



Apoptoseregulation durch TNF im Multiplen Myelom

Regulation of apoptosis via TNF in multiple myeloma

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Hilka Rauert

aus

Papenburg

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jörg Schultz

1. Betreuer: Prof. Dr. Harald Wajant

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

3. Betreuer: Prof. Dr. Ralf C. Bargou

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Apoptoseregulation durch TNF im Multiplen Myelom“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg,.....

Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Regulation of apoptosis via TNF in multiple myeloma” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,.....

Date

Signature

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. September 2008 bis 17. August 2012 in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. Harald Wajant für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, seine hilfreichen Anregungen und die weiterführenden Diskussionen bedanken, welche zum Gelingen dieser Arbeit unerlässlich waren.

Prof. Dr. Thomas Müller möchte ich danken für die Übernahme des Zweitgutachtens und die freundliche Betreuung meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf C. Bargou bedanken, der als Drittgutachter meine Arbeit betreut hat.

Ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Molekularen Inneren Medizin die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet haben. Sie haben mich stets unterstützt, waren bei Fragen oder Problemen immer ansprechbar und haben mit der freundlichen Atmosphäre für eine gute Zusammenarbeit gesorgt.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern möchte ich danken, weil ich mich immer blind auf sie verlassen kann und sie bei Höhen und Tiefen stets mein Rückhalt sind.

Auch möchte ich mich bei Rita und Edgar bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung ich nicht einen so schönen Rückzugsort hätte.

Der größte Dank aber gilt meinem Monster und meinem Scheusal, Eure Liebe hat mich motiviert und gestärkt. *Ich liebe Euch.*

Für Sam

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Die Liganden der TNF-Familie	10
1.2	Die Rezeptoren der TNF-Familie.....	12
1.3	Die Interaktion zwischen TNF-Liganden und TNF-Rezeptoren	13
1.3.1	Die Zelltodinduktion	13
1.3.2	Aktivierung des NF κ B-Systems	17
1.3.2.1	NF κ B-regulierte Genexpression	20
1.3.3	TNF und die Interaktion mit TNFR2	21
1.4	Das Multiple Myelom	22
1.4.1	Die Rolle des NF κ B-Systems im Multiplen Myelom	23
1.5	Ziel der Arbeit	24
2	Materialien	25
2.1	Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien	25
2.1.1	Enzyme	26
2.1.2	Oligonukleotide	26
2.2	Antikörper und Antiseren	27
2.3	Zellen.....	28
2.3.1	Prokaryotische Zellen	28
2.3.2	Eukaryotische Zellen.....	28
2.4	Fusionsproteine/Plasmide	28
2.5	Verbrauchsmaterial und Geräte	29
2.6	Lösungen und Puffer	30
2.7	Kommerzielle Kits.....	32

3	Methoden.....	33
3.1	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien	33
3.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	33
3.1.2	Konservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen	33
3.2	Zytotoxizitätsassays	34
3.3	Bestimmung der IL8-Produktion mittels ELISA.....	34
3.4	Herstellung von Zelllysaten	35
3.4.1	Gesamtzelllysate.....	35
3.4.2	Zytoplasma- und Kernlysate	35
3.5	Western Blot.....	35
3.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
3.5.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	36
3.5.3	Immundetektion	36
3.6	Durchflusszytometrie	37
3.7	Ligand-Bindungsstudien	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Spezifische Stimulation von TNFR1 und TNFR2.....	39
4.2	TNFR2-Stimulation aktiviert den alternativen NF κ B-Signalweg	41
4.3	TNF-Rezeptor-Expression auf Myelomzellen	45
4.4	TNF reguliert den TRAIL- und CD95L-induzierten Zelltod in Myelomzellen unterschiedlich	49
4.5	TNF sensitiviert Myelomzellen für den CD95L-induzierten Zelltod durch TNFR1-vermittelte CD95-Hochregulation.....	53
4.6	TNFR2 reguliert den TNFR1-vermittelten Zelltod	60
5	Diskussion.....	62

5.1	TNFR2 vermittelt die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges	62
5.2	Das NF κ B-System im Multiplen Myelom	63
5.2.1	TNF reguliert den extrinsischen Signalweg der Apoptose in Myelomzellen	64
6	Zusammenfassung	69
7	Summary	71
8	Literaturverzeichnis.....	72
9	Anhang	82
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	82
9.2	Publikationen	87
9.3	Lebenslauf	88

1 Einleitung

Die Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)- und der TNF-Rezeptor (TNFR)-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung und Funktion des Immunsystems sowie der lymphoiden Organogenese. Die Signalwege, welche durch die TNF- und TNFR-Familie reguliert werden, sind sehr unterschiedlich und beeinflussen unter anderem Zellproliferation, Zellüberleben, Differenzierung und Apoptose (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Die Liganden der TNF-Familie interagieren mit einem oder mehreren Rezeptortypen der TNFR-Familie und können verschiedene Zellantworten induzieren.

1.1 Die Liganden der TNF-Familie

Das bekannteste und prototypische Mitglied der phylogenetisch konservierten TNF-Familie ist das pleiotrope Zytokin TNF. Es ist wie die meisten anderen Mitglieder der TNF-Familie ein TypII-Transmembranprotein (N-Terminus intrazellulär), kann aber nach proteolytischer Spaltung ebenfalls als lösliches Protein vorliegen. Ebenso verhalten sich die anderen Vertreter der TNF-Familie, mit Ausnahme von $LT\alpha$ (*lymphotoxin alpha*) und TL1A (*TNF ligand-related molecule 1*), welche keine Transmembrandomäne besitzen und daher nur löslich vorkommen (Idriss und Naismith, 2000; Bodmer *et al.*, 2002). Sowohl die löslichen als auch die membranständigen Formen der TNF-Liganden können an ihre Rezeptoren binden und liegen als nicht kovalent verbundene Trimere vor. Der trimere Aufbau wird durch die TNF-Homologie-Domäne (THD) vermittelt, deren Aminosäuresequenz zwischen den Liganden der TNF-Familie zu etwa 25 - 30 % homolog ist. Die THD ist auch für die Bindung an die TNF-Rezeptoren verantwortlich (Bodmer *et al.*, 2002). Die etwa 150 Aminosäuren umfassende THD liegt carboxyterminal, also extrazellulär, und formt zwei β -Faltblätter, welche eine *jelly roll*-Topologie bilden. Zwischen der THD und der Transmembrandomäne liegt eine *stalk*-Region. Diese Region trägt typischerweise eine Erkennungssequenz für Proteasen (z. B. Metalloproteasen, Matrylisin oder Furin), welche die membranständigen Proteine prozessieren und somit lösliche Liganden freisetzen (Bodmer *et al.*, 2002). Die Stimulation mit membranständigen trimeren Liganden führt immer zu einer starken TNF-Rezeptoraktivierung. TNF-Rezeptoren unterscheiden sich jedoch in ihrer Fähigkeit, von löslichen Ligandentrimeren aktiviert zu werden. So wird eine Gruppe von TNF-Rezeptoren durch lösliche Liganden aktiviert, eine andere Gruppe von TNF-Rezeptoren hingegen nicht oder nur sehr schwach. Beispielsweise ist CD95 (*apoptosis-mediating surface antigen FAS*) kaum in der Lage, von seinem löslichen trimeren Liganden CD95L aktiviert zu werden.

Allerdings zeigten funktionelle Studien, dass eine Oligomerisierung die Aktivität der löslichen trimeren Liganden massiv steigern kann (Müller *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2009; Wyzgol *et al.*, 2009; Roos *et al.*, 2010). Aufgrund kovalenter Verknüpfung der THDs des CD95L (*apoptosis-mediating surface antigen FAS ligand*) mit der Fc-Domäne des humanen Immunglobulins G1 entsteht z. B. ein CD95L-Hexamer, das den CD95-Rezeptor aktiviert und Apoptose induziert (Holler *et al.*, 2003).

Zur Familie der humanen TNF-Liganden gehören bis heute 19 Moleküle, die an einen oder mehrere TNF-Rezeptortypen binden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Liganden der TNF-Familie (zusammengefasst nach Bodmer *et al.*, 2002).

Name / Beschreibung	Abkürzung	Interagierender Rezeptor (Abkürzung)
<i>a proliferation-inducing ligand</i>	APRIL	BCMA, TACI
<i>apoptosis-mediating surface antigen FAS ligand</i>	CD95L	DcR3, CD95
<i>B-cell-activating factor</i>	BAFF	BCMA, TACI, BAFF-R
<i>ectodermal dysplasia protein 1</i>	EDA-A1	EDAR
<i>ectodermal dysplasia protein 2</i>	EDA-A2	XEDAR
<i>glucocorticoid-induced TNF-related ligand</i>	GITRL	GITR
<i>herpes virus entry mediator ligand</i>	LIGHT	LT β R, HVEM, DcR3
<i>lymphotoxin alpha</i>	LT α	TNFR1, TNFR2, HVEM
<i>lymphotoxin alpha 1/beta 2</i>	LT α 1 β 2	LT β R
<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>	RANKL	RANK, OPG
<i>T-B-cell-activating molecule</i>	CD40L	CD40
<i>TNF ligand-related molecule 1</i>	TL1A	DR3
<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>	TRAIL	TRAILR1-4, OPG
<i>TNF-related weak inducer of apoptosis</i>	TWEAK	Fn14
<i>tumor necrosis factor</i>	TNF	TNFR1, TNFR2

Name / Beschreibung	Abkürzung	Interagierender Rezeptor (Abkürzung)
<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 4</i>	OX40L	OX40
<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 7</i>	CD27L	CD27
<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 8</i>	CD30L	CD30
<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 9</i>	4-1BBL	4-1BB

1.2 Die Rezeptoren der TNF-Familie

Es wurden bisher 29 humane Mitglieder der TNFR-Familie identifiziert. Neben den in Tabelle 1 angeführten Rezeptoren gibt es noch NGFR (*nerve growth factor receptor*), DR6 (*death receptor 6*), TROY (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 19*) und RELT (*receptor expressed in lymphoid tissues*), allerdings wurden noch keine Liganden der TNF-Familie identifiziert, welche an diese vier Rezeptoren binden. Die Rezeptoren der TNF-Familie liegen meist als Typl-Transmembranproteine (N-Terminus extrazellulär) vor. Es gibt aber auch Ausnahmen, beispielsweise besitzen OPG (*osteoprotegerin*) und DcR3 (*decoy receptor 3*) keine Transmembrandomäne und liegen ausschließlich als lösliche Proteine vor. Auch durch Proteolyse können membranständige Rezeptoren freigesetzt werden, wie es z. B. für TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*), TNFR2 (*tumor necrosis factor receptor 2*), CD30 (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 8*), CD40 (*B-cell-associated molecule*) und CD27 (*T-cell activation antigen S152*) gezeigt wurde (Gruss und Dower, 1995; Aderka, 1996). Lösliche Formen von TNF-Rezeptoren können auch durch alternatives Spleißen der Exons entstehen, welche für die Transmembrandomäne kodieren, was z. B. für CD95 und 4-1BB (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 9*) gezeigt wurde (Smith *et al.*, 1994). Die extrazelluläre Domäne der TNF-Rezeptoren ist durch sich wiederholende cysteinreiche Domänen (CRDs) charakterisiert, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Die Bindung der Liganden an den Rezeptor findet im Bereich der CRDs statt (Locksley *et al.*, 2001). Ebenfalls extrazellulär gelegen, aber nicht direkt an der Bindung der Liganden beteiligt, ist die PLAD, die *pre-ligand assembly domain*, welche die erste CRD mit einschließt und die Aggregation von inaktiven Rezeptoroligomeren in der Plasmamembran vermittelt (Chan *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2000).

1.3 Die Interaktion zwischen TNF-Liganden und TNF-Rezeptoren

Liganden der TNF-Familie stimulieren verschiedene Signalwege, welche TNF-Rezeptor-vermittelt z. B. Apoptose, Nekrose, Angiogenese, aber auch Differenzierung und Zellproliferation induzieren (Wajant *et al.*, 2003). In den folgenden Abschnitten werden die Signalwege genauer beschrieben, welche zur Zelltodinduktion oder zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF κ B (*nuclear factor kappa B*)-Familie führen.

1.3.1 Die Zelltodinduktion

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Arten von Zelltod, z. B. Apoptose, Nekrose und Autophagie, wobei letztere den Abbau zelleigener Bestandteile darstellt. Die Nekrose hingegen ist charakterisiert durch das Anschwellen und Platzen einer Zelle, wodurch der Inhalt der Zelle freigesetzt wird. Dies führt zu Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe. Studien zeigten, dass bei der TNF-vermittelten Nekrose die Aktivität von RIP1 (*receptor interacting protein 1*) eine wichtige funktionelle Rolle spielt (Lin *et al.*, 2004). Bei der Apoptose hingegen schrumpft die Zelle und die DNS wird durch Endonukleasen abgebaut. Die Zelle geht ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde. Im Folgenden ist die Induktion der Apoptose durch die Bindung von Liganden der TNF-Familie an ihre Rezeptoren näher beschrieben.

Die Rezeptoren TRAILR1 (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*), TRAILR2 (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 2*), DR3 (*death receptor beta*), DR6, NGFR, TNFR1, CD95 und EDAR (*ectodysplasin A receptor*) besitzen eine intrazelluläre Homologie-Domäne, welche als *death domain* (DD, Todesdomäne) bezeichnet wird. Nach Aktivierung dieser Todesrezeptoren werden DD-tragende Adapterproteine an den Rezeptor rekrutiert. Als Beispiel seien hier die Todesrezeptoren CD95, TRAILR1 und TRAILR2 erwähnt. Diese Rezeptoren induzieren nach Bindung ihrer korrespondierenden Liganden die Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC), welcher aus den oligomerisierten Rezeptoren, dem Adaptermolekül FADD (*Fas-associated death domain*), den Procaspasen-8 und -10 und fakultativ dem *cellular FLICE-like inhibitory protein* (cFLIP) besteht (Peter und Kramer, 2003; Lavrik *et al.*, 2005). Die Interaktion der Moleküle des DISC untereinander beruht auf homotypischen Protein-Domänen-Interaktionen, so interagieren die genannten Todesrezeptoren über ihre DD mit der DD von FADD und FADD über seine *death effector domain* (DED) zudem mit der DED der Procaspasen und cFLIP (Lavrik *et al.*, 2005). Die Procaspase-8 wird durch autoproteolytisches Spalten im DISC zur aktiven Caspase-8 prozessiert und freigesetzt. Diese induziert danach die Aktivierung von Effektorcaspasen und

Apoptose. Auch die Procaspase-10 wird aktiviert, jedoch ist bislang wenig über ihre Bedeutung für die Apoptoseinduktion bekannt. Das ebenfalls im DISC enthaltene Protein cFLIP hingegen inhibiert die Apoptoseinduktion. Es blockiert die Prozessierung der Procaspase-8 und somit deren Aktivierung (s. 1.3.2.1) (Krueger *et al.*, 2001).

Bezüglich der durch den DISC induzierten, durch Caspase-8-vermittelten Apoptose unterscheidet man zwei Zelltypen. TypI-Zellen zeigen eine ausgeprägte DISC-Bildung und haben eine große Menge an aktiver Caspase-8, welche nachfolgend direkt Effektorcaspasen aktiviert und Apoptose induziert. Diese Art der Apoptoseinduktion wird als extrinsische Apoptose bezeichnet. TypII-Zellen hingegen zeigen eine schwächere DISC-Bildung und haben daher auch weniger aktive Caspase-8. Die direkte Aktivierung von Effektorcaspasen ist dadurch nicht ausreichend und wird in diesen Zellen durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung des *BH3 interacting domain death agonist* (BID)-Proteins, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie, amplifiziert. Das gespaltene BID (tBID, *truncated BID*) induziert die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, dadurch wird Cytochrom c und SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspase*) freigesetzt. Das Cytochrom c bildet dann mit dem *apoptotic protease activating factor-1* (APAF1) und der Procaspase-9 einen katalytischen Komplex. Dieser Komplex, das Apoptosom, aktiviert die Caspase-9 und diese wiederum Effektorcaspasen. Diese Art der Apoptoseinduktion wird als intrinsische Apoptose bezeichnet. Allerdings wirken in beiden Signalwegen der Apoptose auch Moleküle inhibierend auf die Caspase-Kaskade, wie z. B. cIAPs (*cellular inhibitor of apoptosis proteins*) (Lavrik *et al.*, 2005). Diese können somit auch die Effizienz der Apoptoseinduktion beeinflussen. So zeigten Jost *et al.*, dass die Menge an XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), einem Mitglied der cIAP-Familie, in der Zelle dafür ausschlaggebend ist, ob es eine TypI- oder TypII-Zelle ist (Jost *et al.*, 2009). Die cIAPs können wiederum von dem durch das Mitochondrium freigesetzte SMAC inhibiert werden (Abbildung 1).

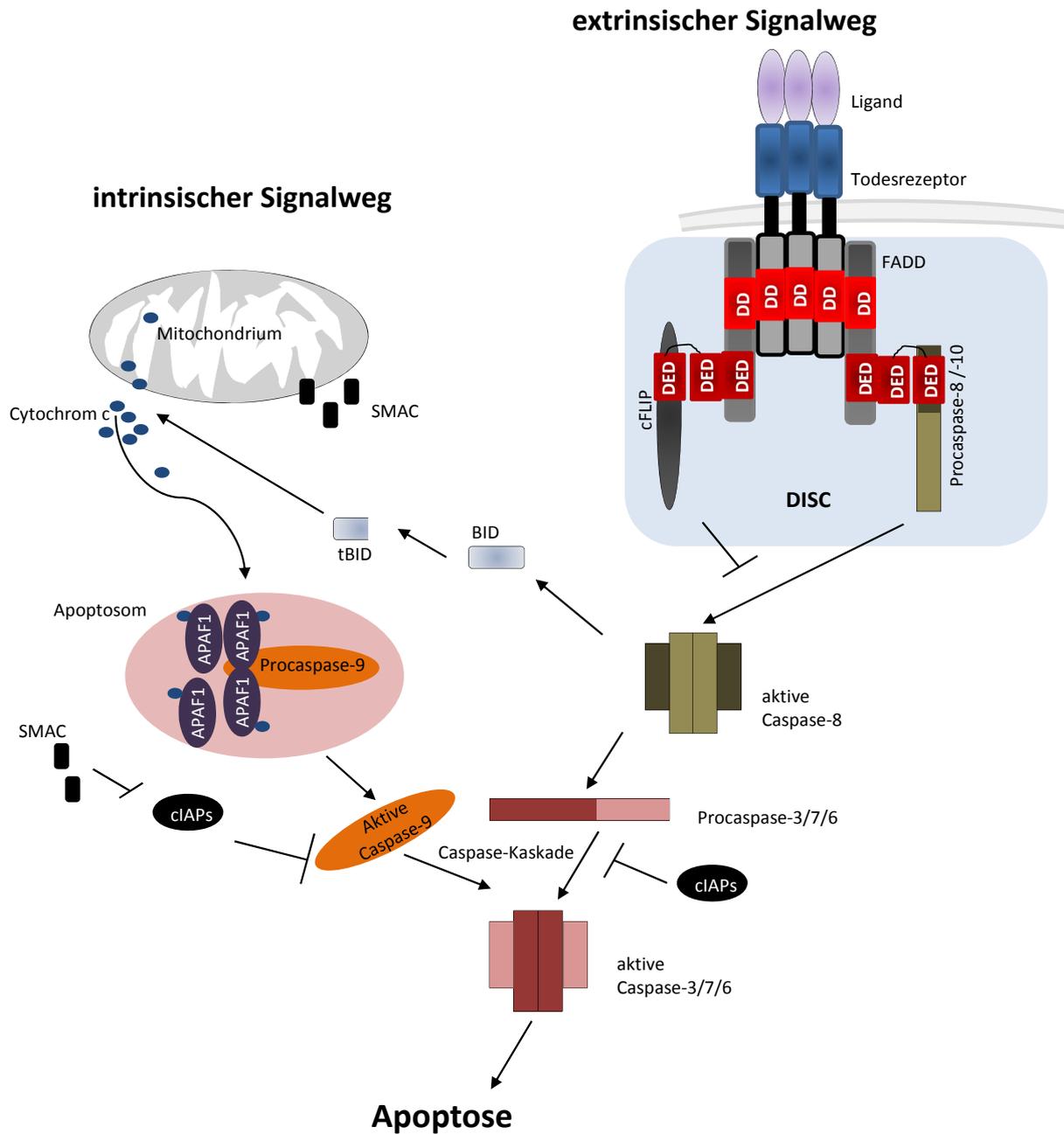


Abbildung 1: Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Signalweges der Apoptose (modifiziert nach MacFarlane und Williams, 2004; Lavrik et al., 2005).

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird durch die Ligandenbindung an einen Todesrezeptor initiiert, Adapterproteine wie FADD, Procaspase-8/-10 und cFLIP werden rekrutiert. Sie interagieren durch die homotypischen Protein-Domänen-Interaktionen miteinander und formen den DISC, welcher Caspase-8 aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Apoptoseinduktion.

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran induziert, welche unter anderem auf der Caspase-8-vermittelten Spaltung von BID zu tBID beruht. Dadurch werden Cytochrom c und SMAC freigesetzt. Cytochrom c, APAF1 und die Procaspase-9 bilden das Apoptosom und aktivieren Caspase-9 und die Caspase-Kaskade. Die Caspasen können jedoch durch cIAPs inhibiert werden, welche wiederum selbst durch SMAC inhibiert werden können.

Die Bindung von TNF an den TNFR1 und die dadurch induzierte apoptotische Signaltransduktion ist etwas komplexer als die von CD95 und den TRAIL-Todesrezeptoren. TNFR1 ist zwar auch ein Todesrezeptor, induziert aber im Vergleich zu CD95, TRAILR1 und TRAILR2 nur dann Zelltod, wenn die Neusynthese antiapoptotischer Proteine blockiert ist (Hehlgans und Pfeffer, 2005). So rekrutiert der aktivierte TNFR1 zunächst TRADD (*TNFR-associated death domain*) und RIP1. Mit dem Adaptermolekül TRADD werden sekundär TRAF2-cIAP1/2-Komplexe bzw. TRAF2-TRAF1-cIAP1/2-Komplexe rekrutiert. Letztere bestehen aus einem TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*)-Homotrimer bzw. einem TRAF2-TRAF1 (*TNFR-associated factor 1*)-Heterotrimer, sowie einem einzelnen cIAP-Molekül. Zusammen mit dem TAK-Komplex, welcher aus der *transforming growth factor- β activated kinase-1* (TAK1) und den daran bindenden Proteinen TAB2 (*TAK1-binding protein 2*) und TAB3 (*TAK1-binding protein 3*) besteht, aktiviert dieser initiale TNFR1-Komplex (Komplex 1) den IKK (*inhibitor of NF κ B kinase*)-Komplex und somit wird der klassische NF κ B-Signalweg stimuliert (Abbildung 2). Neben dem NF κ B-Signalweg kann durch Komplex 1 ohne den TAK1-Komplex auch der JNK-Signalweg induziert werden. Diese beiden Signalwege schützen die Zellen vor Apoptose.

