Chau, B. Callus, W. W. Wong, C. J. Hawkins, P. Schneider, M. McKinlay, C. A. Benetatos, S. M. Condon, S. K. Chunduru, G. Yeoh, R. Brink, D. L. Vaux, und J. Silke. 2008. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol* 182: 171-184.
- Wajant, H. 2003. Targeting the FLICE Inhibitory Protein (FLIP) in cancer therapy. *Mol Interv* 3: 124-127.

- Wajant, H., E. Haas, R. Schwenzler, F. Muhlenbeck, S. Kreuz, G. Schubert, M. Grell, C. Smith, und P. Scheurich. 2000. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem* 275: 24357-24366.
- Wajant, H., F. Muhlenbeck, und P. Scheurich. 1998. Identification of a TRAF (TNF receptor-associated factor) gene in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Evol* 47: 656-662.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, und P. Scheurich. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65.
- Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, und Z. J. Chen. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412: 346-351.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, und A. S. Baldwin, Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683.
- Waterhouse, N. J., J. E. Ricci, und D. R. Green. 2002. And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84: 113-121.
- Weiss, T., M. Grell, K. Siemienski, F. Muhlenbeck, H. Durkop, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, und H. Wajant. 1998. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J Immunol* 161: 3136-3142.
- Wertz, I. E., und V. M. Dixit. 2010. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ* 17: 14-24.
- Wicovsky, A., F. Henkler, S. Salzmann, P. Scheurich, C. Kneitz, und H. Wajant. 2009a. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28: 1769-1781.
- Wicovsky, A., S. Salzmann, C. Roos, M. Ehrenschwender, T. Rosenthal, D. Siegmund, F. Henkler, F. Gohlke, C. Kneitz, und H. Wajant. 2009b. TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ* 16: 1445-1459.
- Wiley, S. R., L. Cassiano, T. Lofton, T. Davis-Smith, J. A. Winkles, V. Lindner, H. Liu, T. O. Daniel, C. A. Smith, und W. C. Fanslow. 2001. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity* 15: 837-846.
- Wilson, C. A., und J. L. Browning. 2002. Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 9: 1321-1333.
- Wilson, N. S., V. Dixit, und A. Ashkenazi. 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 10: 348-355.
- Winkles, J. A. 2008. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* 7: 411-425.

- Wu, C. J., D. B. Conze, X. Li, S. X. Ying, J. A. Hanover, und J. D. Ashwell. 2005. TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J* 24: 1886-1898.
- Wyzgol, A., N. Muller, A. Fick, S. Munkel, G. U. Grigoleit, K. Pfizenmaier, und H. Wajant. 2009. Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol* 183: 1851-1861.
- Xiao, G., E. W. Harhaj, und S. C. Sun. 2001. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7: 401-409.
- Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S. T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H. E. Kirk, R. J. Kay, und A. Israel. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93: 1231-1240.
- Yin, X. M. 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369: 7-19.
- Zandi, E., D. M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, und M. Karin. 1997. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91: 243-252.
- Zapata, J. M., S. Matsuzawa, A. Godzik, E. Leo, S. A. Wasserman, und J. C. Reed. 2000. The Drosophila tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with Pelle and regulates NFkappaB activity. *J Biol Chem* 275: 12102-12107.
- Zhang, D. W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B. J. Lu, S. C. Lin, M. Q. Dong, und J. Han. 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325: 332-336.
- Zhang, G. 2004. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol* 14: 154-160.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (millionster Teil, 10 ⁻⁶)
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AITR	activation induced TNF receptor, TNFRSF18
AITRL	AITR Ligand, TNFSF18
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BIR	baculovirus internal repeat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CARD	caspase-recruitment domain
Caspase	cysteinyll aspartat specific proteinase
CD	cluster of differentiation
CD27	Tp55, TNFRSF7
CD27L	CD27 Ligand, CD70, TNFSF7
CD40	TNFRSF5
CD40L	CD40 Ligand, CD154, TNFSF5
CHX	Cyclohexamid
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase, alkalische Phosphatase
cm ²	Quadratcentimeter
CRD	cystein-rich domain
Da	Dalton
DcR1	decoy receptor 1, TRAILR3, TNFRSF10c
DcR2	decoy receptor 2, TRAILR4, TNFRSF10d
DD	death domain, Todesdomäne
DED	death effector domain, Todeseffektordomäne

DISC	death inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR3	death receptor 3
DR4	death receptor 4, TRAILR1, TNFRSF10a
DR5	death receptor 5, TRAILR2, TNFRSF10b
DR6	death receptor 6
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas associating protein with a death domain
Fas	FS7-associated cell surface antigen, CD95, Apo1, TNFRSF6
FasL	Fas Ligand, Apo1L, CD95L, CD178, TNFSF6
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FLICE	FADD-like ICE, Caspase-8
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
Fn14	fibroblast growth factor-inducible 14
GITR	glucocorticoid induced TNF receptor, TNFRSF18
GITRL	GITR Ligand, TL6, TNFSF18
h	Stunde(n)
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HVEM	Herpesvirus entry mediator
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
IKK	inhibitor of kappaB kinase
IL	Interleukin
I κ B α	inhibitor of kappa B α
JNK	c-Jun N-terminale Kinase, SAPK, stress-activated protein kinase
k	Kilo, tausend
l	Liter
LB	lysogeny broth (Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien)
LPS	Lipopolysaccharid

LT $\alpha\beta_2$	Lymphotoxin-alfa-beta 2
LT β -R	Lymphotoxin beta Rezeptor
m	milli (tausendster Teil; 10 ⁻³)
M	molar (Mol/Liter)
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase
min	Minute(n)
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
n	nano (milliardster Teil, 10 ⁻⁹)
NF κ B	nuclear factor kappa B
NIK	NF κ B-inducing kinase
NLS	nuclear localization sequence
OD	optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
OX40	CD134, ACT35, TNFRSF4
OX40L	OX40 Ligand, gp34, TNFSF4
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
RHD	Rel homology domain
RING	really interesting new gene
RIP	receptor interacting protein 1
rpm	rounds/revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TAB2	TAK1 binding protein-2
TAK1	transforming growth factor- β activated kinase-1
TBS	Tris buffered Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
THD	TNF homology domain
TNF	Tumornekrosefaktor, TNFSF2
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor, TNFRSF1
TRADD	TNFR1 associated death domain
TRAF	TNF receptor associated factor

TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand, Apo2L, TNFSF10
TRAILR1	TRAIL Rezeptor, DR 4 TNFRSF10a
TRAILR2	TRAIL Rezeptor, DR 5, TNFRSF10b
TRAILR3	TRAIL Rezeptor, DcR 1, TNFRSF10c
TRAILR4	TRAIL Rezeptor, DcR 2, TNFRSF10d
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
u.a.	unter anderem, und andere
z.B.	zum Beispiel
z-VAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton (pan-Caspaseinhibitor)

9.2 Publikationen

Wicovsky, A., S. Salzmann, C. Roos, M. Ehrenschwender, T. Rosenthal, D. Siegmund, F. Henkler, F. Gohlke, C. Kneitz, und H. Wajant. 2009. TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ* 16: 1445-1459.

Wicovsky, A., F. Henkler, S. Salzmann, P. Scheurich, C. Kneitz, und H. Wajant. 2009. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28: 1769-1781.

Roos, C., A. Wicovsky, N. Muller, S. Salzmann, T. Rosenthal, H. Kalthoff, A. Trauzold, A. Seher, F. Henkler, C. Kneitz, und H. Wajant. 2010. Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappaB pathway. *J Immunol* 185: 1593-1605.