Zum anderen kann der TNFR1 aber auch Apoptose induzieren. So postulieren Micheau und Tschopp, dass der TNFR1 zunächst TRADD und RIP1 rekrutiert. Anschließend dissoziieren diese Proteine aufgrund von Modifikationen vom TNFR1 und bilden einen zweiten Komplex (Komplex 2) mit FADD und Procaspase-8/-10 (Micheau und Tschopp, 2003). Dieser Komplex 2 kann ähnlich wie der DISC die Caspase-Kaskade und die Apoptose initiieren. Die bereits erwähnten Proteine cFLIP, TRAF1 und TRAF2 können ebenfalls mit diesem Komplex interagieren und inhibieren dessen Aktivität (Wang *et al.*, 1998). Allerdings ist bis heute unklar, ob sich dieser Komplex 2 sequentiell oder unabhängig vom Komplex 1 bildet.

Somit induziert die Aktivierung von TNFR1 die Formation von Signalkomplexen, welche entweder die apoptotische Caspase-Kaskade oder den antiapoptotischen klassischen NF κ B- und JNK-Signalweg induzieren (Abbildung 2). Die Kontrolle über die Qualität (Leben oder Tod) der TNFR1-Signaltransduktion liegt hier in der Effizienz der Komplex-Bildung, der Aktivierung von Caspase-8 und der Menge der antiapoptischen Proteine cFLIP und cIAP1/2, welche durch den klassischen NF κ B-Signalweg reguliert werden. Um eine Liganden-unabhängige Aktivierung der TNFR1-vermittelten Signalkaskaden zu verhindern, sind die DDs der Rezeptoren durch die *silencer of death domain* (SODD)-Proteine maskiert, welche nach Ligandenbindung an den Rezeptor dissoziieren (Jiang *et al.*, 1999).

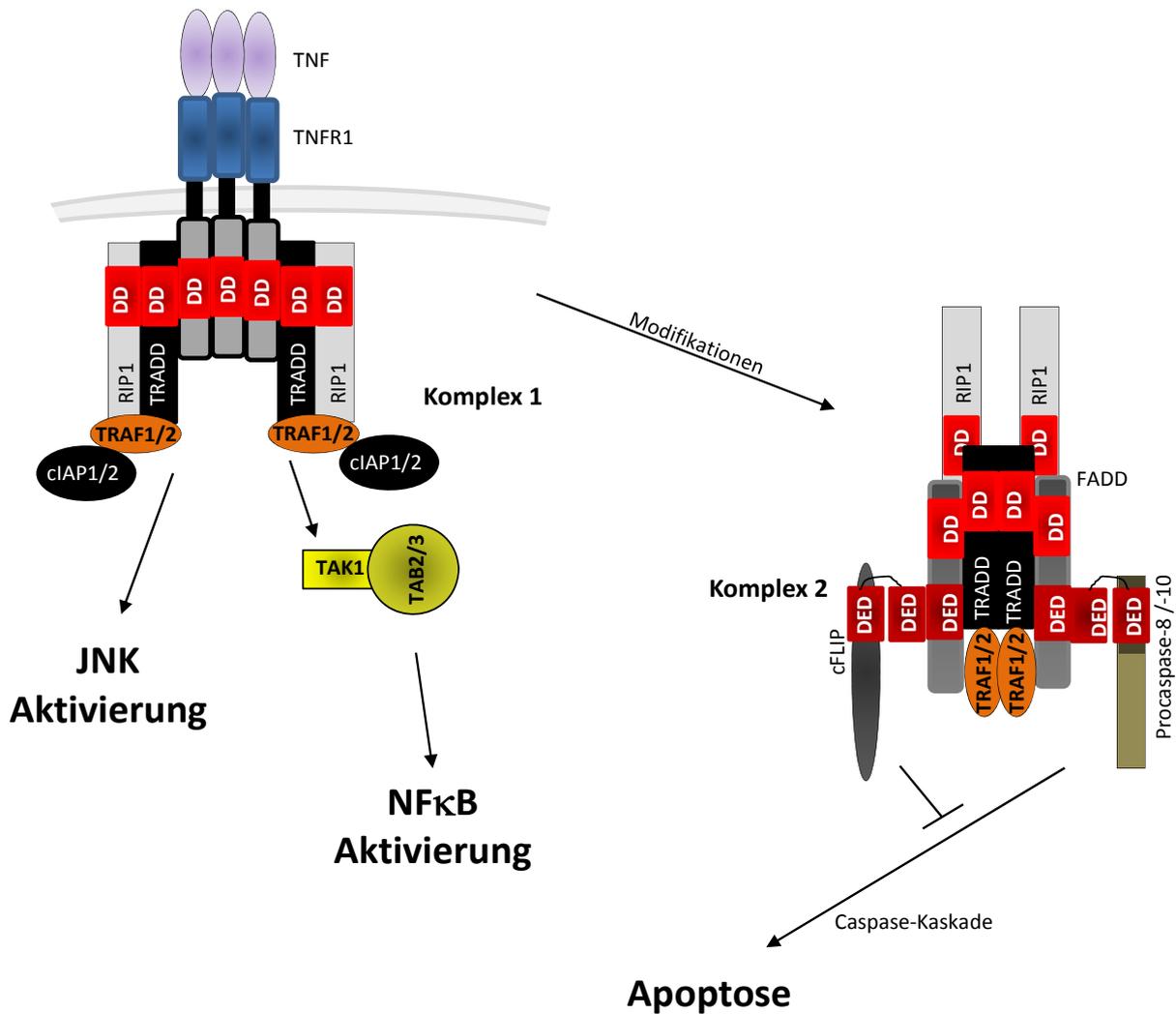


Abbildung 2: Signaltransduktion des TNFR1 (modifiziert nach Micheau und Tschopp, 2003; Lavrik *et al.*, 2005).

Nach der Bindung von TNF rekrutiert TNFR1 zunächst TRADD und RIP1. Danach können sich zwei verschiedene Komplexe bilden, zum einen mit TRAF1 und TRAF2. Dieser Komplex aktiviert, vermutlich durch TRAF2-abhängige Mechanismen und Einbeziehung des IKK-Komplexes, den klassischen NFκB-Signalweg. Zum anderen können nach Modifikationen TRADD und RIP1 vom Rezeptor dissoziieren und einen proapoptotischen Komplex mit FADD und Procaspase-8/-10 bilden, wodurch die Caspase-Kaskade aktiviert und Apoptose vermittelt wird. Diesem Komplex kann sich cFLIP anschließen, wirkt jedoch negativ auf die Caspase-Aktivierung.

1.3.2 Aktivierung des NFκB-Systems

Neben der Apoptoseinduktion kann die Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF-Familie auch eine inflammatorische Wirkung haben. Häufig beruht diese auf der Aktivierung der NFκB-Signalwege und der durch diese Signalwege regulierten Transkriptionsfaktoren (Luo *et al.*, 2005). Das NFκB-System kann aufgeteilt werden in den klassischen und den alternativen Signalweg.

Beim klassischen NF κ B-Signalweg werden dimere NF κ B-Transkriptionsfaktoren durch eine intermolekulare Interaktion mit I κ B (*inhibitor of NF κ B*)-Proteinen inhibiert, welche die Kernlokalisationssequenz (NLS) der NF κ B-Transkriptionsfaktoren maskieren. Die Proteine der I κ B-Familie besitzen charakteristischerweise *ankyrin repeats*, welche die Bindung zwischen I κ B und den NF κ B-Transkriptionsfaktoren vermitteln. Es kommt so zur Bildung eines zytoplasmatischen ternären Komplexes. Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TNF/TNFR1 beruht auf der in Abbildung 2 dargestellten Komplexbildung mit RIP1. RIP1 wird dabei durch Polyubiquitinketten modifiziert und eben diese werden dann zur Rekrutierung anderer Proteine genutzt. So bindet der bevorzugt an K63-verknüpfte Polyubiquitinketten bindende TAK-Komplex an RIP1 und ist dadurch in der Lage, mit dem an RIP1 korekrutierten IKK-Komplex zu interagieren und diesen zu aktivieren (Wang *et al.*, 2001; Ea *et al.*, 2006). Der aktive IKK-Komplex, welcher aus IKK1 (*inhibitor of NF κ B kinase alpha*) und IKK2 (*inhibitor of NF κ B kinase beta*), der regulatorischen Untereinheit NEMO (*NF κ B essential modifier*), einem *heat shock protein-90* (HSP90)-Homodimer und einem HSP90-assoziiertem cdc37 (*cell division cycle 37 homolog*)-Protein (Zandi *et al.*, 1997; Yamaoka *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002) besteht, induziert die Phosphorylierung des I κ B-Proteins. Diese löst dann die β -TrCP (*beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*)-vermittelte Polyubiquitinylierung des Moleküls aus und somit dessen proteasomale Degradation (Hoffmann *et al.*, 2006; Scheidereit, 2006; Sun und Ley, 2008). Dadurch wird die zuvor maskierte Kernlokalisationssequenz freigelegt und die NF κ B-Dimere können in den Zellkern translozieren und die Transkription verschiedener Zielgene, wie z. B. IL8 (Interleukin 8) und TNF, induzieren (Wajant und Scheurich, 2011). Durch den klassischen NF κ B-Signalweg werden vor allem die NF κ B-Transkriptionsfaktoren p65 (*transcription factor p65*) und p50 (*NF κ B1, subunit p50*) reguliert, wobei Letzterer durch die konstitutive Proteolyse des Vorläuferproteins p105 (*NF κ B1*) entsteht. Die beiden Proteine p65 und p50 bilden häufig Heterodimere (Abbildung 3). Vom alternativen NF κ B-Signalweg werden hingegen vor allem die NF κ B-Transkriptionsfaktoren p52 (*NF κ B2, subunit p52*) und RelB (*transcription factor RelB*) reguliert. Gemeinsam haben die NF κ B-Transkriptionsfaktoren die RHD (*Rel homology domain*), welche die Dimerisierung, Kernlokalisierung und die DNS-Bindung der Transkriptionsfaktoren, sowie deren Interaktion mit den inhibitorischen I κ B-Molekülen vermittelt (Verma *et al.*, 1995). Die Transkriptionsfaktoren RelB und p52 werden intramolekular inhibiert. So liegt der Transkriptionsfaktor p52 zunächst als inaktives p100 (*NF κ B2*) Vorläuferprotein vor, welches C-terminal eine inhibitorische I κ B-Domäne enthält und damit p100-enhaltende NF κ B-Dimere im Zytoplasma zurückhält. Zur Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges ist die Depletion eines inhibitorischen TRAF2-TRAF3-clAP1/2-Komplexes notwendig. Dieser Komplex bindet in unstimulierten Zellen an die Kinase

NIK (*NFκB-inducing kinase*), welche durch cIAPs ubiquitinyliert wird und dadurch für die proteasomale Degradation markiert wird. Durch spezifische Stimulation von Rezeptoren, die den alternativen NFκB-Signalweg induzieren, wie beispielsweise LTβR (*lymphotoxin beta receptor*) oder Fn14 (*TWEAK-receptor*), wird eben dieser TRAF2-TRAF3-cIAP1/2-Komplex depletiert, so dass neu synthetisiertes NIK akkumulieren kann und IKK1 stimuliert wird (Hoffmann *et al.*, 2006; Scheidereit, 2006; Sun und Ley, 2008; Vallabhapurapu *et al.*, 2008). Im Vergleich zum klassischen NFκB-Signalweg wird dann unabhängig von NEMO und IKK2 und ausschließlich durch IKK1 p100 phosphoryliert und zum aktiven p52 prozessiert. Anschließend können die p52-enhaltenden dimeren Transkriptionsfaktoren in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen wie z. B. BLC (*B lymphocyte chemoattractant*) und SDF1 (*stromal cell-derived factor 1*) induzieren (Abbildung 3) (Bonizzi *et al.*, 2004).

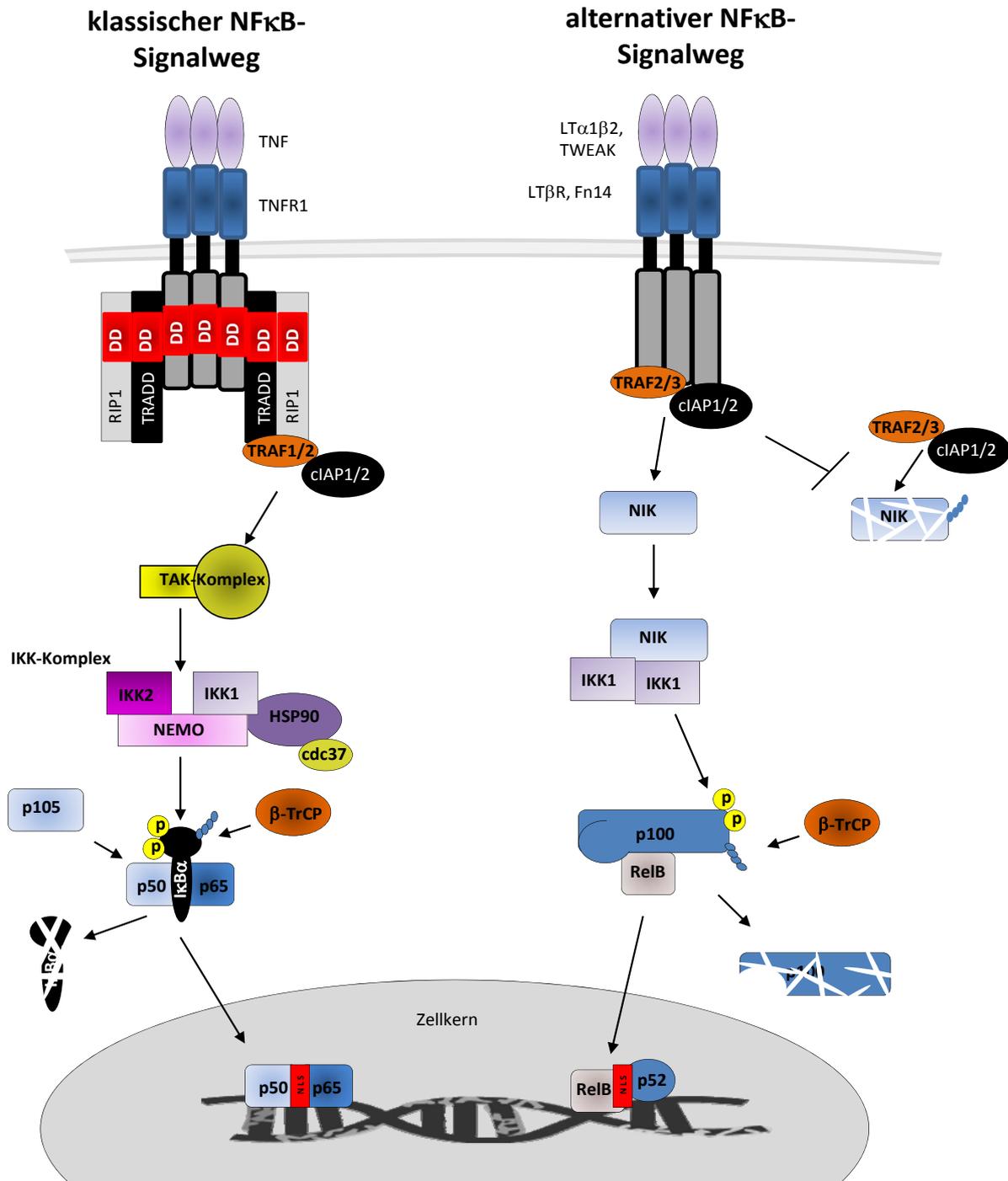


Abbildung 3: Der klassische und alternative NFκB-Signalweg (modifiziert nach Hayden und Ghosh, 2004; Bakkar und Guttridge, 2010).

Schematisch vereinfachte Darstellung der Signalkaskaden des klassischen und alternativen NFκB-Signalweges, zur Erläuterung siehe Text.

1.3.2.1 NFκB-regulierte Genexpression

Ein wichtiger Effekt der Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges ist die Transkription antiapoptischer Gene (Luo, 2005). Hier sei zunächst das bereits in 1.3.1 beschriebene

cFLIP genannt, welches die Aktivierung der Caspasen-8 und -10 inhibieren kann. Durch alternatives Spleißen kommt es zur Generierung mehrerer Isoformen, wobei drei dieser Proteine detektiert werden können: die lange Form, cFLIP_{Long}; die kurzen Formen, cFLIP_{Short} und cFLIP_{Raji} (Krueger *et al.*, 2001; Golks *et al.*, 2005). Die cFLIP-Proteine können durch ihre zwei DEDs mit FADD interagieren, sind somit Teil des DISC und inhibieren die Prozessierung der Procaspase-8 (Abbildung 1). Jedoch ist die Wirkung der cFLIP-Proteine unterschiedlich, so verhindern cFLIP_{Short} und cFLIP_{Raji} die Prozessierung der Caspase-8 vollständig. Es bilden sich inaktive Komplexe mit der Caspase-8. cFLIP_{Long} hingegen erlaubt den ersten von zwei Prozessierungsschritten der Caspase-8 zu den Intermediaten p43/41. Die sich so bildenden Komplexe aus cFLIP_{Long} und prozessierter Caspase-8 lösen sich nicht mehr vom Todesrezeptor und bleiben somit inaktiv (Krueger *et al.*, 2001; Wajant, 2003b; Lavrik und Krammer, 2012).

Ebenso haben die NF κ B-regulierten Proteine der cIAP-Familie eine antiapoptotische Wirkung. Dazu gehören XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2 (*inhibitor of apoptosis-like protein 2*), BRUCE (*baculoviral IAP repeat-containing protein 6*), Survivin und Livin. Strukturell zeichnen sie sich durch die gemeinsame BIR (*baculovirus internal repeat*)-Domäne aus. Neben der BIR-Domäne tragen die Proteine noch andere Domänen, hier sei die CARD (*caspase-associated recruitment domain*)-Domäne von cIAP1 und cIAP2 erwähnt, welche Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Martin, 2001). Die Proteine der cIAP-Familie sind die einzigen bekannten Proteine, welche sowohl Effektor- als auch Initiatorcaspasen negativ regulieren (LaCasse *et al.*, 2008). Die antiapoptotisch wirkenden Proteine cIAP1 und cIAP2 bilden oft einen Komplex zusammen mit TRAF2.

Ebenfalls durch NF κ B-Transkriptionsfaktoren reguliert sind Proteine der TRAF-Familie. Die Proteine dieser Familie besitzen C-terminal eine konservierte charakteristische TRAF-Domäne, welche die Bindung der Proteine an Rezeptoren, sowie die Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt (Rothe *et al.*, 1994). Nach Stimulation des TNFR1 dient insbesondere TRAF2 als Adapterprotein zur optimalen Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges (Abbildung 3). Andererseits wirkt TRAF2 zusammen mit TRAF3 inhibitorisch auf den alternativen NF κ B-Signalweg. Hier rekrutiert TRAF3 den TRAF2-cIAP1/2-Komplex zu NIK, einem elementaren Protein bei der Signaltransduktion des alternativen NF κ B-Signalweges. cIAP1/2 ubiquitinylieren NIK und vermitteln somit dessen proteasomale Degradation (siehe 1.3.2, Abbildung 3; Sun und Ley, 2008).

1.3.3 TNF und die Interaktion mit TNFR2

TNF liegt sowohl als löslicher als auch als membranständiger Ligand vor und kann neben TNFR1 auch an den TNFR2 binden. Jedoch unterscheiden sich die beiden Ligandenformen

bei der Stimulation der beiden Rezeptoren. Während membranständiges TNF sowohl Signalwege, die durch den TNFR1 als auch solche, die durch den TNFR2 aktiviert werden, stimulieren kann, kann lösliches trimeres TNF nur den TNFR1 nachweislich robust aktivieren und zeigt keinen oder nur wenig Einfluss auf die Aktivierung des TNFR2 (Grell *et al.*, 1995). TNFR2 wird hauptsächlich auf Immun- oder Endothelzellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass er die Migration und das Wachstum von Langerhans- und Epithelzellen beeinflussen kann (Takayama *et al.*, 1999; Corredor *et al.*, 2003) und ebenfalls die Proliferation von Myofibroblasten stimuliert (Theiss *et al.*, 2005). Über die Signaltransduktion des TNFR2 ist im Vergleich zum TNFR1 bis heute wenig bekannt. Jedoch zeigten verschiedene Studien, dass der TNFR2 einen Einfluss auf TNFR1-vermittelte Signalwege hat. So kann eine TNFR2-Stimulation die TNFR1-vermittelte Apoptose durch die Depletion des Caspase-8-inhibierenden TRAF2-clAP1/2-Komplexes steigern. Der Komplex wird zum TNFR2 rekrutiert und anschließend proteasomal degradiert, wodurch er für den TNFR1 nicht mehr zur Verfügung steht (Duckett und Thompson, 1997; Weiss *et al.*, 1997; Declercq *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1998; Chan und Lenardo, 2000; Fotin-Mlecsek *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005).

1.4 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) gehört zur Gruppe der B-Zell-Lymphome und ist die Folge maligner Veränderungen von Antikörper-produzierenden B-Zellen im Knochenmark. In Deutschland kommt das MM bei etwa 4 / 100000 Einwohnern vor und stellt mit einer Häufung im siebzigsten Lebensjahr eine typische Alterserkrankung dar (Krome, 2012).

Die malignen Plasmazellen vermehren sich im Knochenmark und stören das Mikromilieu. Dadurch verschiebt sich das hämatopoetische Gleichgewicht und es kommt u. a. zur Auflösung der Knochen (Hideshima *et al.*, 2004; Bommert *et al.*, 2006). Die von entarteten Plasmazellen gebildeten Antikörper oder Bruchstücke von Antikörpern sind meist ohne Funktion und daher treten bei den Betroffenen häufig wiederkehrende Infekte durch ein geschwächtes Immunsystem auf (Kyle und Rajkumar, 2004). Durch die Ablagerung von Antikörper-Leichtketten im Nierengewebe kommt es bei MM-Patienten oft zu einem Nierenfunktionsverlust (Seymour *et al.*, 1980; Kastiris *et al.*, 2009).

Das Behandlungsspektrum für das Multiple Myelom ist heute breit gefächert, am häufigsten wird aber mit einer Hochdosis-Melphalan-Therapie (Chemotherapeutika) und einer anschließenden Stammzelltransplantation therapiert (Krome, 2012). Inzwischen wird Melphalan oft in Kombination mit anderen Medikamenten, wie dem Immunsuppressor Prednison oder dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Velcade), verwendet. Bortezomib

inhibiert das Proteasom, blockiert dadurch Stoffwechselwege und inhibiert so das Tumorstadium und induziert Apoptose (Hideshima *et al.*, 2001b). Bortezomib ist bereits seit 2004 ein für die MM-Therapie zugelassenes Medikament. Ein weiterer Ansatz in der MM-Therapie ist die Inhibition des PI3K/Akt (phosphoinositide-3-kinase/ Protein Kinase B)-Signalweges, welcher sowohl proliferatives als auch antiapoptotisches Signaling vermittelt (Tu *et al.*, 2000; Hideshima *et al.*, 2001a; Mitsiades *et al.*, 2002a) und in vielen MM-Zellen aktiviert ist (Hsu *et al.*, 2001; Pene *et al.*, 2002). Studien zeigten, dass etwa die Hälfte von primären MM-Zellen auf die Akt-Inhibition durch den pharmakologischen Inhibitor Akti-1/2 mit deutlicher Apoptoseinduktion reagiert (Zöllinger *et al.*, 2008). Das häufig vorkommende Chaperon HSP90 stellt ein weiteres Ziel für Therapieansätze dar. Es hat wichtige Funktionen im Bereich der Signaltransduktion, Proteinfaltung und -degradation, und es ist in vielen Krebsarten gesteigert exprimiert, so auch im MM (Usmani und Chiosis, 2011). HSP90 scheint Einfluss auf das Tumorzell-Überleben zu haben, indem es abnorme Signalproteine stabilisiert und mit der Apoptose interferiert (Richardson *et al.*, 2011). Im MM konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten deutlich und dauerhaft auf eine Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor Tanespimycin in Kombination mit Bortezomib reagierten (Richardson *et al.*, 2010). Trotz neuartiger Therapien existiert aber bis heute kein kurativer Ansatz für das Multiple Myelom und die Überlebenszeit liegt trotz Therapie bei nur etwa 5 - 10 Jahren, je nach Alter bei Erstdiagnose (Brenner *et al.*, 2009).

1.4.1 Die Rolle des NF κ B-Systems im Multiplen Myelom

Die pleiotropen Funktionen der NF κ B-Transkriptionsfaktoren beim Wachstum und Überleben von Zellen spielen natürlich auch bei Tumoren eine Rolle. Insbesondere im MM werden dem NF κ B-System protumorale Effekte, wie Stimulation des Wachstums und der Angiogenese, zugeschrieben (Li *et al.*, 2008). Weiterhin zeigten Studien indirekt, dass die NF κ B-Signalwege im MM eine Rolle spielen. So resultierte beispielsweise die Inhibition der IKK2 in vermindertem Zellwachstum in MM-Zellen (Jourdan *et al.*, 2007). Außerdem zeigten zwei Studien im Jahr 2007 deutlich, dass mehr als 80 % der Myelome eine Genexpression aufweisen, die charakteristisch für die Aktivität der NF κ B-Transkriptionsfaktoren ist (Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007). Ebenso zeigten diese Studien, dass in einer Reihe von MM-Zelllinien und in nahezu 20 % von primären MM-Proben genetische Veränderungen vorliegen, die eine Zell-autonome, konstitutive Aktivierung des NF κ B-Systems begünstigen. Besonders interessant ist hier, dass die genetischen Veränderungen zudem meist einen gesteigerten positiven Effekt (erhöhte Expression von NIK) oder verminderten negativen Effekt (Deletion oder Mutation von TRAF2, cIAP1/2) auf die

Regulation des alternativen NF κ B-Signalweges haben (Gilmore, 2007; Keats *et al.*, 2007). Somit scheint das NF κ B-System für das Multiple Myelom und dessen Pathogenese eine wichtige Rolle zu spielen.

1.5 Ziel der Arbeit

Die Signaltransduktion des TNFR1 wurde bereits weitestgehend studiert und dargestellt, besonders im Hinblick auf die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges und der Zelltodinduktion. Vergleichsweise wenig ist jedoch über die TNFR2-vermittelte Signaltransduktion bekannt. Zudem spielt das NF κ B-System im Multiplen Myelom eine wichtige Rolle und einer der Hauptaktivatoren dieses Systems ist TNF. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von TNF auf das NF κ B-System im MM im Hinblick auf die Regulation antiapoptotischer Gene als auch die noch wenig verstandene Signaltransduktion des TNFR2 untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

Chemikalie, Reagenz	Hersteller
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Roche, Mannheim
ABTS Puffer	Roche, Mannheim
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Bortezomib	Prof. Dr. Ralf C. Bargou, Würzburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximid (CHX)	Sigma, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Dulbecco's PBS (DPBS)	PAA, Pasching, Österreich
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg
fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Interleukin 6 (IL6)	ImmunoTools, Friesoythe
MG132	Calbiochem, Schwabach
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, Deisenhofen
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Necrostatin-1	Enzo Life Sciences, Lörrach
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich

Chemikalie, Reagenz	Hersteller
Phosphataseinhibitor I und II	Sigma, Deisenhofen
<i>Prestained Protein Marker (Broad Range)</i>	New England Biolabs, Frankfurt
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching, Österreich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
TNFR1-Fc	Dr. Pascal Schneider, Universität Lausanne, Schweiz
TNFR2-Fc	Wyeth Pharma, Münster
TPCA-1	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
TRAIL	Enzo Life Sciences, Lörrach
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	PAA, Pasching, Österreich
TWEEN-20	Carl Roth, Karlsruhe
zVAD	Bachem, Heidelberg

2.1.1 Enzyme

Für Klonierungen vorgesehene Restriktionsenzyme, sowie eine T4-Ligase und *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) wurden von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen. Zur DNS Amplifikation wurde das *Expand High Fidelity* PCR System von Roche (Mannheim) genutzt.

2.1.2 Oligonukleotide

Die für die Klonierungen der Liganden, Vektoren und *Gaussia princeps* Luziferase (GpL)-Fusionsproteine notwendigen PCR-Primer wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

2.2 Antikörper und Antiseren

Spezifität	Hersteller
Anti-CD95, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-CD95-FITC, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-clAP2, Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-FLIP, Maus monoklonal	Enzo Life Sciences, Lörrach
Anti-IgG1-FITC, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-IgG1-PE, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-IgG2a-PE, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-IgG2b-PE, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-IL8 (OptEIA ELISA),	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IL8, biotinyliert	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-I κ B α , Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Kaninchen-HRP, Ziege polyklonal	Dako, Hamburg
Anti-Kaninchen-HRP, Ziege polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Lamin B, Ziege polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Maus IRDye 800CW, Ziege polyklonal	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Anti-Maus-HRP, Kaninchen polyklonal	Dako, Hamburg
Anti-NIK, Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-p100/52, Maus monoklonal	Upstate/Millipore, Schwalbach
Anti-p50, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-p65, Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-p-I κ B α , Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-ReIB, Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TNFR1-PE, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-TNFR2-PE, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Spezifität	Hersteller
Anti-TRAF1, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAF2, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAILR1-PE, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-TRAILR2-PE, Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-Tubulin, Maus monoklonal	Neomarkers, Fremont USA
Anti-Tubulin, Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Asbach
H398 (TNFR1-spezifischer mAk)	Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier und Prof. Dr. Peter Scheurich, Universität Stuttgart
Streptavidin-HRP	BD Biosciences, Heidelberg

2.3 Zellen

2.3.1 Prokaryotische Zellen

NEB 5-alpha Competent *E.coli* wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

2.3.2 Eukaryotische Zellen

HeLa ist eine humane Zervixkarzinomzelllinie, die Transfektante HeLa-TNFR2 ist beschrieben in Weiss *et al.*, 1998 und die Transfektante HeLa-TNFR2-TRAF1 in Wicovsky *et al.*, 2009. HEK293 ist eine humane, embryonale Nierenzelllinie und AMO1, KMS-11, KMS-12-BM, RPMI8226, INA6, OPM2, JJN3, L363, MM.1S und U266 sind humane Myelomzelllinien. Alle verwendeten Zelllinien waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

2.4 Fusionsproteine/Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Flag-getaggtten Fusionsproteine TNF(32W/86T), TNC-scTNF(143N/145R), Fc-CD95L und TNF wurden von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin, Würzburg, kloniert und produziert. Die Plasmide wurden zunächst in *E.coli* produziert und anschließend isoliert. Danach wurden sie mittels

Elektroporation in HEK293-Zellen eingebracht, welche dann die Proteine produzierten und in den Zellüberstand sekretierten. Anschließend wurden die Proteine durch Flag-spezifische Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Flag-getaggten *Gaussia princeps* Luziferase-Fusionsproteine GpL-TNC-TNF(32W/86T) und GpL-TNC-scTNF(143N/145R) wurden ebenfalls von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin, Würzburg, kloniert und in HEK293-Zellen produziert. Die Zellüberstände mit den sekretierten rekombinanten Liganden wurden für die Ligand-Bindungsstudien verwendet.

2.5 Verbrauchsmaterial und Geräte

Das Plastikmaterial zur Kultivierung der Zellen (Kryoröhrchen, Polypropylenröhrchen, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten, Zellkulturschalen) sowie die schwarzen 96-Well-Flachboden- und ELISA-Platten wurden von der Firma Greiner aus Frickenhausen bezogen.

Material/Gerät	Hersteller
Agfa Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa, Düsseldorf
Begasungsschrank Heraeus <i>Cell Safe</i>	Heraeus, Hanau
Blockheizer	Peqlab, Erlangen
Blotting-Papier 195 g/m ²	A. Hartenstein, Würzburg
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometrie Röhrchen	Falcon, Heidelberg
Elektroporator Equibio EasyjecT Plus	Peqlab, Erlangen
Gellaufkammern SDS-PAGE	Peqlab, Erlangen
LI-COR Odyssey® <i>Infrared Imager</i>	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Luminometer/ELISA-Reader Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld
Nass-Blotkammer	Peqlab, Erlangen
Nitrozellulose-Membran, 0,2 µm Porengröße	Whatman, Dassel
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Garching

Material/Gerät	Hersteller
<i>Semi-Dry</i> -Blotkammer	Peqlab, Erlangen
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher Ultrasonics, Teltow
Zellschaber	SPL Life Sciences Inc., Pocheon-Si, Korea

2.6 Lösungen und Puffer

Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß in vollentsalztem Wasser gelöst und nach Bedarf steril filtriert.

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
4x Probenpuffer	10 % Glycerin 0,1 M Tris pH 8,0 1 % SDS 0,1 M DTT Bromphenolblau
Assay Diluent	PBS 10 % FCS
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
<i>Coating Buffer</i>	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5
FACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer	50 mM Tris 380 mM Glycin 4 mM SDS pH 8,3
MTT-Färbelösung	MTT-Stocklösung 1:5 in PBS verdünnt
MTT-Lysispuffer	50 % N,N-Dimethylformamid 15 % SDS pH 4,7 (mit Essigsäure)
MTT-Stocklösung (5x)	50 mg/ml MTT in DMSO
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	20 mM Natriumphosphat 0,7 % Natriumchlorid pH 7,2
PBST	PBS 0,05 % Tween-20
PBST-Milch	PBS 0,05 % Tween-20 5 % Magermilch
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	0,02 M Tris, 8 % Natriumchlorid, pH 7,6
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8

2.7 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
OptEIA IL8-ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
ECL-Kit Amersham	GE Healthcare, Garching
<i>Gaussia Luciferase Assay Kit</i>	New England Biolabs, Frankfurt
NE-PER <i>Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents</i> Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
<i>Pure Yield Plasmid Miniprep/ Midiprep System</i>	Promega, Mannheim

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellen wurden in RPMI1640-Medium mit Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem FCS (30 min bei 56°C) in oberflächenbehandelten Gewebekulturflaschen kultiviert. Bei den INA6 Zellen wurde das Medium mit 10 ng/ml rekombinantem humanem IL6 supplementiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37°C. Bei HeLa, HeLa-TNFR2, HeLa-TNFR2-TRAF1 und HEK293 handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. In Abhängigkeit der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche geteilt. Die Zellen wurden dabei mit DPBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (1x in DPBS) so lange inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösten. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 1:5 bis 1:10 Verdünnungen der Zellsuspension in frischem Medium hergestellt und weiter kultiviert. Bei KMS-11, RPMI8226, MM.1S, JJN3, L363 und U266 handelt es sich um semi-adhärent wachsende Zellen. Sie wurden in schräg stehenden Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Teilen der Zellen wurden die teilweise adhärenen Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und so in das Medium mit den gelösten Zellen überführt. Zum Mediumwechsel und Teilen der Zellen wurden diese abzentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Zellpellet anschließend in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in 1:5 bis 1:10 Verdünnungen weiter kultiviert. Bei INA6, KMS-12-BM, OPM2 und AMO1 handelt es sich um Suspensionszellen. Diese wurden ähnlich wie die semi-adhärenen Zellen kultiviert, konnten aber direkt im Medium aufgenommen und geteilt werden. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde für die einzelnen Experimente die Zellzahl bestimmt.

3.1.2 Konservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen

Um die Zellen längerfristig zu lagern, wurden Zellpellets in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und anschließend bei -80°C eingefroren. Zur Revitalisierung wurden die Zellen schnell aufgetaut, in Zellkulturmedium resuspendiert, abzentrifugiert und gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert, in Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

3.2 Zytotoxizitätsassays

Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung verschiedener Stimuli wurden die Zellen in 96-Well-Flachbodenplatten ausgesät (5×10^4 Zellen/Well). Die Zellen wurden für etwa 1 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit den verschiedenen Proteinen und Reagenzien in den jeweils angegebenen Konzentrationen und Zeitdauern in Triplikaten und einem Endvolumen von 125 μ l/Well stimuliert. Danach wurde je Well 10 μ l der MTT-Färbelösung (10 mg/ml) und 25 μ l DPBS hinzupipettiert und die Zellen für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 90 μ l/Well MTT-Lysispuffer hinzugegeben und die Platten über Nacht bei RT geschüttelt. Die Messung erfolgte am nächsten Tag bei 570 nm im ELISA-Reader. Der Prozentsatz überlebender Zellen wurde berechnet aus unbehandelten Zellen (100 % überlebende Zellen) und Zellen, die komplett getötet waren (mit einer Mischung aus CHX, TRAIL und Fc-CD95L; 0 % überlebende Zellen).

3.3 Bestimmung der IL8-Produktion mittels ELISA

Die HeLa-Zellen und Transfektanten (HeLa-TNFR2 und HeLa-TNFR2-TRAF1) wurden in 96-Well-Flachbodenplatten ausgesät (2×10^4 Zellen/Well) und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden mit den angegebenen Reagenzien und Liganden in Triplikaten für 18 h stimuliert. Der Zellüberstand wurde nach einer Zentrifugation abgenommen und zur Lagerung bei -20°C weggefroren oder direkt weiterverwendet. Zuvor waren 96-Well-ELISA-Platten mit dem humanen anti-IL8-Antikörper aus dem OptEIA IL8-ELISA-Kit (BD Biosciences, Heidelberg) nach Herstellerangaben beschichtet worden. Die ELISA-Platten wurden zunächst mit Assay Diluent für 1 h geblockt und die Zellüberstände wurden dann auf die ELISA-Platten zusammen mit einer IL8-Standardlösung (2-0,5 ng/ml) gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Eine Mischung aus biotinyliertem anti-IL8-Antikörper und Streptavidin-HRP wurde anschließend für 1 h auf die Platten gegeben. Nach deren Bindung konnte die Menge des in den Zellüberstand sezernierten IL8 durch Zugabe des HRP-Substrates ABTS (gelöst in ABTS Puffer) und der Messung im ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt werden. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die ELISA-Platten mehrfach mit PBST gewaschen.

3.4 Herstellung von Zelllysaten

3.4.1 Gesamtzelllysate

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die adhärennten HeLa-Zellen und die HeLa-Transfektanten einen Tag zuvor ausgesät und erst am folgenden Tag stimuliert. Sowohl die Suspensionszellen als auch die semi-adhärennt wachsenden Myleomzellen wurden bereits 1 h nach dem Aussäen wie jeweils angegeben stimuliert. Anschließend wurden die Zellen abgekratzt und in eiskaltes PBS überführt. Nach einer Zentrifugation wurde das Zellpellet in mit Protease- und Phosphataseinhibitoren supplementiertem 4x Probenpuffer aufgenommen. Das Zellpellet wurde für 20 Sekunden im Probenpuffer sonifiziert und danach bei 96°C für 5 min aufgeköcht. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei RT und 14000 rpm wurden die Gesamtzelllysate bei -20°C weggefroren.

3.4.2 Zytoplasma- und Kernlysate

Die Proteine der Zellfraktionen (Zytoplamsa und Zellkern) wurden isoliert, um mittels Western Blot-Analysen die Lokalisation einzelner Proteine zu bestimmen. Hierzu wurde das NE-PER *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet.

3.5 Western Blot

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine aus den Zelllysaten wurden Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) durchgeführt. Das Trenngel setze sich aus der Trenngellösung (375 mM Tris pH 8,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) und, je nach Proteingröße, 8-12 % Acrylamid zusammen. Dabei wurde die Polymerisierung des Gels mit 0,1 % TEMED induziert. Zur Sammlung der Proben wurde das Trenngel mit einem Sammelgel (6 % Acrylamid in 125 mM Tris pH 6,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) überschichtet. Die Polymerisierung wurde auch hier mit 0,1 % TEMED induziert, allerdings wurde vor der Auspolymerisierung des Sammelgels ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Anschließend wurden die Gele mit den Proteinproben und dem Molekulargewichtsstandard, *Prestained Protein Marker (Broad Range)*, der Firma New England Biolabs (Frankfurt) beladen. Die Elektrophorese erfolgte mit Laufpuffer in Gellaufkammern der Firma Peqlab (Erlangen) bei einer Spannung von 90-130 V für ca. 90 min.

3.5.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Zur Darstellung der Proteine im Western Blot wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert. Dies wurde zum Teil in einer horizontalen *Semi-Dry* Blotkammer zum Teil in einer vertikalen Nass-Blotkammer durchgeführt. Bei beiden Verfahren wurde die Nitrozellulosemembran und das Blottingpapier zunächst kurz in Blotpuffer getränkt. Anschließend wurden diese und das Gel folgendermaßen in die Blotkammern gelegt:

Anode/ 2 Blatt Blottingpapier/ Nitrozellulosemembran/ Gel/ 2 Blatt Blottingpapier/ Kathode.

Der Proteintransfer erfolgte bei RT und einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm² Gelfläche in den *Semi-Dry*-Blotkammern und bei 90 V und 400 mA in den Nass-Blotkammern für jeweils 90 bis 120 min.

3.5.3 Immundetektion

Je nach Antikörper und Herstellerangaben wurden die verschiedenen verwendeten Lösungen bei der Immundetektion entweder in PBST oder in TBST angesetzt. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken wurde die Nitrozellulosemembran zunächst für 1 h bei RT in PBST- bzw. TBST-Milch geschwenkt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBST oder TBST gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde dann mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag erneut dreimal mit PBST oder TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten bzw. einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für 2 h bei RT in PBST oder TBST, je nach Sekundärantikörper auch mit 5 % Magermilch, inkubiert. Danach wurde die Nitrozellulosemembran erneut dreimal in PBST oder TBST für 10 min gewaschen und die Nachweisreaktion erfolgte bei Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern mit dem ECL-Kit und Röntgenfilmen von GE Healthcare (Garching) in der Agfa Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa, Düsseldorf), bei fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte der Proteinnachweis durch das LI-COR Odyssey®-System (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

3.6 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren wurden die Zellen der verschiedenen Myelomzelllinien wie in den jeweiligen Abbildungen beschrieben vorbehandelt oder blieben unbehandelt. Die Zellen wurden geerntet und mit FACS-Puffer (PBS mit 0,5 % BSA) gewaschen. Anschließend wurden sie mit Phycoerythrin- oder Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten monoklonalen TNFR1-, TNFR2-, CD95-, TRAILR1- oder TRAILR2-spezifischen Antikörpern bzw. den entsprechenden Isotypkontroll-Antikörpern für mindestens 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und darin resuspendiert. Die zellgebundenen Antikörper wurden im FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg) detektiert.

3.7 Ligand-Bindungsstudien

Die verschiedenen Myelomzellen (3×10^6) wurden in Triplikaten in 12-Well-Platten ausgesät und bei der Bindungsstudie mit GpL-TNC-TNF(32W/86T) mit dem TNFR1-spezifischen monoklonalen Antikörper H398 (10 $\mu\text{g/ml}$) oder bei der Bindungsstudie mit GpL-TNC-scTNF(143N/145R) mit einer Mischung aus TNC-scTNF(143N/145R) und TNF (je 3 $\mu\text{g/ml}$) für 1 h auf Eis vorinkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden alle Zellen für eine weitere Stunde mit dem TNFR1-spezifischen *Gaussia princeps* Luziferase-Fusionsprotein GpL-TNC-TNF(32W/86T) (200 ng/ml) bzw. mit dem TNFR2-spezifischen GpL-TNC-scTNF(143N/145R) (100 ng/ml) auf Eis inkubiert. Um den nicht gebundenen Liganden abzuwaschen wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 μl Medium mit 0,5 % FCS und Pen/Strep resuspendiert und in eine schwarze 96-Well-Flachbodenplatte pipettiert. Die Luziferase-Aktivität wurde mittels *Gaussia Luciferase* Assay Kit bestimmt. Hierzu wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 μl der Luziferaselösung (GpL-Substrat 1:100 in GpL-Puffer; *Gaussia Luciferase* Assay Kit, New England Biolabs, Frankfurt) gestartet und die Luziferase-Aktivität sofort im Luminometer (Lucy 2, Anthos Labtec, Krefeld) gemessen (Verweildauer: 1 Sekunde pro Well). Da die Luziferase-Aktivität schnell abnimmt, erfolgte die Messung spaltenweise auf der 96-Well-Platte. Durch vorangegangene Messungen mit GpL-Fusionsproteinen mit bekannter Konzentration wurde ein Messfehler von weniger als 5 % definiert und dieser bei den Auswertungen korrigiert. Die spezifische Bindung ist die Differenz der totalen Bindung (Luziferase-Aktivität von Zellen die nur mit GpL-Fusionsproteinen inkubiert wurden) zur nicht-spezifischen Bindung (Luziferase-Aktivität von

Zellen die vor der Inkubation mit GpL-Fusionsproteinen mit H398 bzw. einer Mischung aus TNC-sc-TNF(143N/145R) und TNF als Block-Reagenzien vorbehandelt wurden).

4 Ergebnisse

Das NF κ B-System spielt für das Multiple Myelom eine wichtige Rolle. Da es eine Reihe von Genen reguliert, die für das Zellüberleben wichtig sind, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob TNF, welches das NF κ B-System stark aktiviert, einen Einfluss auf das Überleben von Myelomzellen hat. TNF bindet an zwei Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, welche beide die Aktivierung von NF κ B-Transkriptionsfaktoren vermitteln. Um die Wirkung der beiden Rezeptoren unabhängig voneinander untersuchen zu können, sollten diese selektiv aktiviert werden.

4.1 Spezifische Stimulation von TNFR1 und TNFR2

Die Bindung von löslichem TNF induziert eine starke Aktivierung der TNFR1-vermittelten Signalwege, ist jedoch nicht in der Lage, TNFR2-vermittelte Signalwege zu aktivieren (Wajant *et al.*, 2003). Jedoch bindet lösliches TNF an beide TNF-Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2. Daher wurden zur spezifischen Stimulation der jeweiligen Rezeptoren TNF-Varianten mit Rezeptor-spezifischen Mutationen genutzt. Zur spezifischen Stimulation des TNFR1 wurde eine TNF-Mutante mit einer Arginin₃₂ zu Tryptophan und Serin₈₆ zu Threonin Substitution verwendet und zur spezifischen Stimulation des TNFR2 eine Mutante mit einer Asparaginsäure₁₄₃ zu Asparagin sowie einer Alanin₁₄₅ zu Arginin Substitution, welche beide bereits früher von Loetscher *et al.* beschrieben wurden (Loetscher *et al.*, 1993). Die zur Stimulation des TNFR1 verwendete Mutante TNF(32W/86T) wurde als trimeres Molekül eingesetzt. Der TNFR2 bindet zwar lösliches TNF, dies führt aber zu keiner bzw. einer nur sehr schwachen Aktivierung des Rezeptors. Es ist aber bekannt, dass die Aktivität mancher löslicher Liganden der TNF-Familie, wie z. B. OX40L (*tumor necrosis factor ligand superfamily member 4*) und TRAIL, durch Oligomerisierung gesteigert werden kann (Wajant *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2008). Daher wurde zur Stimulation des TNFR2 eine nonamere Variante, TNC-scTNF(143N/145R), verwendet. TNC-scTNF(143N/145R) besteht aus einer *single chain cassette* mit drei hintereinander geschalteten TNF-Domänen sowie der Trimerisierungsdomäne des Tenascin-C-Moleküls aus *Gallus gallus* und bildet ein trimeres Molekül mit neun TNF-Domänen. Diese Variante zeigte dann auch die erhoffte TNFR2-aktivierende Wirkung (Abbildung 5). Beide verwendeten TNF-Konstrukte verfügen zudem über ein Flag-Epitop (Abbildung 4).

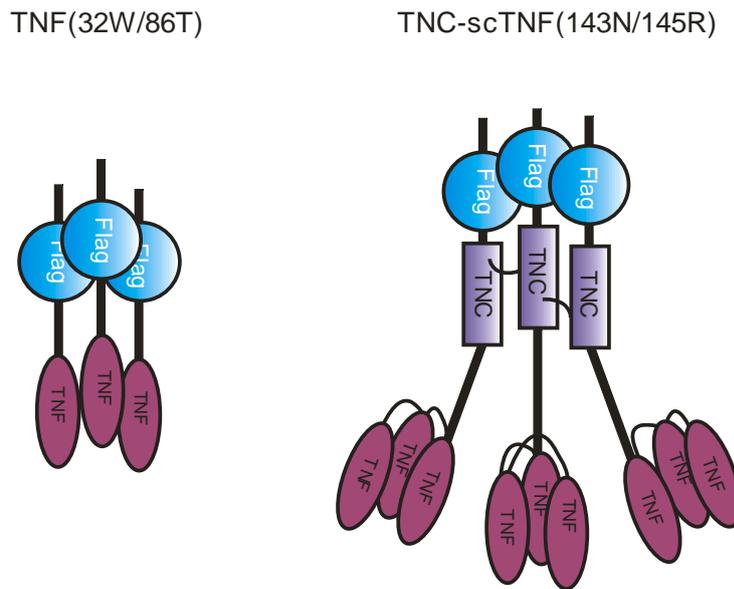


Abbildung 4: Struktur der TNF-Varianten TNF(32W/86T) und TNC-scTNF(143N/145R).

Flag-Aminosäuresequenz: D-Y-K-D-D-D-D-K, TNC: Trimerisierungsdomäne des Tenascin-C (Aminosäuren: 110-139). Die Nummerierung der Aminosäuren der TNF-Mutationen bezieht sich auf die lösliche, reife aus 157 Aminosäuren bestehende Form des Proteins.

Um die Spezifität der TNF-Varianten zu überprüfen, wurden sowohl HeLa-Zellen als auch HeLa-Zellen, welche den TNFR2 (HeLa-TNFR2) exprimieren, stimuliert und die IL8-Induktion gemessen. Während die TNFR1-spezifische Variante TNF(32W/86T) in beiden Zelllinien eine starke IL8-Produktion induzierte, führte die Behandlung mit der TNFR2-spezifischen Variante TNC-scTNF(143N/145R) nur in TNFR2-exprimierenden Zellen zu einer erhöhten IL8-Produktion (Abbildung 5A). Die durch TNC-scTNF(143N/145R)-induzierte IL8-Produktion war wesentlich schwächer als die durch Stimulation mit TNF(32W/86T) erreichbare. Dies passt dazu, dass der TNFR2 bekannterweise ein eher schwacher Aktivator des klassischen NF κ B-Signalweges ist (Weiss *et al.*, 1997). In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass TRAF1 die TNFR2-vermittelte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges und somit auch die IL8-Produktion verstärken kann (Wicovsky *et al.*, 2009). Daher wurde die TNC-scTNF(143N/145R)-induzierte IL8-Produktion auch in HeLa-Zellen untersucht, welche neben dem TNFR2 zusätzlich TRAF1 ektopisch exprimieren (HeLa-TNFR2-TRAF1). Es zeigte sich hier eine wesentlich höhere IL8-Induktion durch Stimulation mit dem nonameren TNFR2-spezifischen Konstrukt als in den HeLa-TNFR2-Zellen, die kein TRAF1 exprimieren (Abbildung 5A). Die durch TNC-scTNF(143N/145R), nicht aber durch TNF(32W/86T), induzierte IL8-Produktion konnte durch das antagonistisch wirkende TNFR2-Fc-Fusionsprotein inhibiert werden. Ebenso konnte die durch TNF(32W/86T), nicht aber die durch TNC-scTNF(143N/145R), induzierte IL8-Produktion durch ein antagonistisches

TNFR1-Fc-Fusionsprotein inhibiert werden (Abbildung 5B). Dies bestätigt nochmals die TNF-Rezeptorspezifität der gewählten Mutanten.

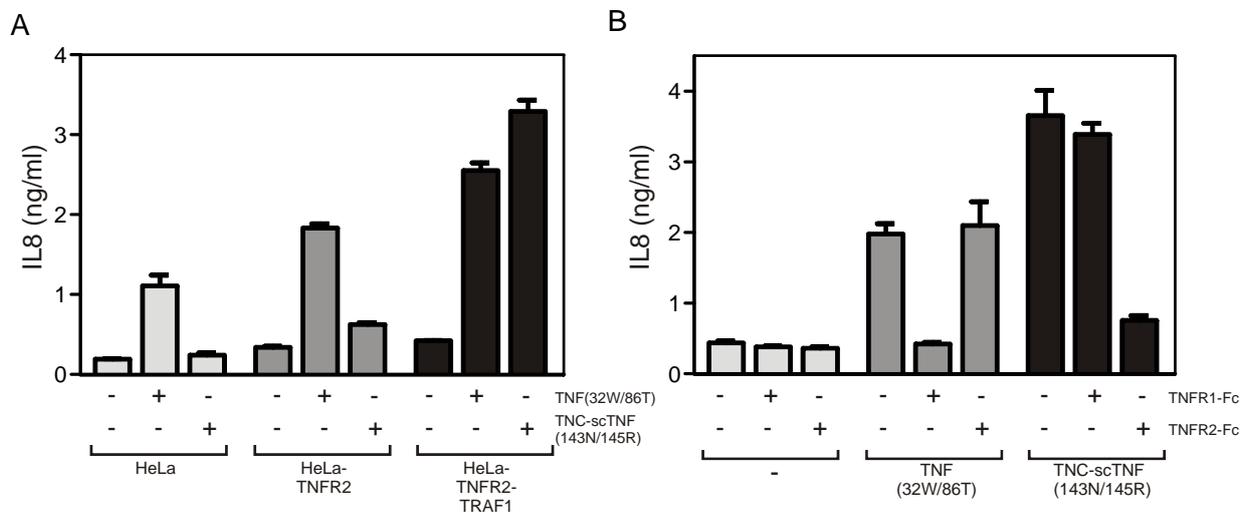


Abbildung 5: IL8-ELISA zur Untersuchung der Rezeptorspezifität der TNF-Varianten TNF(32W/86T) und TNC-scTNF(143N/145R).

A) HeLa-, HeLa-TNFR2- und HeLa-TNFR2-TRAF1-Zellen wurden in 96-Well-Platten (2×10^4 pro Well) ausgesät. Nach einem Mediumwechsel am nächsten Tag, um den Hintergrund gering zu halten, wurden sie mit je 200 ng/ml der unterschiedlichen löslichen Liganden für 18 h stimuliert. Anschließend wurde die IL8-Konzentration in den Zellüberständen mit Hilfe eines IL8-ELISA bestimmt. **B)** HeLa-TNFR2-TRAF1-Zellen wurden mit 200 ng/ml der Ligand-Varianten für 18 h in An- bzw. Abwesenheit von TNFR2-Fc (20 µg/ml) oder TNFR1-Fc (10 µg/ml) stimuliert. Die IL8-Konzentration in den Zellüberständen wurde wiederum mittels ELISA bestimmt.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse die TNFR1-spezifische Aktivität von TNF(32W/86T) als auch die TNFR2-spezifische Aktivität der TNC-scTNF(143N/145R)-Variante.

4.2 TNFR2-Stimulation aktiviert den alternativen NF κ B-Signalweg

Mit Hilfe der beiden rezeptorspezifischen TNF-Varianten konnten beide Rezeptoren unabhängig voneinander stimuliert und daher deren Signaltransduktion getrennt untersucht werden. Die Stimulation von HeLa-TNFR2-Zellen mit TNF(32W/86T) induzierte die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und dessen anschließende Degradation, beides Kennzeichen einer starken Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges. Die Stimulation der HeLa-TNFR2-Zellen mit der TNFR2-spezifischen Variante TNC-scTNF(143N/145R) hingegen zeigte keinen Effekt auf die Phosphorylierung oder Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Abbildung 6A). Dies passt zur bereits gezeigten, nur schwachen TNFR2-vermittelten Induktion des NF κ B-Zielgens IL8 (Abbildung 5A). Dass in den Western Blot-Analysen aber keine

Phosphorylierung und Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach TNFR2-spezifischer Stimulation in HeLa-TNFR2-Zellen deutlich wurde, könnte darauf beruhen, dass die IL8-Induktion im Vergleich zur Phosphorylierung und Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ sensitiver ist oder, dass noch andere Signalwege neben dem klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg bei der TNFR2-vermittelten IL8-Induktion eine Rolle spielen. Andere Arbeiten zeigten, dass die Stimulation des TNFR2 zur Degradation von TRAF2 führt (Duckett und Thompson, 1997; Fotin-Mleczek *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005), welches als inhibitorisches Molekül im alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg wirkt. Es sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Stimulation des TNFR2 den alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg aktiviert. Hierfür wurden HeLa-TNFR2-Zellen mit TNC-scTNF(143N/145R) für bis zu 18 h stimuliert. In Western Blot-Analysen von Gesamtzelllysaten konnte bereits nach 6 h eine deutliche Abnahme der TRAF2-Expression nachgewiesen werden, was für die Degradation von TRAF2 spricht (Abbildung 6B). Weiterhin konnte auch eine Akkumulation des IKK1-aktivierenden NIK-Proteins und die Prozessierung des Vorläuferproteins p100 zu p52 detektiert werden (Abbildung 6C und D). TRAF2-Degradation, NIK-Akkumulation und p100-Prozessierung sind typische biochemisch fassbare Merkmale der Aktivierung des alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges. Die Stimulation des TNFR2 führt also offensichtlich zur Aktivierung des alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges. Die Stimulation des TNFR1 mit TNF(32W/86T) hingegen resultierte lediglich in einem Anstieg der totalen p100/p52-Expression, jedoch in keinem Anstieg des p52-p100 Verhältnisses und daher in keiner verstärkten Prozessierung von p100 zu p52 (Abbildung 6D), also keiner Aktivierung des alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges. Diese Beobachtung beruht darauf, dass p100 ein Zielgen des klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges ist und durch die Stimulation des TNFR1 mit TNF(32W/86T) induziert wird.

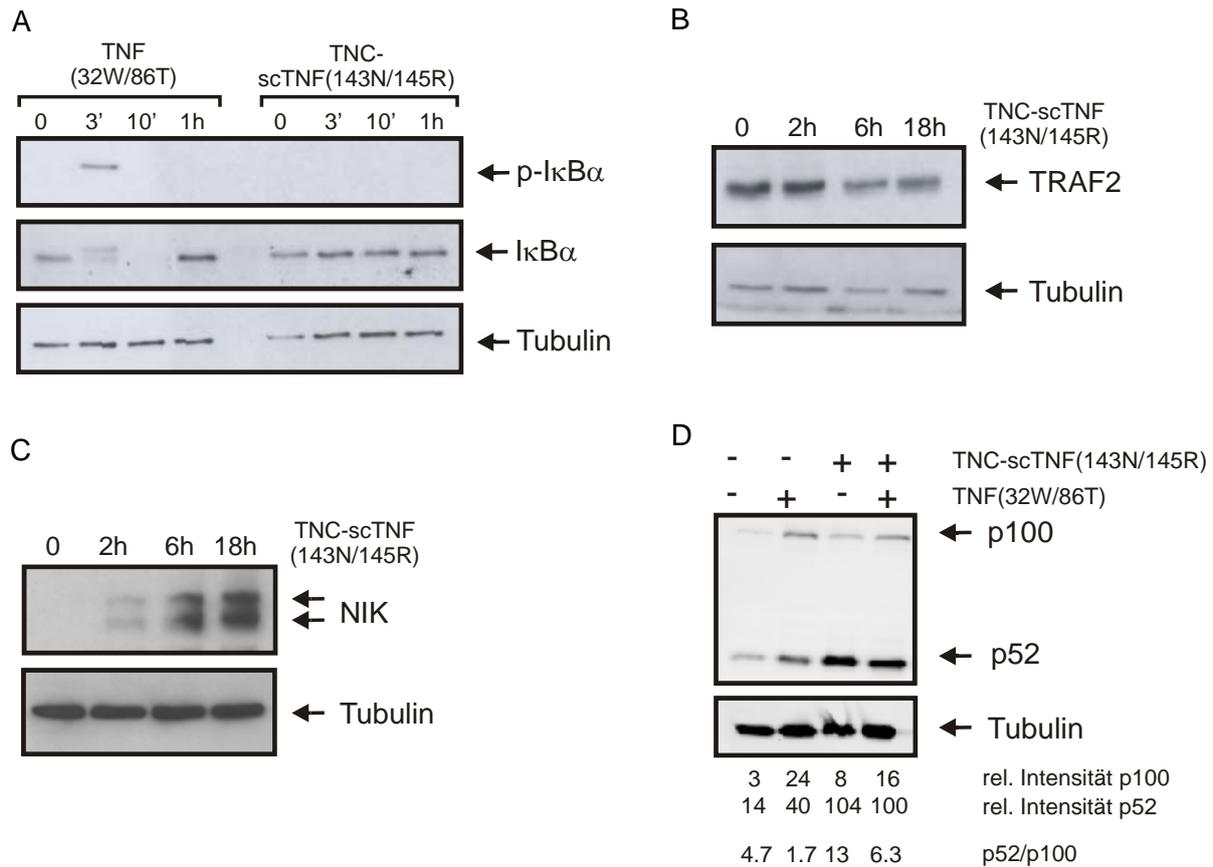


Abbildung 6: Western Blot-Analysen zur Aktivierung des klassischen und alternativen NFκB-Signalweges durch die TNF-Varianten TNF(32W/86T) und TNC-scTNF(143N/145R).

Gesamtzelllysate wurden mittels Western Blot auf die Expression verschiedener Proteine hin untersucht. In **A**) wurden HeLa-TNFR2-Zellen mit 200 ng/ml TNF(32W/86T) bzw. TNC-scTNF(143N/145R) für die angegebenen Zeitwerte stimuliert, anschließend lysiert und die Phosphorylierung und Degradation von IκBα untersucht. In **B**) wurden HeLa-TNFR2-Zellen für die angegebene Dauer mit 200 ng/ml TNC-scTNF(143N/145R) stimuliert und die Lysate auf die Expression von TRAF2 hin untersucht. In **C**) wurden wie in B) HeLa-TNFR2-Zellen mit TNC-scTNF(143N/145R) stimuliert und anschließend die Gesamtzelllysate bezüglich der NIK-Expression untersucht. **D**) HeLa-TNFR2-Zellen wurden mit den angegebenen Mischungen der Liganden (je 200 ng/ml) für 18 h stimuliert und die p100-Prozessierung anschließend im Western Blot untersucht und mit Hilfe des Odyssey® Infrarot *imaging* Systems quantifiziert und als relative Intensität dargestellt.

Eine Konsequenz der Aktivierung der NFκB-Signalwege ist die Translokation von NFκB-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Diese Transkriptionsfaktoren liegen als Homo- oder Heterodimere vor. Sowohl p65, als auch p50 werden durch den klassischen NFκB-Signalweg reguliert, p52 und RelB hingegen primär durch den alternativen NFκB-Signalweg (Dai *et al.*, 2007). Zur Analyse der Translokation der genannten Transkriptionfaktoren in den Zellkern wurden HeLa-TNFR2-Zellen mit TNF(32W/86T) und TNC-scTNF(143N/145R) behandelt und anschließend die Proteine der Zytoplasma- und Kernfraktionen isoliert. Western Blot-Analysen zeigten, dass sich nach Stimulation mit TNC-scTNF(143N/145R) die Menge an nuklear lokalisiertem p52 und RelB erhöht, wohingegen die Stimulation des

TNFR1 wenig Einfluss auf die Kernlokalisierung dieser Proteine hat. Lediglich bei p52 konnte eine leichte Zunahme der nuklearen Lokalisation detektiert werden, was auf der bereits diskutierten gesteigerten p100-Synthese durch TNFR1-vermittelte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges beruhen könnte. Die Stimulation des TNFR2 zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Kerntranslokation von p65 und p50, wohingegen die TNFR1-Stimulation die Translokation dieser beiden Transkriptionsfaktoren in den Zellkern stark induzierte (Abbildung 7).

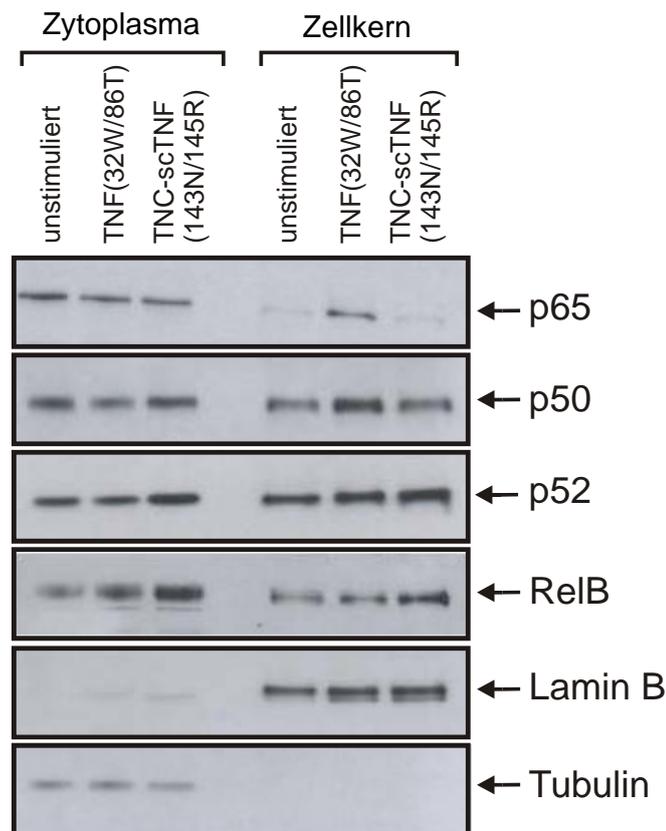


Abbildung 7: Die Stimulation von TNFR2 induziert die Translokation von p52 und RelB in den Zellkern.

HeLa-TNFR2-Zellen wurden mit 200 ng/ml TNF(32W/86T) für 45 min oder mit 200 ng/ml TNC-scTNF(143N/145R) für 18 h behandelt. Anschließend wurden mit Hilfe der *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* die zytoplasmatischen und nuklearen Proteinfractionen isoliert und im Western Blot auf die Expression der angegebenen Proteine hin untersucht. Als Kontrollen dienen Tubulin für die zytoplasmatischen und Lamin B für die zellkernspezifischen Proteine.

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass die spezifische Stimulation des TNFR2 zur Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges in HeLa-TNFR2-Zellen führt. Dies konnte ebenfalls in weiteren Zelllinien und primären T-Zellen nachgewiesen werden (Rauert *et al.*, 2010).

4.3 TNF-Rezeptor-Expression auf Myelomzellen

In 80 % primärer Myelomproben wurde ein Genexpressionsmuster nachgewiesen, welches charakteristisch für Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie ist und in 20 % der untersuchten Fälle waren zudem Mutationen in Genen nachweisbar, die für Proteine kodieren, welche an der NF κ B-Signaltransduktion beteiligt sind und eine autonome NF κ B-Aktivierung bewirken können (Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007). Dies spricht dafür, dass für das Überleben von Myelomzellen das NF κ B-System wichtig ist bzw. dass das NF κ B-System eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Myelomzellen spielt. Da TNFR1 die Aktivierung des klassischen und TNFR2 die des alternativen NF κ B-Signalweges induziert wurde in dieser Arbeit die Bedeutung und Funktion von TNF und seinen Rezeptoren für Myelomzellen untersucht. Hierbei lag der Focus auf der Untersuchung der Apoptosesensitivität, da das NF κ B-System bekanntermaßen überaus wichtig für die Expression antiapoptotischer Faktoren ist und oftmals Therapieresistenz induziert.

Verschiedene Myelomzelllinien wurden auf die Expression der TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mit Ausnahme der Zelllinie U266 exprimierten alle untersuchten Myelomzelllinien TNFR2. Eine Expression des TNFR1 war nur in einem Teil der untersuchten Zelllinien (MM.1S, RPMI8226 und KMS-12-BM) nachweisbar (Abbildung 8).

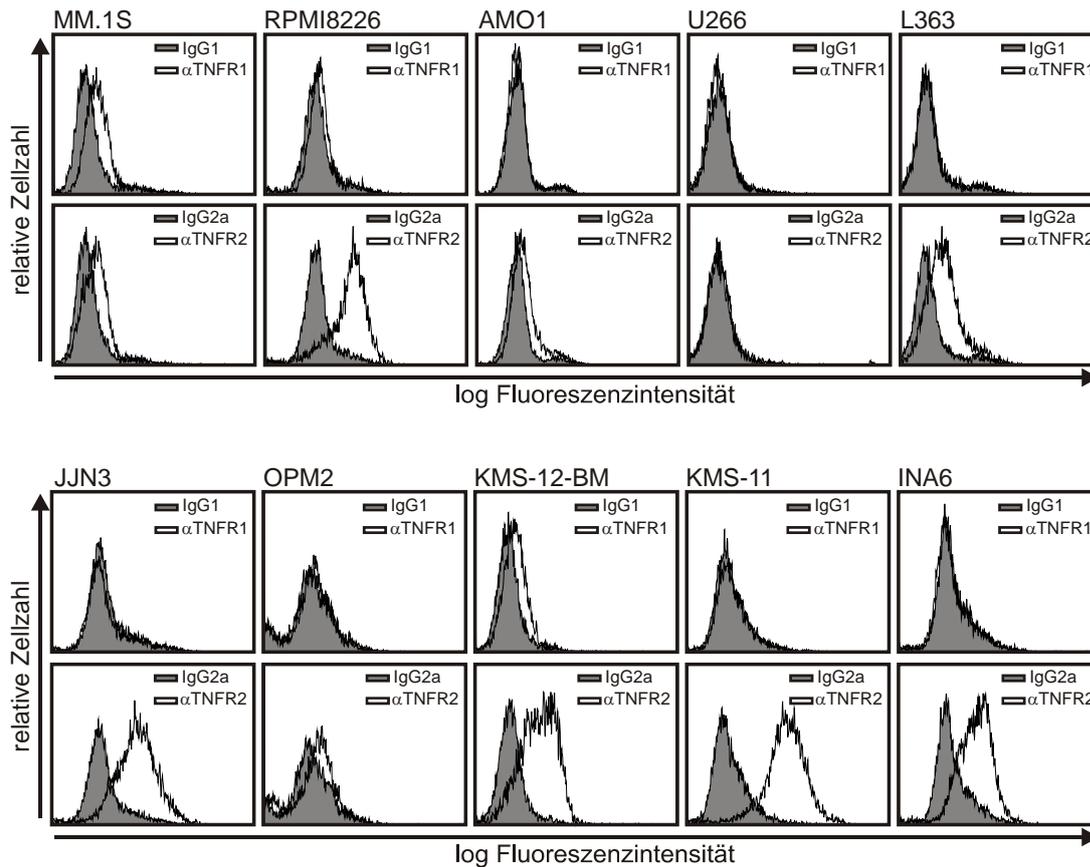


Abbildung 8: Analyse der TNFR1- und TNFR2-Expression auf Myelomzelllinien mittels Durchflusszytometrie.

Die genannten Myelomzelllinien wurden mit Phycoerythrin-markierten Antikörpern, welche den TNFR1 oder den TNFR2 erkennen bzw. den entsprechenden Isotypkontroll-Antikörpern (IgG1 oder IgG2a) inkubiert. Anschließend wurde die Expression der Rezeptoren an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Eine sensitivere Methode zur Detektion der Zelloberflächen-Expression von Rezeptoren sind Bindungsstudien mit *Gaussia princeps* Luziferase-Fusionsproteinen (Fick *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012). Zum Nachweis der Expression von TNF-Rezeptoren auf Myelomzellen wurden daher Fusionsproteine mit den in 4.1 beschriebenen TNFR1- und TNFR2-spezifischen TNF-Varianten generiert, welche N-terminal eine *Gaussia princeps* Luziferase-Reporterdomäne (GpL) tragen (Tannous *et al.*, 2005). Mit dem TNFR1-spezifischen Fusionsprotein GpL-TNC-TNF(32W/86T) konnte, zusätzlich zu den in FACS-Analysen als TNFR1-positiv identifizierten MM.1S-, RPMI8226- und KMS-12-BM-Zellen, auch in den Zelllinien U266, OPM2, KMS-11, INA6 und JJN3 eine spezifische Bindung und somit eine TNFR1-Expression nachgewiesen werden. In AMO1- und L363-Zellen konnte aber selbst mit diesem hochsensitiven Assay keine TNFR1-Expression detektiert werden (Abbildung 9). Ligand-Bindungsstudien mit der TNFR2-spezifischen Variante GpL-TNC-scTNF(143N/145R) bestätigten die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche aller Zelllinien, die auch in den FACS-Analysen als TNFR2-positiv identifiziert wurden (Abbildung 8 und Abbildung 9).

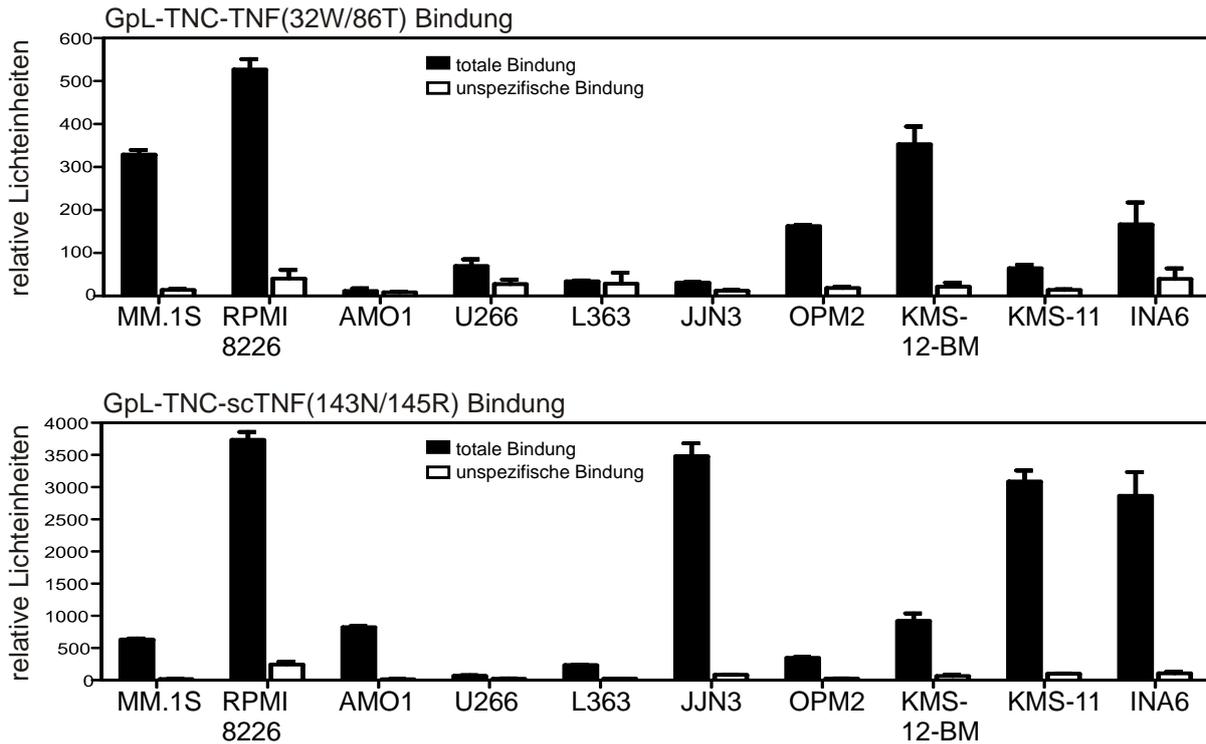


Abbildung 9: Ligand-Bindungsstudien an TNFR1 und TNFR2 in Myelomzelllinien.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden die angegebenen Zelllinien mit dem TNFR1-spezifischen monoklonalen Antikörper H398 (10 µg/ml) bei der Bindungsstudie mit GpL-TNC-TNF(32W/86T) oder einer Mischung aus TNC-scTNF(143N/145R) und TNF (je 3 µg/ml) bei der Bindungsstudie mit GpL-TNC-scTNF(143N/145R) 1 h auf Eis vorinkubiert (weiße Balken). Die für die Bestimmung der totalen Bindung vorgesehenen Zellen blieben hingegen unbehandelt (schwarze Balken). Anschließend wurden alle Gruppen mit dem TNFR1-spezifischen (200 ng/ml) oder TNFR2-spezifischen (100 ng/ml) GpL-Fusionsprotein für eine weitere Stunde inkubiert und nach dem Entfernen der ungebundenen Liganden deren Bindung an die Zellen durch einen Standardluziferaseassay bestimmt.

In den drei Zelllinien MM.1S, RPMI8226 und KMS-12-BM, die bereits in der FACS-Analyse eine deutliche Expression des TNFR1 zeigten, und in zwei der in den sensitiveren Ligand-Bindungsstudien identifizierten Zelllinien OPM2 und INA6, konnte durch Stimulation des TNFR1 mit TNF(32W/86T) eine Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges (Phosphorylierung und Degradation von IκBα) nachgewiesen werden. In MM.1S-, U266-, INA6-, AMO1- und KMS-12-BM-Zellen konnte eine, wenn auch nur schwache, Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges nach Stimulation mit der TNFR2-spezifischen Variante TNC-scTNF(143N/145R) in Form der Phosphorylierung und Degradation von IκBα gezeigt werden (Abbildung 10).

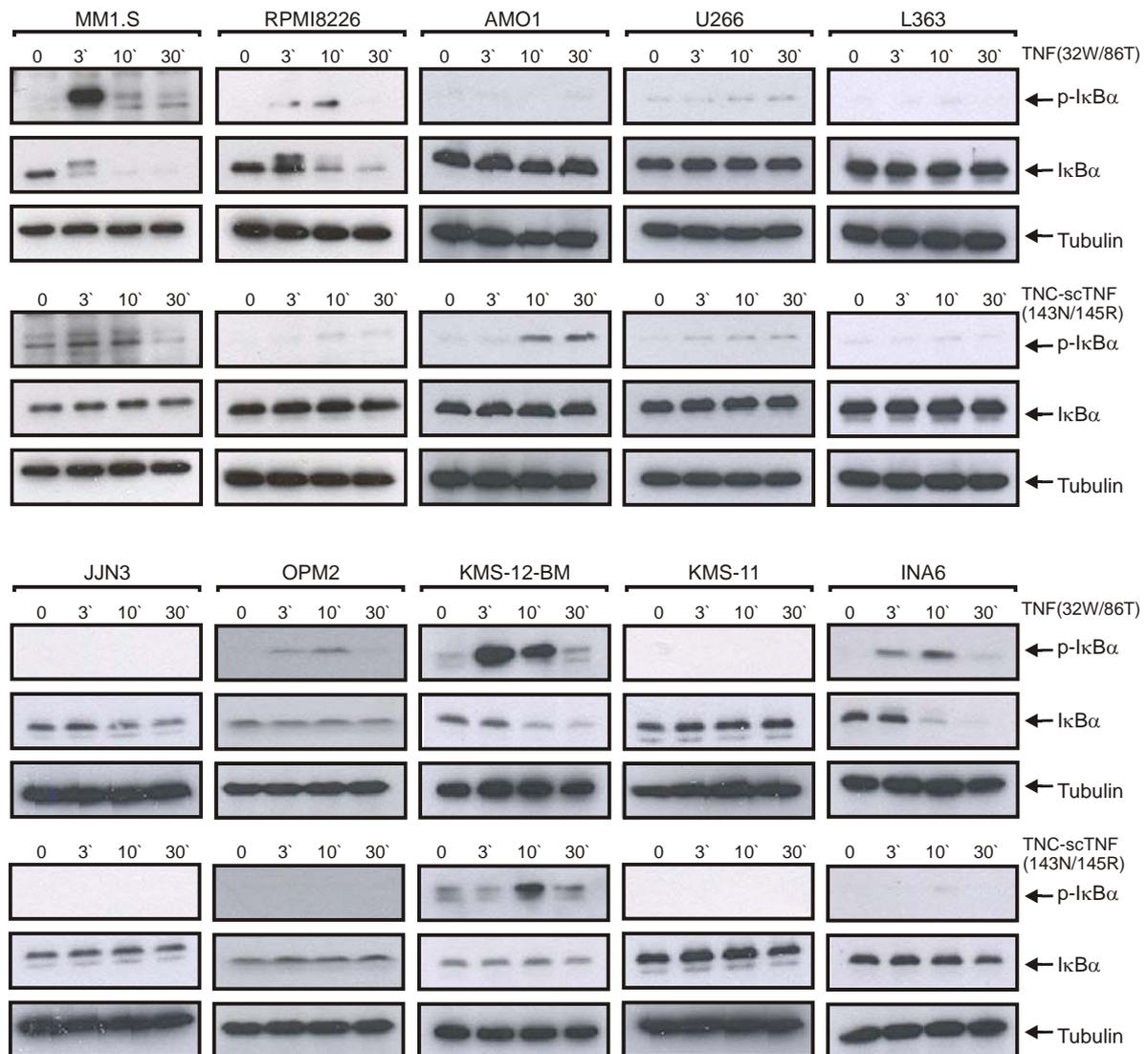


Abbildung 10: Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TNFR1 und TNFR2 in Myelomzellen.

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit 200 ng/ml TNF(32W/86T) oder TNC-scTNF(143N/145R) für die angegebene Dauer stimuliert. Danach wurden Gesamtzelllysate auf die Phosphorylierung und Degradation von I κ B α mittels Western Blot untersucht.

Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges wurde weiterhin durch Analyse der Proteinexpression typischer Zielgene des NF κ B-Signalweges, wie RelB, TRAF1, cIAP2 und p100 untersucht. In Übereinstimmung mit den Experimenten zur I κ B α -Phosphorylierung und -Degradation (Abbildung 10) wurde die Expression dieser Proteine durch TNFR1-Stimulation in MM.1S-, RPMI8226-, KMS-12-BM- und INA6-Zellen deutlich erhöht. Lediglich eine Zelllinie (AMO1) zeigte nach Stimulation des TNFR2 eine Proteinexpression, welche für die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges typisch ist (Abbildung 11).

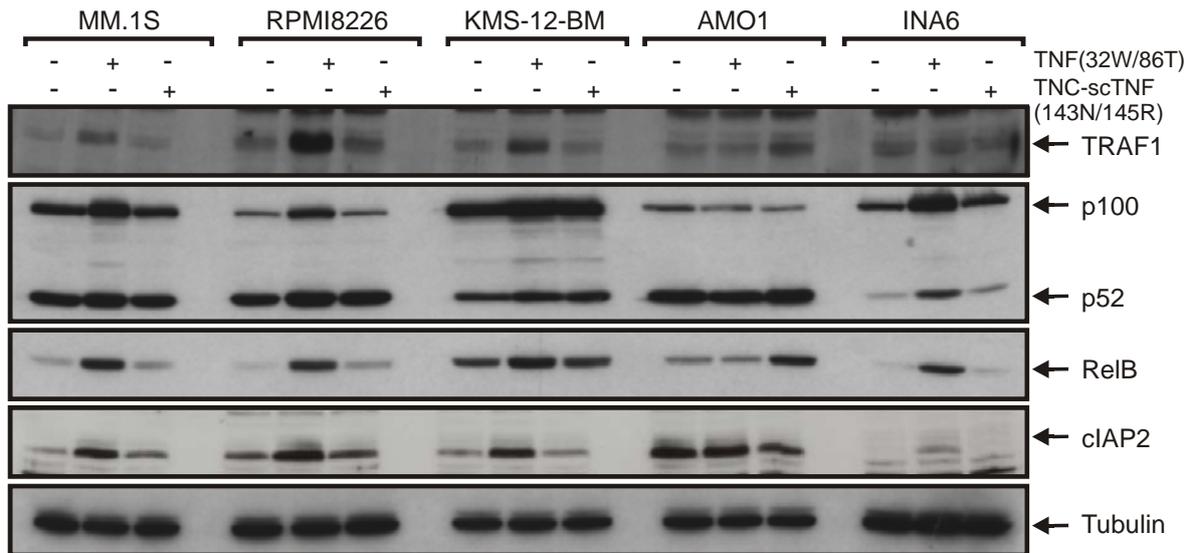


Abbildung 11: Expression von NF κ B-regulierten Proteinen durch Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 in Myelomzellen.

Diverse Myelomzelllinien wurden mit 200 ng/ml der TNFR1- bzw. der TNFR2-spezifischen TNF-Variante für 24 h stimuliert. Anschließend wurden Gesamtzelllysate auf die Expression der verschiedenen Proteine hin im Western Blot untersucht.

In der Summe zeigte sich also, dass in zehn analysierten Myelomzelllinien zwar alle bis auf U266 den TNFR2 an der Zelloberfläche exprimierten, jedoch nur eine davon (AMO1) auf eine Stimulation dieses Rezeptors mit der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges deutlich reagierte. In den Zelllinien jedoch, die deutlich TNFR1 exprimierten (MM.1S, RPMI8226, KMS-12-BM und INA6) war nach spezifischer Stimulation eine eindeutige und robuste Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges zu beobachten.

4.4 TNF reguliert den TRAIL- und CD95L-induzierten Zelltod in Myelomzellen unterschiedlich

Ein möglicher Effekt der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges ist die Induktion antiapoptotischer Gene. Um den eventuell schützenden Effekt der TNFR1-vermittelten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges zu untersuchen, wurden die in 4.3 identifizierten TNFR1-responsiblen MM.1S-, RPMI8226- und KMS-12-BM-Zellen mit TNF vorbehandelt und anschließend für 24 h mit den Todesliganden TRAIL und CD95L, dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib, dem Akt-Inhibitor Akti-1/2 oder dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 stimuliert und die Vitalität der Zellen bestimmt. In allen untersuchten Zelllinien zeigte die alleinige Stimulation des TNFR1 keinen oder einen nur sehr schwachen Effekt auf das

Zellüberleben (Abbildung 12A). Die Stimulation der TRAIL-Todesrezeptoren (TRAILR1 und TRAILR2) oder von CD95 hingegen induzierte sehr effektiv Zelltod (Abbildung 12B).

Die Zytotoxizität der pharmakologischen Inhibitoren Bortezomib, Akti-1/2 und NVP-AUY922 wurde durch eine TNF-Vorstimulation in den untersuchten Zelllinien kaum beeinflusst (Abbildung 12B). Somit scheint eine Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges keinen größeren Einfluss auf die direkte zytotoxische Wirkung dieser Medikamente auf Myelomzellen zu haben. Allerdings zeigte sich ein deutlicher Effekt der TNF-Vorstimulation auf den TRAIL- und CD95L-induzierten Zelltod in MM.1S- und RPMI8226-Zellen (Abbildung 12B und Abbildung 13). Die MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden durch die TNF-Vorstimulation für den CD95L-vermittelten Zelltod sensitiviert, vor dem TRAIL-vermittelten Zelltod aber geschützt. In den ebenfalls untersuchten KMS-12-BM-Zellen war lediglich ein schwacher sensitivierender Effekt der TNF-Vorstimulation auf das Zellüberleben nach Stimulation mit den beiden Liganden TRAIL und CD95L zu detektieren (Abbildung 12B). Der gegenläufige Effekt der TNF-Vorstimulation auf den TRAIL- bzw. den CD95L-induzierten Zelltod in MM.1S- und RPMI8226-Zellen war unerwartet und wurde weiter untersucht.

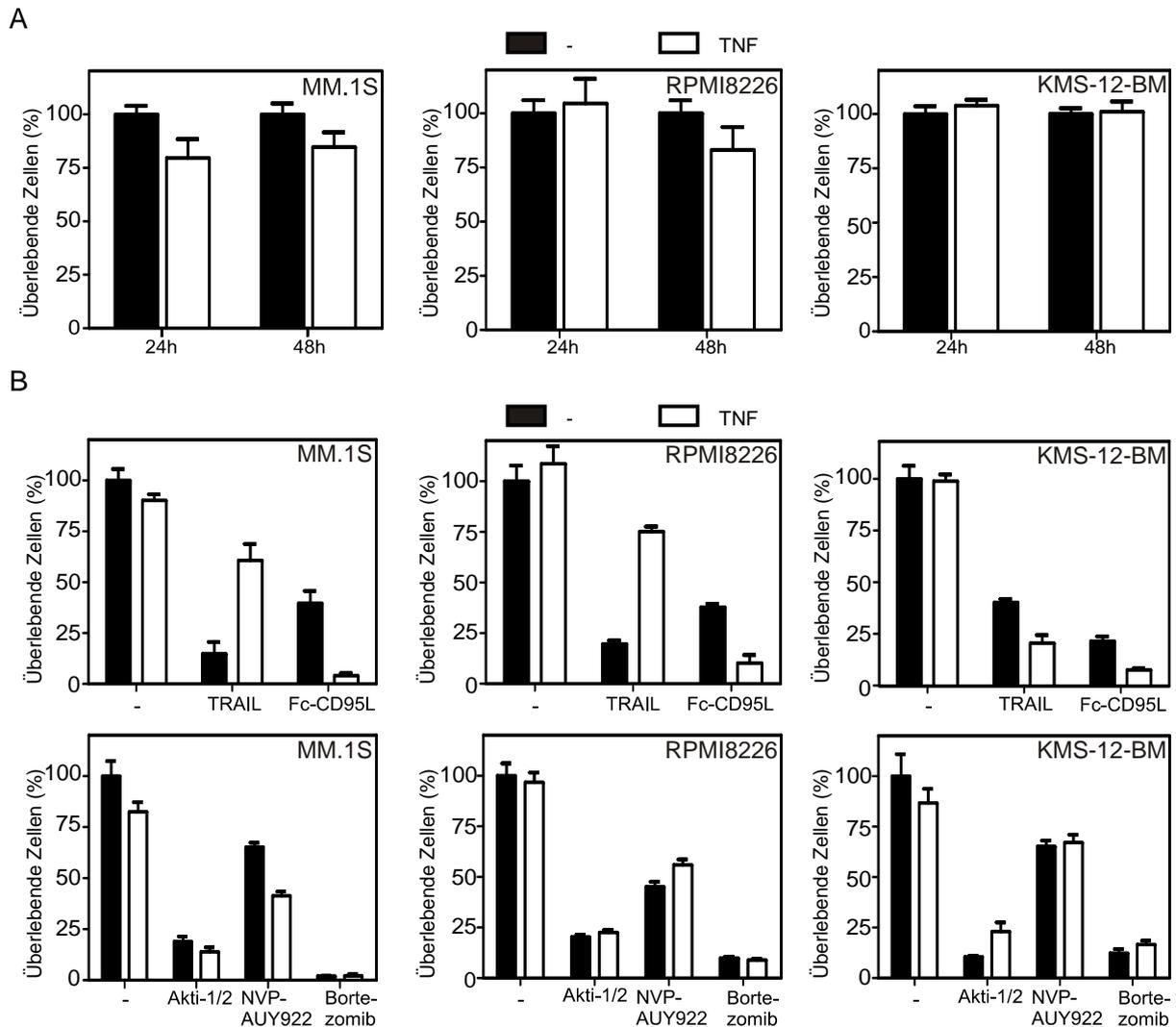


Abbildung 12: Auswirkung einer TNF-Vorstimulation auf den zytotoxischen Effekt verschiedener Stimuli.

A) MM.1S-, RPMI8226- und KMS-12-BM-Zellen wurden in Triplikaten mit 50 ng/ml TNF behandelt oder blieben unbehandelt. Das Zellüberleben wurde dann nach 24 oder 48 h durch MTT-Färbung bestimmt. **B)** Die verschiedenen Zelllinien wurden mit 50 ng/ml TNF für 18 h vorstimuliert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h mit TRAIL (MM.1S und RPMI8226: 100 ng/ml; KMS-12-BM: 200 ng/ml), Fc-CD95L (MM.1S: 2,5 ng/ml; RPMI8226: 10 ng/ml; KMS-12-BM: 1 ng/ml), Akti-1/2 (MM.1S: 10 μ M; RPMI8226 und KMS-12-BM: 50 μ M), NVP-AUY922 (MM.1S: 400 nM; RPMI8226 und KMS-12-BM: 1000 nM) und Bortezomib (MM.1S: 5 nM; RPMI8226 und KMS-12-BM: 20 nM) behandelt. Mit Hilfe der MTT-Färbung wurde dann die Zellvitalität bestimmt.

Um den gegenläufigen Effekt der TNF-Vorstimulation auf die TRAIL- und CD95L-induzierte Apoptose tiefergehend zu untersuchen, wurden auch Titrations-Zytotoxizitätsassays durchgeführt. In diesen Experimenten zeigte sich wieder eine deutliche Sensitivierung für den CD95L-induzierten Zelltod nach TNF-Vorstimmung und Schutz vor der TRAIL-induzierten Apoptose (Abbildung 13).

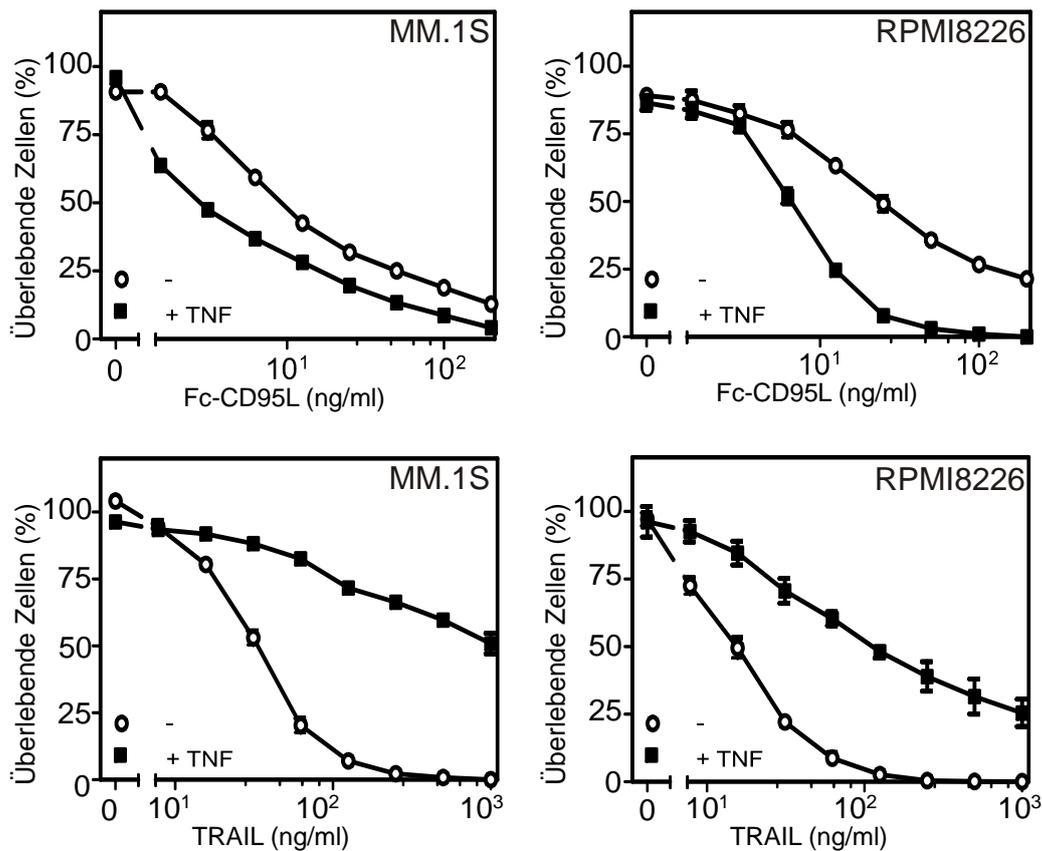


Abbildung 13: TNF-Vorstimulation sensitiviert Myelomzellen für CD95L-induzierten Zelltod und schützt vor TRAIL-induziertem Zelltod.

MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden mit 50 ng/ml TNF für 18 h vorinkubiert und danach mit steigenden Konzentrationen von TRAIL bzw. Fc-CD95L für 24 h stimuliert. Das Zellüberleben wurde mittels MTT-Färbung bestimmt.

Aus den dargelegten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TNF MM.1S- und RPMI8226-Zellen für CD95L-induzierte Apoptose sensitiviert und sie vor TRAIL-induziertem Zelltod schützt. Da CD95 und die TRAIL-Todesrezeptoren die gleichen Rezeptor-vermittelten Mechanismen nutzen, um Zelltod zu induzieren (Wajant, 2006), war der gegenläufige Effekt der TNF-Vorstimulation auf das Zellüberleben von TRAIL- und CD95L-stimulierten MM.1S- und RPMI8226-Zellen sehr überraschend und wurde weiter analysiert.

4.5 TNF sensitiviert Myelomzellen für den CD95L-induzierten Zelltod durch TNFR1-vermittelte CD95-Hochregulation

Die TRAIL-Todesrezeptoren und CD95 können Zelltod nicht nur durch Caspase-8-vermittelte Apoptose induzieren, sondern auch durch Caspase-8-unabhängige Induktion von Nekrose mit Hilfe der Serin/Threonin Kinasen RIP1 und RIP3 (*receptor interacting protein 3*) (Vandenabeele *et al.*, 2010). Um zu klären, ob CD95L und TRAIL die gleichen Mechanismen zur Induktion des Zelltodes in Myelomzellen nutzen oder aber der differentielle Effekt der TNF-Vorstimulation möglicherweise mit der unterschiedlichen Induktion von Nekrose und Apoptose durch TNF korreliert, wurden die Zellen mit dem Caspase-Inhibitor zVAD und/oder dem RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 vorbehandelt. In MM.1S-Zellen war zVAD vollkommen ausreichend, um sowohl den CD95L-, als auch den TRAIL-induzierten Zelltod zu verhindern, insbesondere hatte eine TNF-Vorstimulation hierauf keinen Einfluss (Abbildung 14). In RPMI8226-Zellen schützte der Caspase-Inhibitor zVAD allerdings nur zum Teil vor dem durch die beiden Liganden induzierten Zelltod. Die weitere Zugabe von Necrostatin-1 konnte aber nach Stimulation mit sowohl CD95L als auch mit TRAIL den schützenden Effekt von zVAD verstärken und somit das Zellüberleben steigern. Dies zeigte, dass RPMI8226-Zellen im Vergleich zu MM.1S-Zellen auf die Aktivierung der Todesrezeptoren nicht nur mit apoptotischem Zelltod reagieren, sondern auch zusätzlich Nekrose induzieren (Abbildung 14). Aber auch in den RPMI8226-Zellen zeigte sich weder ein Einfluss der TNF-Vorstimulation auf die den Zelltod vermittelnden zellulären Mechanismen noch eine unterschiedliche Nutzung dieser Mechanismen durch CD95 und die TRAIL-Rezeptoren. Der unterschiedliche Effekt der TNFR1-Stimulation auf die Zelltodinduktion durch CD95L und TRAIL beruht daher nicht auf der Nutzung unterschiedlicher Zelltodmechanismen.

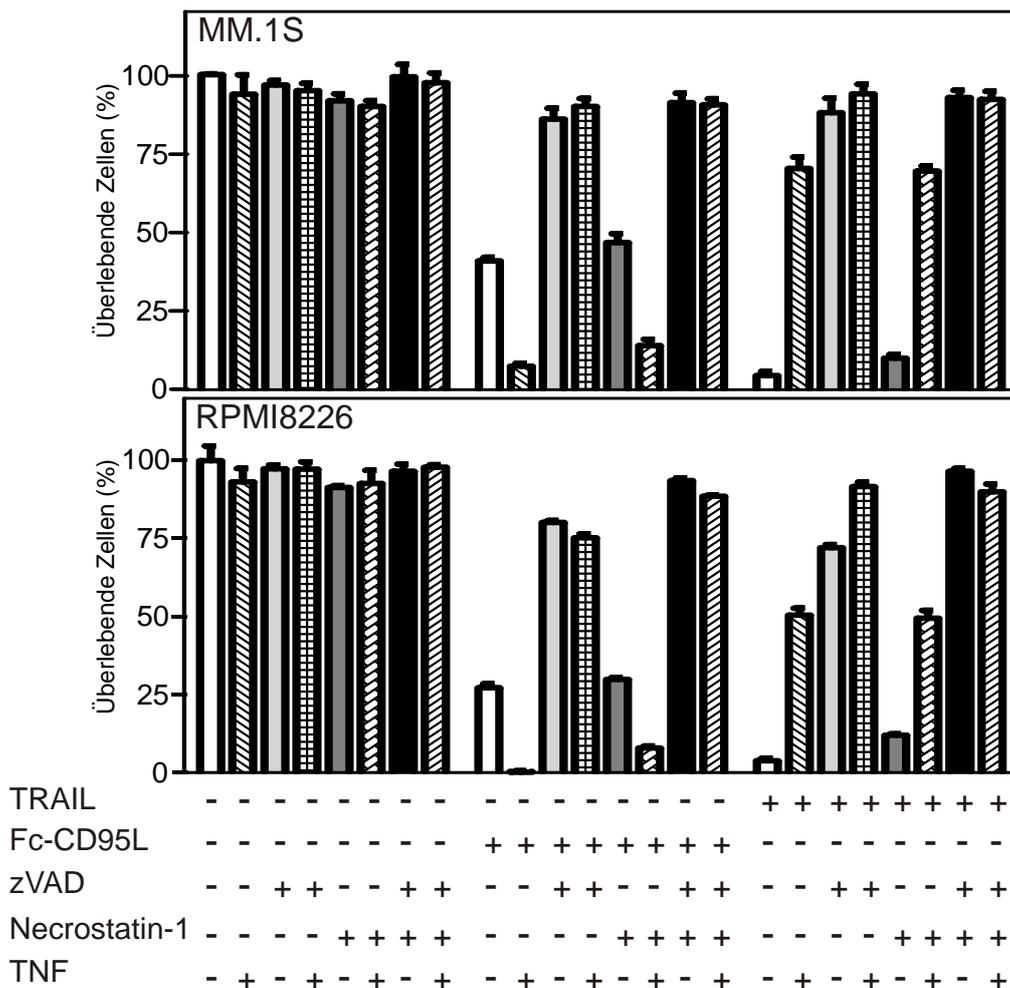


Abbildung 14: Analyse der molekularen Mechanismen von TRAIL und CD95L zur Zelltodinduktion in Myelomzellen.

MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden mit TNF (50 ng/ml) 18 h vorinkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen wie angegeben mit TRAIL (200 ng/ml), Fc-CD95L (MM.1S: 30 ng/ml; RPMI8226: 60 ng/ml), zVAD (40 μ M) und Necrostatin-1 (90 μ M) behandelt. Das Zellüberleben wurde mittels MTT-Färbung nach 24 h bestimmt.

Ein wichtiger Faktor, der die Sensitivität einer Zelle für die Aktivierung des Apoptosesignalweges bestimmt, ist unter anderem die Expression der Todesrezeptoren an der Zelloberfläche. Es wurde daher untersucht, ob die Stimulation mit TNF die Expression von CD95 und/oder der TRAIL-Rezeptoren reguliert. FACS-Analysen zeigten keine Veränderung der TRAILR1- und TRAILR2-Expression nach einer TNF-Vorstimulation, allerdings fand sich eine deutliche TNF-induzierte Hochregulation der CD95-Expression in den untersuchten MM.1S- und RPMI8226-Zellen (Abbildung 15).

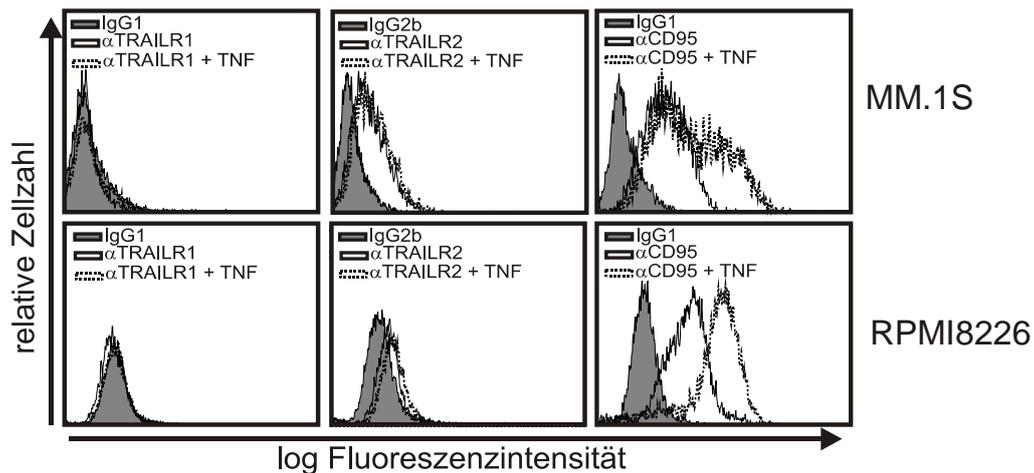


Abbildung 15: FACS-Analyse der Expression von TRAILR1, TRAILR2 und CD95.

MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden für 18 h mit 200 ng/ml TNF stimuliert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde die Expression der Todesrezeptoren an der Zelloberfläche mittels FACS-Analyse untersucht.

Die auf der Zelloberfläche mittels FACS beobachtete gesteigerte Expression von CD95 spiegelte sich auch in Western Blot-Analysen von Gesamtzelllysaten der Myelomzellen wieder. Darüber hinaus war eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins cFLIP_{Long}, das durch den klassischen NF κ B-Signalweg reguliert wird, im Western Blot nachweisbar (Abbildung 16). Dies passt zu der protektierenden Wirkung der TNF-Vorstimulation auf die TRAIL-induzierte Apoptose. Im Falle des CD95-vermittelten Zelltodes allerdings, scheint die antiapoptotische Wirkung dieses Proteins durch die Hochregulation des Todesrezeptors CD95 mehr als kompensiert zu werden.

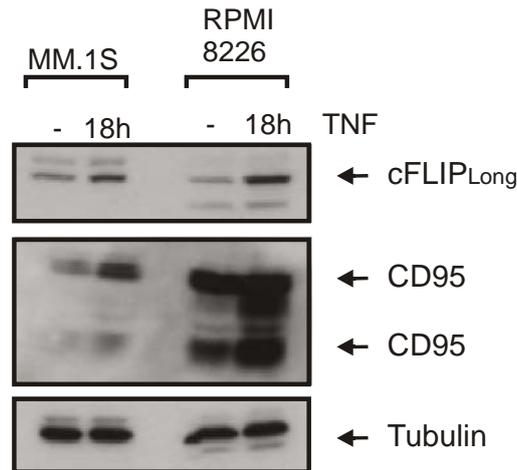


Abbildung 16: Western Blot-Analyse der Expression von CD95 und cFLIP_{Long}.

MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden mit 200 ng/ml TNF für 18 h stimuliert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden Gesamtzelllysate auf die Expression von CD95 und cFLIP_{Long} hin mittels Western Blot untersucht.

Da lösliches TNF bekanntermaßen hauptsächlich den TNFR1 stimuliert (Grell *et al.*, 1995; Grell *et al.*, 1998), sollte der Effekt der TNF-Vorstimulation auf den CD95L- und TRAIL-vermittelten Zelltod auf der Aktivierung des TNFR1 basieren. Um dies zu überprüfen, wurden zur Vorstimulation der Zellen die in Abschnitt 4.1 beschriebenen TNFR1- und TNFR2-spezifischen löslichen TNF-Varianten TNF(32W/86T) und TNC-scTNF(143N/145R) genutzt. Mit der TNFR1-spezifischen TNF-Variante zeigten sich dieselben Effekte wie bei den Experimenten, in denen die Zellen mit Wildtyp-TNF vorstimuliert wurden. So zeigten FACS-Analysen wiederum eine deutliche Hochregulation des Todesrezeptors CD95 (Abbildung 17A) und in Zytotoxizitätsassays wurde erneut die Sensitivierung der Zellen für den CD95L-induzierten Zelltod beobachtet. Die selektive Vorstimulation des TNFR1 schützte gleichfalls wie das Wildtyp-TNF vor dem TRAIL-induzierten Zelltod (Abbildung 17B). Die Vorstimulation der Zellen mit der TNFR2-spezifischen Variante TNC-scTNF(143N/145R) hingegen zeigte keinen Effekt weder auf die Oberflächenexpression des CD95-Moleküls noch auf den durch TRAIL- und CD95L-induzierten Zelltod (Abbildung 17).

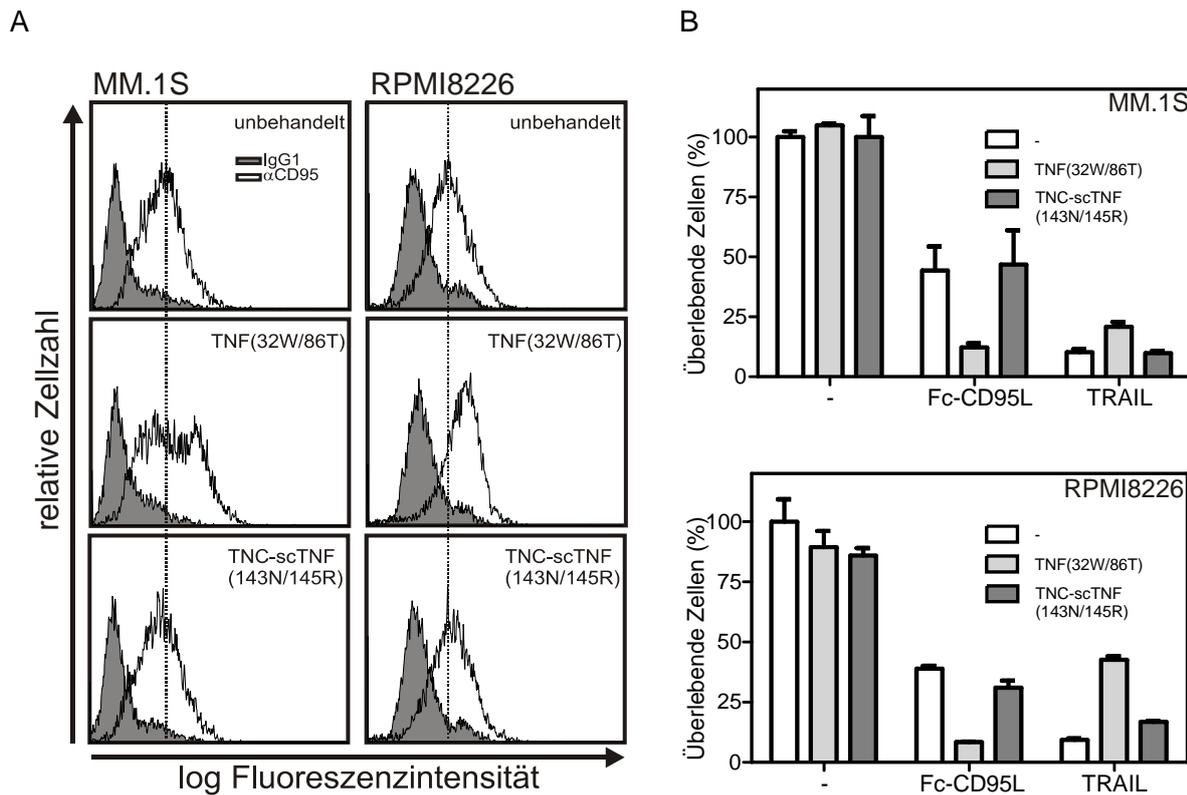


Abbildung 17: TNFR1 vermittelt unterschiedliche Effekte von TNF auf TRAIL- und CD95L-induzierten Zelltod in Myelomzelllinien.

A) MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden mit 200 ng/ml der TNFR1- bzw. TNFR2-spezifischen TNF-Varianten TNF(32W/86T) und TNC-scTNF(143N/145R) für 18 h stimuliert oder blieben unbehandelt. Die CD95-Zelloberflächenexpression wurde mittels FACS-Analyse untersucht. **B)** MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden wiederum mit den TNF-Varianten TNF(32W/86T) (50 ng/ml) und TNC-scTNF(143N/145R) (200 ng/ml) für 18 h vorbehandelt und anschließend für 24 h mit TRAIL (200 ng/ml) bzw. Fc-CD95L (MM.1S: 1 ng/ml, RPMI8226: 5 ng/ml) stimuliert. Das Zellüberleben wurde mit Hilfe der MTT-Färbung bestimmt.

Um die Annahme, dass die Hochregulation des CD95 nach TNFR1-Stimulation auf der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges basiert, final zu verifizieren, wurde der IKK2-spezifische Inhibitor TPCA-1 genutzt. Um zunächst die Spezifität des Inhibitors für IKK2 und somit den klassischen NF κ B-Signalweg zu testen, wurden HeLa-TNFR2-Zellen bezüglich der Wirkung des Inhibitors auf die TNFR1-induzierte Phosphorylierung und Degradation von I κ B α sowie auf die TNFR2-induzierte p100-Prozessierung hin untersucht. Die durch Stimulation des TNFR1 induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges wurde durch eine Vorstimulation mit TPCA-1 vollständig blockiert, weder Phosphorylierung noch Degradation von I κ B α waren nach entsprechender Behandlung noch detektierbar (Abbildung 18A). Aufgrund der TPCA-1-Vorstimulation verringerte sich weiterhin die p100-Expression, da diese durch den klassischen NF κ B-Signalweg reguliert wird. Allerdings hatte TPCA-1 keinen Einfluss auf die basale oder TNFR2-induzierte Prozessierung von p100 zu p52

(Abbildung 18B). TPCA-1 inhibiert also effizient den klassischen NF κ B-Signalweg, hat aber keinen Einfluss auf die Aktivierung des alternativen Signalweges.

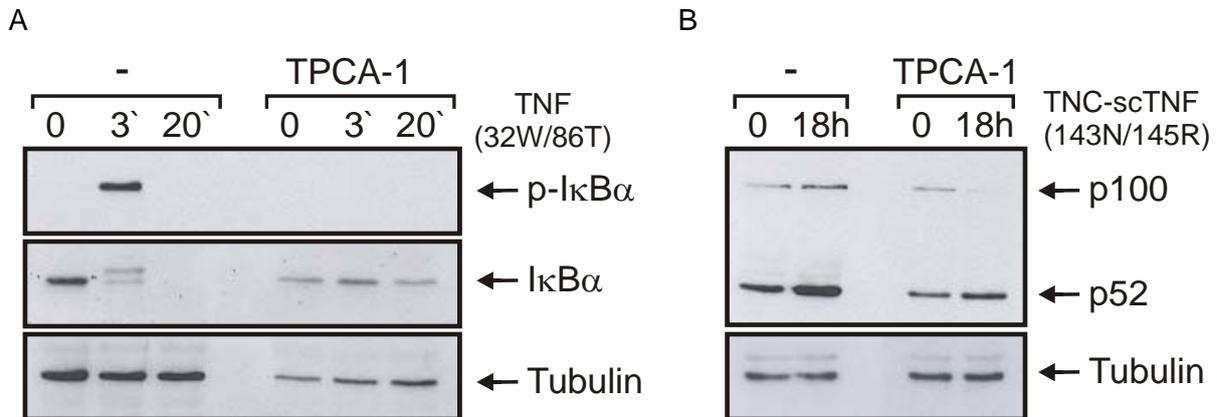


Abbildung 18: Wirkung des IKK2-Inhibitors TPCA-1.

HeLa-TNFR2-Zellen wurden mit 200 ng/ml TNF(32W/86T) **(A)** oder 200 ng/ml TNC-scTNF(143N/145R) **(B)** für die angegebenen Zeitpunkte in An- bzw. Abwesenheit von 10 μ M TPCA-1 stimuliert, und die Gesamtzelllysate im Western Blot auf die Expression der angegebenen Proteine hin untersucht.

FACS-Analysen zeigten ferner, dass die Behandlung der MM.1S- und RPMI8226-Zellen mit TPCA-1 keinen Einfluss auf die basale CD95-Expression hat. Die durch TNF induzierte Hochregulation des CD95 wurde durch TPCA-1-Behandlung jedoch komplett verhindert (Abbildung 19A). Passend hierzu zeigte sich, dass RPMI8226-Zellen, die mit TNF in Anwesenheit von TPCA-1 stimuliert wurden, nicht mit gesteigertem CD95L-induziertem Zelltod reagierten (Abbildung 19B). In den MM.1S-Zellen führte die Behandlung mit TPCA-1 jedoch zu einer starken TNF-vermittelten Zelltodinduktion (Abbildung 19C). Dies verhinderte die Analyse des CD95L-TNF *crossstalks* in TPCA-1-behandelten MM.1S-Zellen und weist auf einen schützenden Effekt des klassischen NF κ B-Signalweges im Zusammenhang mit der TNFR1-Signaltransduktion in diesen Myelomzellen hin. Tatsächlich sensitivierte die IKK2-Inhibition mit TPCA-1 zwei weitere der fünf zuvor in Abbildung 10 als TNFR1-responsibel identifizierte Multiplen Myelomzelllinien (OPM2 und KMS-12-BM) für den TNF-induzierten Zelltod (Abbildung 19C).

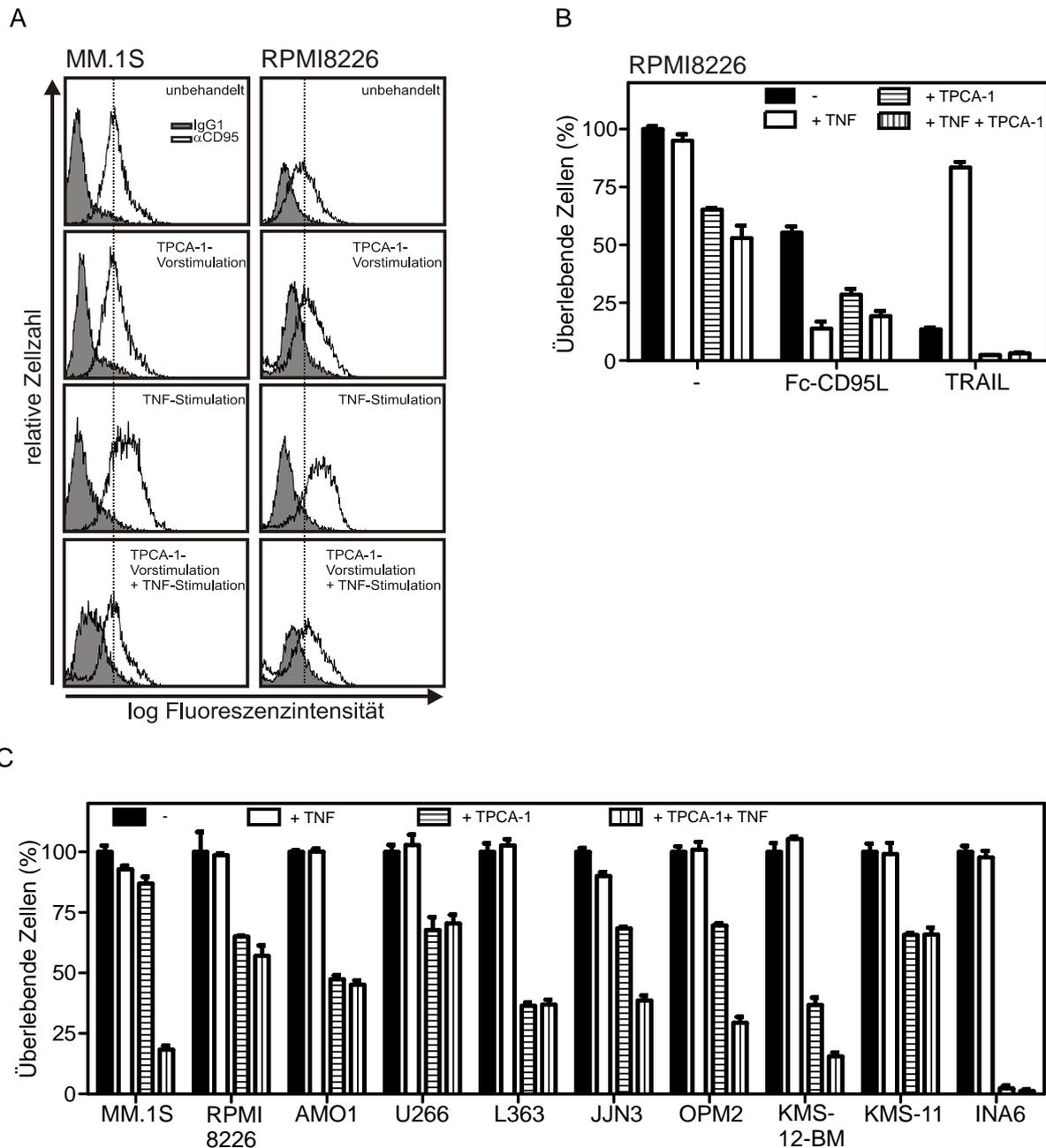


Abbildung 19: Der IKK2-Inhibitor TPCA-1 inhibiert die TNF-induzierte Hochregulation der CD95-Expression.

A) MM.1S- und RPMI8226-Zellen wurden mit 200 ng/ml TNF für 18 h stimuliert in An- bzw. Abwesenheit von 10 μ M TPCA-1. Die Oberflächenexpression von CD95 wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. **B)** RPMI8226-Zellen wurden mit 10 μ M TPCA-1 und 50 ng/ml TNF für 18 h vorbehandelt und anschließend mit TRAIL (200 ng/ml) und Fc-CD95L (10 ng/ml) stimuliert. Nach 24 h wurde das Zellüberleben mittels MTT-Färbung bestimmt. **C)** Die verschiedenen Myelomzellen wurden wie angegeben mit TNF (50 ng/ml) und TPCA-1 (10 μ M) behandelt und mittels MTT-Färbung wurde nach 42 h das Zellüberleben bestimmt.

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass der sensitivierende Effekt von TNF auf den CD95-vermittelten Zelltod auf der gesteigerten, NF κ B-vermittelten Expression des CD95-Moleküls beruht. Der schützende Effekt der TNF-Vorstimulation auf den TRAIL-vermittelten Zelltod hingegen basiert auf der Hochregulation der Expression des

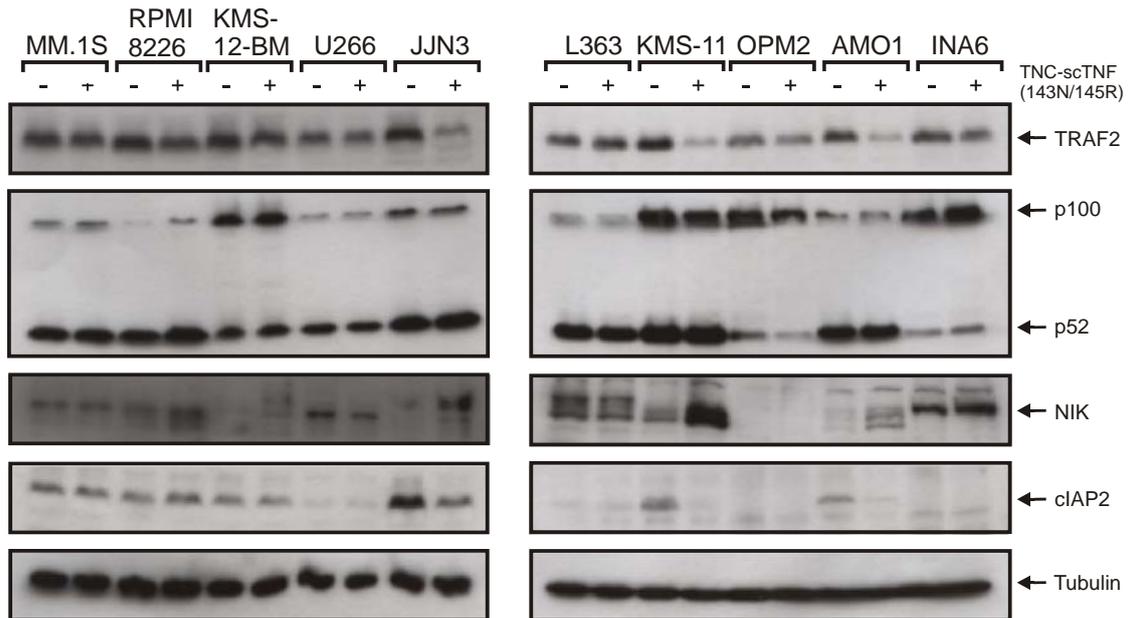
antiapoptischen cFLIP_{Long}. Diese beiden gegenläufigen Effekte beruhen aber beide auf der TNFR1-induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges.

4.6 TNFR2 reguliert den TNFR1-vermittelten Zelltod

Einer der bekanntesten Aspekte der TNFR2-Signaltransduktion ist die Rekrutierung von TRAF2 und den TRAF2-assoziierten Proteinen cIAP1 und cIAP2 (Rothe *et al.*, 1994; Rothe *et al.*, 1995). Der zytoplasmatische Pool dieser Proteine ist nach Rekrutierung an den TNFR2 für andere Bindungspartner, wie zum Beispiel den TRAF3/NIK- und den TNFR1-Signalkomplex, nur noch begrenzt verfügbar (Wicovsky *et al.*, 2009). cIAP1 und cIAP2 induzieren die Degradation von TRAF3-assoziiertem NIK (Vallabhapurapu *et al.*, 2008; Zarnegar *et al.*, 2008). Eine TNFR2-Stimulation resultiert daher in der Akkumulation von NIK (Abbildung 6C). Das akkumulierte NIK ist im Anschluss daran in der Lage die I κ B-Kinase IKK1 zu aktivieren, welche dann die Prozessierung von p100 zu p52 auslöst und somit den alternativen NF κ B-Signalweg anschaltet (s. Abschnitt 4.2).

In TNFR1-induzierten Signalwegen spielen auch TRAF2-cIAP1/2-Komplexe eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges und ebenfalls in der Inhibition der RIP1-vermittelten Aktivierung der Caspase-8 (O'Donnell und Ting, 2011; Wajant und Scheurich, 2011). Dementsprechend wirkt die Aktivierung des TNFR2 der TNFR1-vermittelten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges entgegen und unterstützt so die Zelltodinduktion (Naude *et al.*, 2011). Da in fast allen untersuchten Myelomzelllinien eine deutliche TNFR2-Expression nachweisbar war (Abbildung 8 und Abbildung 9), wurde weitergehend untersucht, ob sich dieser Effekt der TNFR2-Stimulation auch in Myelomzellen zeigt. Die Untersuchung von Gesamtzelllysaten im Western Blot zeigte, dass in JJN3-, AMO1- und KMS-11-Zellen eine TNFR2-Stimulation zu einer starken TRAF2-Degradation führte. In RPMI8226-, KMS-12-BM-, INA6- und OPM2-Zellen war eine etwas schwächere aber deutliche TRAF2-Degradation sichtbar. In RPMI8226-, JJN3-, KMS-11-, AMO1- und INA6-Zellen war zudem eine deutliche NIK-Akkumulation und in den Zelllinien JJN3, KMS-11 und AMO1 eine cIAP2-Degradation nachweisbar. Allerdings wies keine der untersuchten Zelllinien eine nennenswerte gesteigerte p100-Prozessierung nach TNFR2-Stimulation auf (Abbildung 20A). Im Einklang mit der antiapoptischen Wirkung von TRAF2 im TNFR1-vermittelten Signalweg und dessen Degradation nach TNFR2-Stimulation, konnte in JJN3-Zellen nach einer TNFR2-Vorstimulation eine TNFR1-induzierte Zytotoxizität gezeigt werden (Abbildung 20B).

A



B

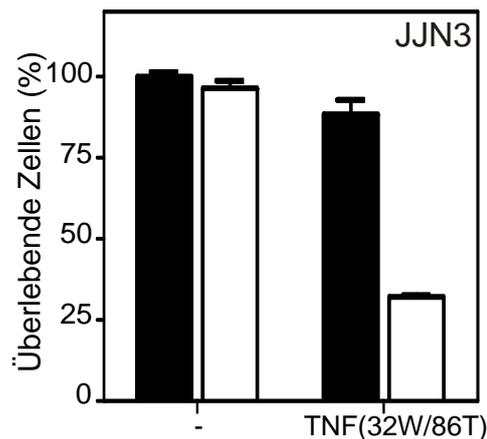


Abbildung 20: TNFR2 vermittelt TRAF2-Degradation und NIK-Akkumulation in Myelomzellen.

A) Verschiedene Myelomzelllinien wurden für 18 h mit 200 ng/ml der TNFR2-spezifischen löslichen TNF-Variante stimuliert und die Gesamtzelllysate anschließend auf die Expression der angegebenen Proteine hin untersucht. **B)** JJN3-Zellen wurden mit 200 ng/ml TNC-scTNF(143N/145R) über Nacht vorstimuliert (weiße Balken) oder blieben unbehandelt (schwarze Balken). Danach wurden die Zellen mit 200 ng/ml TNF(32W/86T) stimuliert und das Zellüberleben wurde nach 24 h mittels MTT-Färbung bestimmt.

Obwohl diese Experimente zeigten, dass eine TNFR2-Stimulation in den meisten untersuchten Myelomzelllinien einen Einfluss auf die TRAF2- und NIK-Expression hat, zeigte sich aber nur in einer Zelllinie ein korrespondierender *downstream*-Effekt auf den TNFR1-vermittelten Zelltod.

5 Diskussion

5.1 TNFR2 vermittelt die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges

Für TNF-Rezeptoren, die eine zytoplasmatische Domäne besitzen, wurde gezeigt, dass sie den klassischen NF κ B-Signalweg aktivieren. Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges hingegen wurde bis heute nur für einige Rezeptoren, wie z. B. Fn14, BAFF-R, CD27, LT β R und CD40 beschrieben (Coope *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2006; Scheidereit, 2006; Sun und Ley, 2008). TNF und seine Signaltransduktion wurden häufig in der Literatur beschrieben und diskutiert. So wurde gezeigt, dass TNF nicht in der Lage ist, den alternativen NF κ B-Signalweg zu induzieren (Coope *et al.*, 2002; Ramakrishnan *et al.*, 2004). Allerdings ist bekannt, dass TNF indirekt Einfluss auf den alternativen NF κ B-Signalweg durch Hochregulation von p100 über den klassischen NF κ B-Signalweg hat. Lösliches TNF stimuliert hauptsächlich TNFR1 und induziert damit die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges, hat aber nur wenig Einfluss auf die Aktivität des TNFR2. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die nonamere TNF-Variante TNC-scTNF(143N/145R) spezifisch den TNFR2 und die lösliche trimere Mutante TNF(32W/86T) spezifisch den TNFR1 stimuliert (Abbildung 4 und Abbildung 5). Weiterhin wurde gezeigt, dass die spezifische Aktivierung des TNFR2 mit TNC-scTNF(143N/145R) zu einer gesteigerten p100-Prozessierung führt (Abbildung 6D). Ebenso zeigte sich, dass die spezifische Stimulation des TNFR2 in einer Akkumulation von NIK und Degradation von TRAF2 resultiert (Abbildung 6B und C). Somit induziert die Stimulation des TNFR2 die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges und ermöglicht dadurch die Translokation der NF κ B-Transkriptionsfaktoren RelB und p52 in den Zellkern (Abbildung 7). Andere Studien und die hier gezeigten ELISA-Analysen zeigten desweiteren, dass der TNFR2 zudem schwach den klassischen NF κ B-Signalweg aktivieren kann (Abbildung 5A, Abbildung 10 und Abbildung 11; Weiss *et al.*, 1997). Dies kann jedoch durch TRAF1 verstärkt werden (Abbildung 5B; Wicovsky *et al.*, 2009).

Der Unterschied zwischen den hier gezeigten Ergebnissen und vorherigen Studien bezüglich der TNF-vermittelten Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges beruht darauf, dass in früheren Studien lediglich lösliches TNF verwendet wurde und in dieser Arbeit durch nonameres TNC-scTNF(143N/145R) der TNFR2 unabhängig vom TNFR1 spezifisch stimuliert wurde. So wurde deutlich, dass der TNFR2 die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges vermittelt. Es zeigte sich weiterhin in den Analysen erwartungsgemäß, dass lösliches trimeres TNFR1-spezifisches TNF (TNF(32W/86T)) zwar deutlich die Aktivierung

des klassischen NF κ B-Signalweges induziert, jedoch keine p100-Prozessierung oder p52- und RelB-Translokation in den Zellkern vermittelt (Abbildung 5, Abbildung 6A,D und Abbildung 7).

Daraus ergibt sich folgendes Modell der TNFR1- und TNFR2-vermittelten Aktivierung des NF κ B-Systems (Abbildung 21). Nach Stimulation induziert der TNFR1 hauptsächlich die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges. Zwar kann der TNFR2 schwach und mit Hilfe von TRAF1 auch moderat den klassischen NF κ B-Signalweg aktivieren, jedoch stimuliert der TNFR2 sehr deutlich den alternativen NF κ B-Signalweg. Die unterschiedliche Wirkung der beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 auf die Aktivität der beiden NF κ B-Signalwege verdeutlichen die Komplexität der zellulären TNF-Antwort.

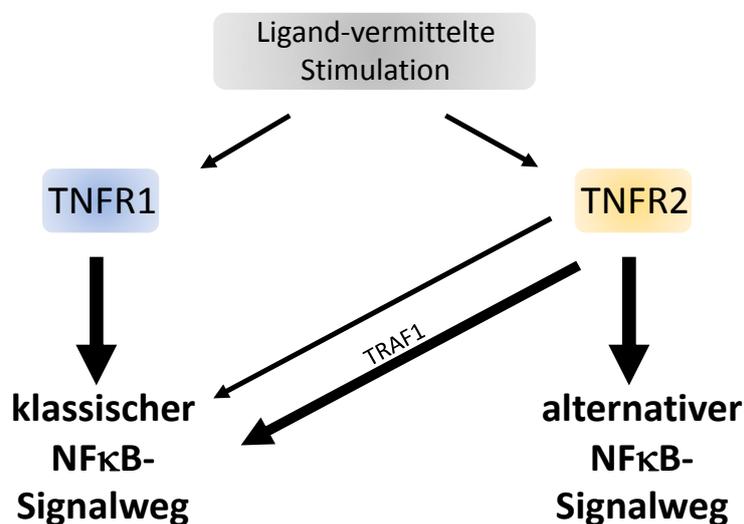


Abbildung 21: Modell der durch TNF-Rezeptoren vermittelten Aktivierung der beiden NF κ B-Signalwege.

Stimulation des TNFR1 resultiert in robuster Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges, wohingegen die Stimulation des TNFR2 diesen nur schwach, oder mit Hilfe von TRAF1 auch moderat, induziert. Die Stimulation des TNFR2 aktiviert aber sehr deutlich den alternativen NF κ B-Signalweg.

5.2 Das NF κ B-System im Multiplen Myelom

Die Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie regulieren verschiedene Gene, die Einfluss auf Wachstum, Überleben und Migration von Zellen haben. Daher überrascht es nicht, dass eine deregulierte Aktivität des NF κ B-Systems auch bei der Entstehung und Progression von Krebs eine Rolle spielt. So zeigte sich, dass die Aktivität des NF κ B-Systems das Wachstum

und Überleben von Tumorzellen, sowie die Angiogenese beim Multiplen Myelom fördert (Li *et al.*, 2008).

Es werden bereits Substanzen, die den NF κ B-Signalweg inhibieren, als Medikamente zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt, wie z. B. der Proteasom-Inhibitor Bortezomib. Sie mindern die Proliferation und steigern die Apoptose in Myelomzellen (Hideshima *et al.*, 2002; Mitsiades *et al.*, 2002a; Mitsiades *et al.*, 2002b; Annunziata *et al.*, 2007). Ebenso zeigten zwei Studien im Jahr 2007 deutlich, dass in mehr als 80 % der untersuchten Myelom-Biopsien eine Genexpression nachweisbar war, die auf eine konstitutive NF κ B-Aktivierung schließen lässt. Desweiteren zeigten die Studien, dass eine Reihe von Myelomzelllinien und eine Fraktion von primären Myelomzellen genetische Veränderungen aufweisen, die zu einer zellautonomen Aktivierung des NF κ B-Systems führen können (Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007). TNF ist ein starker Aktivator des klassischen NF κ B-Signalweges und wird selbst durch diesen reguliert (Wajant *et al.*, 2003). Erhöhte TNF-Level wurden beim Multiplen Myelom mehrfach beobachtet (Lichtenstein *et al.*, 1989; Filella *et al.*, 1996; Usnarska-Zubkiewicz, 1998; Jurisic und Colovic, 2002; Neben *et al.*, 2002). Jedoch gibt es widersprüchliche Studien im Hinblick auf eine Korrelation zwischen hochreguliertem TNF und LT α mit dem Risiko für eine Erkrankung am Multiplen Myelom (Davies *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000; Neben *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007; Kadar *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2010). Bemerkenswerterweise zeigte eine Pilotstudie, in der Patienten mit renitentem Multiplen Myelom mit dem TNFR2-Fusionsprotein Enbrel behandelt wurden, dass während der Behandlung die TNF-Level im Serum der Patienten anstiegen. Zudem zeigten vier von zehn behandelten Patienten (drei davon mit stabilem, einer mit einem progressiven Krankheitsbild zu Beginn der Studie) einen progressiven Krankheitsverlauf während der Therapie (Tsimberidou *et al.*, 2003). Die Ursache für den Anstieg an TNF in Anwesenheit von Enbrel ist unklar, könnte jedoch unter anderem auf reversem Signaling von membranständigem TNF oder einer unterschiedlichen Inhibition von löslichem und membranständigem TNF basieren, was antagonistische Effekte auf das NF κ B-Signaling haben könnte (Kast, 2005; Wicovsky *et al.*, 2009). Was auch immer der Grund sein mag, so zeigte diese Pilotstudie jedoch deutlich, dass das TNF/TNFR-System nicht nur im Multiplen Myelom aktiv ist, sondern auch eine Rolle während des Krankheitsverlaufes spielt.

5.2.1 TNF reguliert den extrinsischen Signalweg der Apoptose in Myelomzellen

Aufgrund der zentralen Rolle des klassischen NF κ B-Signalweges für das Zellüberleben wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit TNF die Sensitivität von Multiplen

Myelomzelllinien für Apoptose beeinflusst. Zunächst wurden diverse Myelomzelllinien mit FACS-Analysen und Ligand-Bindungsstudien auf die Oberflächenexpression der beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 hin untersucht. Während die TNFR2-Expression in neun von zehn Zelllinien gut nachweisbar war, war TNFR1 nur in drei von zehn Zelllinien deutlich und in fünf weiteren schwach exprimiert (Abbildung 8 und Abbildung 9). Der TNFR1 ist der bedeutendste Rezeptor in der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges (Wajant *et al.*, 2003). Daher wurden zunächst die beiden MM-Zelllinien MM.1S und RPMI8226 weitergehend analysiert, da diese eine deutliche TNFR1-vermittelte NF κ B-Aktivierung zeigten. Dies wurde durch die Phosphorylierung und Degradation von I κ B α (Abbildung 10) und der deutlichen Hochregulation von NF κ B-regulierten Proteinen aufgezeigt (Abbildung 11). Die Rezeptoren TNFR1, CD95, TRAILR1 und TRAILR2 gehören alle zur Gruppe der Todesrezeptoren und induzieren Apoptose über FADD und Caspase-8 (siehe 1.3.1; Wajant, 2003a, 2006). Bemerkenswerterweise induzierte jedoch eine Stimulation des CD95 mit Fc-CD95L und der TRAIL-Todesrezeptoren TRAILR1/2 mit TRAIL eindeutig Apoptose, wohingegen eine Stimulation mit löslichem TNF, also eine TNFR1-Aktivierung, keinen bzw. einen nur geringen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum hatte (Abbildung 12 und Abbildung 13). Diese unterschiedliche Sensitivität wurde bereits in anderen Zelltypen beobachtet und zeigt, dass die TNFR1-vermittelte Caspase-8-Aktivierung, im Gegensatz zur CD95-, TRAILR1- und TRAILR2-vermittelten Aktivierung, nicht nur durch cFLIP-Proteine aber möglicherweise auch durch TRAF2-clAP1/2-enthaltende Komplexe inhibiert wird (Naude *et al.*, 2011). Folglich zeigten weitere Studien, dass die Depletion des zytoplasmatischen TRAF2-clAP1/2-Komplexes durch die kompetitive Rekrutierung an beispielsweise den TNFR2 in gesteigertem TNFR1-vermitteltem Zelltod resultiert (Naude *et al.*, 2011). In Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass auch in MM-Zellen TRAF2-enthaltende Komplexe eine funktionelle Rolle haben, zeigte sich in JJN3-Zellen, dass eine TNFR2-Vorstimulation sowohl zu einer deutlichen TRAF2-Depletion als auch zu einer gesteigerten TNFR1-vermittelten Apoptose führt (Abbildung 20).

Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges wird häufig mit der Ausprägung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht (Basseres und Baldwin, 2006). Jedoch zeigte sich im Rahmen der Studien in dieser Arbeit trotz der Hochregulation antiapoptotischer Proteine wie clAP2 und cFLIP_{Long} (Abbildung 11 und Abbildung 16) kein inhibitorischer Effekt der TNF-Vorstimulation auf die Zelltodinduktion verschiedener anti-Myelom-Medikamente (Abbildung 12B). Überraschenderweise rief aber die Vorstimulation mit TNF einen gegenläufigen Effekt bezüglich der TRAILR1/2- und CD95-vermittelten Zelltodinduktion hervor. So sensitivierte die Vorstimulation mit TNF für CD95-vermittelten Zelltod, schützte aber vor TRAILR1/2-vermitteltem Zelltod (Abbildung 12B und Abbildung 13), obwohl diese Todesrezeptoren die Apoptose durch die gleichen molekularen Mechanismen

induzieren (Abbildung 14; Wajant, 2006). Dies lässt vermuten, dass der Effekt der TNF-Vorstimulation bei CD95L- und TRAIL-induzierter Apoptose zumindest zum Teil vor der Aktivierung der Caspase-8 eingreift. Tatsächlich sind CD95 und die beiden TRAIL-Todesrezeptoren sowie die cFLIP-Proteine durch den klassischen NF κ B-Signalweg in einer Zelltyp-spezifischen Weise reguliert. (Chan *et al.*, 1999; Kuhnel *et al.*, 2000; Kreuz *et al.*, 2001; Micheau *et al.*, 2001; Shetty *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2008). FACS-Analysen zeigten, dass in Myelomzelllinien die TNFR1-Aktivierung die Oberflächenexpression von CD95 steigert, jedoch nicht die der beiden TRAIL-Todesrezeptoren (Abbildung 15). Western Blot-Analysen bestätigten zudem die deutliche Hochregulation des CD95-Todesrezeptors nach TNF-Stimulation (Abbildung 16). Experimente mit den TNFR1- bzw. TNFR2-spezifischen TNF-Varianten und dem IKK2-Inhibitor TPCA-1 zeigten darüber hinaus, dass die TNF-induzierte Hochregulation der CD95-Expression auf der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch TNFR1 basiert (Abbildung 17 und Abbildung 19A). Zudem verhinderte TPCA-1 in RPMI8226-Zellen nicht nur die TNFR1-vermittelte Hochregulation der CD95-Expression (Abbildung 19A), sondern auch den sensitivierenden Effekt der TNF-Vorstimulation für den CD95L-induzierten Zelltod (Abbildung 19B). Eine TNF-vermittelte Sensitivierung für Apoptose aufgrund der CD95-Hochregulation wurde bereits früher in der Myelomzelllinie OH2 beschrieben (Borset *et al.*, 1999). Ebenso zeigte ein Tiermodell mit cMyc-induzierter Lymphomagenese, dass eine NF κ B-vermittelte CD95-Hochregulation proapoptotische Effekte erzielt (Klapproth *et al.*, 2009).

Obwohl die IKK2-vermittelte CD95-Induktion erklärt, warum eine TNF-Vorstimulation für CD95L- aber nicht für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert, erklärt sie nicht, welche Mechanismen dem schützenden Effekt der TNF-Vorstimulation gegenüber TRAIL zugrundeliegen. Die relevantesten antiapoptotischen Faktoren, die durch das NF κ B-System reguliert werden, sind die cFLIP-Proteine (siehe 1.3.2.1). Die verschiedenen Isoformen von cFLIP bilden an den TRAIL-Todesrezeptoren und CD95 mit Caspase-8 Komplexe und verhindern so deren Aktivierung (Wajant, 2003b). Western Blot-Analysen in dieser Arbeit zeigten, dass die cFLIP_{Long}-Expression nach einer TNF-Stimulation deutlich gesteigert war (Abbildung 16). So scheinen cFLIP-Proteine in TNF-vorstimulierten Zellen inhibitorisch auf den TRAIL-induzierten Zelltod zu wirken. Desweiteren tritt in TRAIL-vermitteltem Signaling eine verminderte Prozessierung der langen cFLIP-Isoform auf, und dieses schützende Protein wird verstärkt an den TRAIL-Rezeptor-Signal-Komplex rekrutiert (Rauert *et al.*, 2011).

Zusammenfassend ergibt sich somit aus den hier dargestellten Ergebnissen folgendes Modell. Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges durch den TNFR1 resultiert in der Hochregulation der CD95- und cFLIP_{Long}-Expression. Im Bezug auf die TRAIL-vermittelte Signaltransduktion spielt nur cFLIP_{Long} eine Rolle und hat eine antiapoptotische Wirkung. In

der CD95-vermittelten Signaltransduktion jedoch wirken zwei gegenläufige Effekte, nämlich eine gesteigerte cFLIP_{Long}-Expression und eine starke Hochregulation von CD95. Das Endresultat ist in diesem Fall eine gesteigerte CD95-vermittelte Apoptose (Abbildung 22).

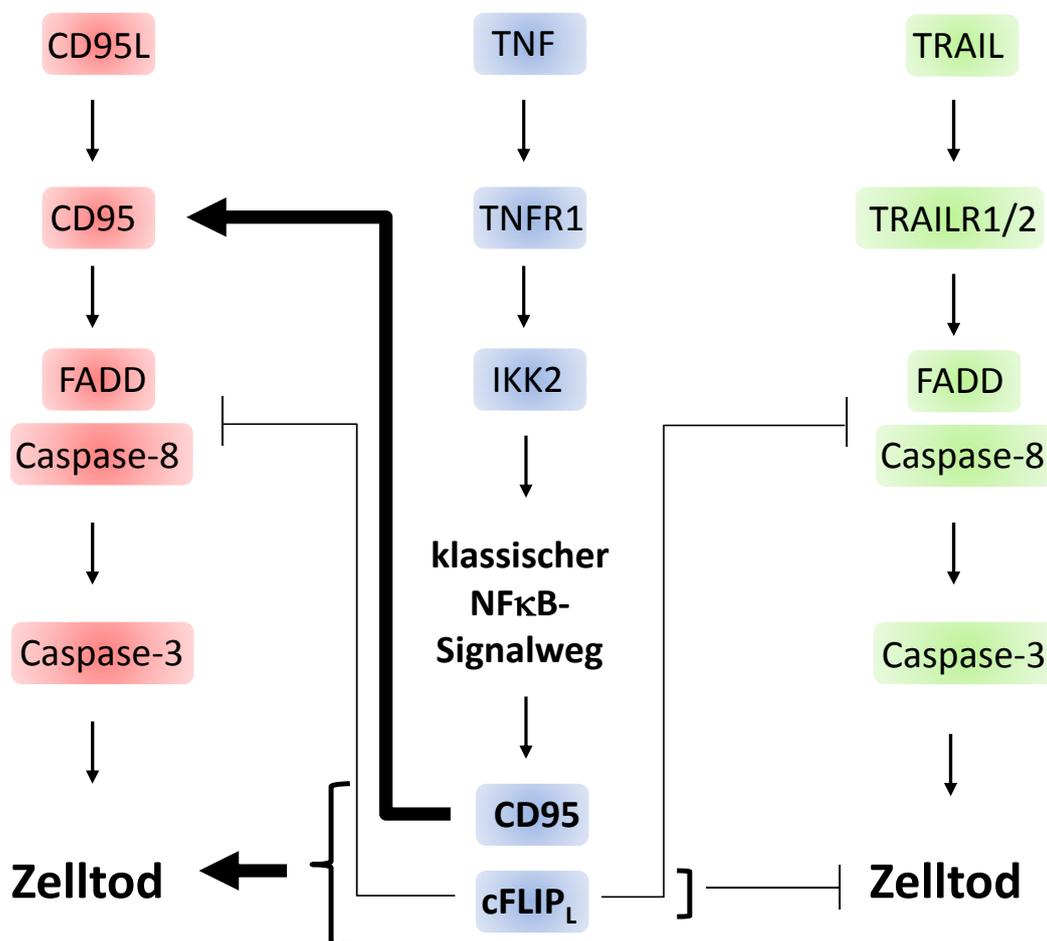


Abbildung 22: Modell der unterschiedlichen Regulation von CD95L- und TRAIL-induzierter Apoptose durch TNFR1.

Die TNFR1-induzierte Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges ergibt sowohl eine Hochregulation von cFLIP_{Long} als auch eine gesteigerte Expression von CD95. Obwohl cFLIP_{Long} den TRAIL-vermittelten Zelltod inhibiert, wird der antiapoptotische Effekt dieses Proteins in der CD95L-vermittelten Signaltransduktion durch die stark gesteigerte CD95-Expression mehr als kompensiert.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Mechanismen aufgezeigt, mit denen TNF und seine Rezeptoren die Sensitivität von Myelomzellen gegenüber der extrinsischen Apoptose regulieren. Da in den ebenfalls untersuchten KMS-12-BM-Zellen lediglich eine schwache Sensitivierung für sowohl den CD95L- als auch den TRAIL-vermittelten Zelltod nach TNF-Vorstimulation deutlich wurde, veranschaulicht dies, dass die hier aufgeführten Mechanismen nicht in allen Zelllinien gleich effektiv sind und nur in Untergruppen dieser Zelllinien auftreten. Dies ist im Hinblick auf die variable Expression von TNFR1 und TNFR2 in den untersuchten Myelomzellen und der bekannten Diversität der genetischen

Veränderungen im Multiplen Myelom nicht überraschend. Allerdings weisen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich darauf hin, dass TNF und seine Rezeptoren im Multiplen Myelom eine Rolle spielen. Die Herausforderung besteht nun darin, diese Ergebnisse in Tiermodellen dieser Krankheit zu evaluieren.

6 Zusammenfassung

Der Tumornekrosefaktor (TNF) entfaltet seine vielfältigen biologischen Aktivitäten durch die Stimulation der beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Die TNFR1-vermittelte Signaltransduktion ist in vielen Details gut verstanden, wohingegen die TNFR2-vermittelte Signaltransduktion bis heute kaum untersucht ist. Mit Hilfe einer in unserer Gruppe entwickelten hochaktiven TNFR2-spezifischen TNF-Variante sowie einer bereits länger bekannten TNFR1-spezifischen TNF-Variante wurde in dieser Arbeit die TNF-Signaltransduktion insbesondere im Multiplen Myelom untersucht. Mit Hilfe der beiden TNF-Varianten konnte gezeigt werden, dass die alleinige Stimulation des TNFR2 die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges vermittelt, wohingegen TNFR1 nicht dazu in der Lage ist. So zeigte sich im Einklang mit der inhibitorischen Funktion des Adapterproteins TRAF2 in der Signaltransduktion des alternativen NF κ B-Signalweges, dass die TNFR2-Stimulation in einer TRAF2-Depletion resultiert. Dies führt weiterhin zur Akkumulation von NIK und der Prozessierung von p100 zu seiner aktiven Form p52, den klassischen biochemisch nachweisbaren Ereignissen der Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges.

Aufgrund der Rolle des NF κ B-Systems im Multiplen Myelom (MM) und der stimulierenden Wirkung des TNFR1 und TNFR2 auf das NF κ B-System wurde die Expression und Funktion dieser beiden Rezeptoren auf Myelomzelllinien untersucht. Insbesondere wurde analysiert, welchen Effekt eine spezifische Stimulation der beiden TNF-Rezeptoren auf die apoptotische Sensitivität von Myelomzellen hat. Mit einer Ausnahme wiesen alle untersuchten Myelomzelllinien eine eindeutige TNFR2-Oberflächenexpression auf, die TNFR1-Expression hingegen war heterogen. Die TNFR1-Stimulation in den TNFR1-positiven Zelllinien zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellviabilität. Allerdings resultierte eine Vorstimulation mit TNF in einer gesteigerten Sensitivität für den CD95L-induzierten Zelltod, schützte aber gleichzeitig vor der TRAIL-vermittelten Induktion der Apoptose. Der gegenläufige Effekt der TNF-Vorstimulation auf den CD95L- und TRAIL-induzierten Zelltod konnte auf die Hochregulation der CD95-Oberflächenexpression und der gesteigerten Expression des antiapoptotischen cFLIP_{Long}-Proteins zurückgeführt werden. Beide Effekte basieren auf der TNF-induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges. Im CD95L-induzierten Zelltod überkompensierte die Induktion der CD95-Expression offensichtlich die Hochregulation von cFLIP_{Long} und resultierte in gesteigertem Zelltod. Der TRAIL-induzierte Zelltod hingegen wurde durch die TNF-Vorstimulation abgeschwächt, da hier lediglich die durch den klassischen NF κ B-Signalweg vermittelte gesteigerte Expression des antiapoptotischen cFLIP_{Long} eine Rolle spielte.

Desweiteren zeigten die Analysen in dieser Arbeit, dass die TNFR2-Stimulation zu einer Depletion von TRAF2 und z. B. in JJN3-Zellen zu einer Sensitivierung für den TNFR1-induzierten Zelltod führte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten in der Summe somit, dass das TNF-TNFR-Signaling durch verschiedene Mechanismen Einfluss auf den Ausgang der extrinsischen Apoptoseinduktion hat, und dass der Effekt von TNF auf das Überleben von MM-Zellen kontextabhängig ist.

7 Summary

TNF mediates its biological functions by stimulation of the two TNF receptors TNFR1 and TNFR2. TNFR1-mediated signaling has already been studied in detail, whereas TNFR2-mediated signal transduction is poorly understood. In this work a newly developed TNFR2-specific variant and an established TNFR1-specific variant was used to study TNF signaling especially in myeloma cells. With the help of these TNF-variants it is shown here that TNFR2, but not TNFR1, induces activation of the alternative NF κ B-pathway. Thus in consent with the inhibitory function of TRAF2 in alternative NF κ B signal transduction, stimulation of TNFR2 resulted in depletion of TRAF2, accumulation of NIK and p100 processing to p52, the biochemical hallmarks of this pathway.

Due to the relevance of the NF κ B-system for multiple myeloma (MM) and the NF κ B stimulatory activities of TNFR1 and TNFR2, the expression of these two receptors and their effect on apoptotic sensitivity was analyzed in myeloma cell lines. A huge majority of myeloma cell lines express TNFR2 whereas TNFR1 expression is rather restricted. Stimulation of TNFR1 in the TNFR1-positive subset of MM cell lines showed nearly no impact on cellular viability. However, TNF stimulation enhanced CD95L-induced cell death and in parallel reduced the TRAIL-mediated induction of apoptosis. This opposed regulation of TRAIL- and CD95L-induced cell death by TNF based on upregulation of the death receptor CD95 via the classical NF κ B-pathway and by upregulation of the antiapoptotic protein cFLIP_{Long} via the same pathway. The induction of CD95 expression appeared to overcompensate the upregulation of cFLIP_{Long} and consequently TNF-induced NF κ B activation resulted, in context of CD95 signaling, in apoptosis enhancement. TRAIL-mediated cell death induction, however, was reduced after TNF prestimulation, due to the fact that here only upregulation of cFLIP_{Long} was relevant. Furthermore the experiments in this study showed that TNFR2-mediated depletion of TRAF2 resulted in a sensitization for TNFR1-induced cell death, for example in JN3-cells.

Taken together, this study revealed that the TNF-TNFR system influenced the outcome of activation of the extrinsic apoptotic pathway in myeloma cells by various mechanisms and the effect of TNF on MM cell survival is thus context dependent.

8 Literaturverzeichnis

Aderka, D., (1996). The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 231-240.

Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E.M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D.R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., Jr., Kuehl, W.M., Staudt, L.M., (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 115-130.

Bakkar, N., Guttridge, D.C., (2010). NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev* 90, 495-511.

Basseres, D.S., Baldwin, A.S., (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25, 6817-6830.

Berg, D., Stühmer, T., Siegmund, D., Müller, N., Giner, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Bargou, R., Wajant, H., (2009). Oligomerized tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand strongly induces cell death in myeloma cells, but also activates proinflammatory signaling pathways. *FEBS J* 276, 6912-6927.

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

Bommert, K., Bargou, R.C., Stühmer, T., (2006). Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 42, 1574-1580.

Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D.C., Johnson-Vroom, K.E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A.G., Aronow, B.J., Ghosh, G., Rickert, R.C., Karin, M., (2004). Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J* 23, 4202-4210.

Borset, M., Hjorth-Hansen, H., Johnsen, A.C., Seidel, C., Waage, A., Espevik, T., Sundan, A., (1999). Apoptosis, proliferation and NF-kappaB activation induced by agonistic Fas antibodies in the human myeloma cell line OH-2: amplification of Fas-mediated apoptosis by tumor necrosis factor. *Eur J Haematol* 63, 345-353.

Brenner, H., Gondos, A., Pulte, D., (2009). Expected long-term survival of patients diagnosed with multiple myeloma in 2006-2010. *Haematologica* 94, 270-275.

Brown, E.E., Lan, Q., Zheng, T., Zhang, Y., Wang, S.S., Hoar-Zahm, S., Chanock, S.J., Rothman, N., Baris, D., (2007). Common variants in genes that mediate immunity and risk of multiple myeloma. *Int J Cancer* 120, 2715-2722.

- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J., (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chan, F.K., Lenardo, M.J., (2000). A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30, 652-660.
- Chan, H., Bartos, D.P., Owen-Schaub, L.B., (1999). Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol* 19, 2098-2108.
- Chen, G., Cao, P., Goeddel, D.V., (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9, 401-410.
- Coope, H.J., Atkinson, P.G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M.J., Klaus, G.G., Johnston, L.H., Ley, S.C., (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* 21, 5375-5385.
- Corredor, J., Yan, F., Shen, C.C., Tong, W., John, S.K., Wilson, G., Whitehead, R., Polk, D.B., (2003). Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C953-961.
- Dai, R., Phillips, R.A., Ahmed, S.A., (2007). Despite inhibition of nuclear localization of NF-kappa B p65, c-Rel, and RelB, 17-beta estradiol up-regulates NF-kappa B signaling in mouse splenocytes: the potential role of Bcl-3. *J Immunol* 179, 1776-1783.
- Davies, F.E., Rollinson, S.J., Rawstron, A.C., Roman, E., Richards, S., Drayson, M., Child, J.A., Morgan, G.J., (2000). High-producer haplotypes of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are associated with an increased risk of myeloma and have an improved progression-free survival after treatment. *J Clin Oncol* 18, 2843-2851.
- Declercq, W., Denecker, G., Fiers, W., Vandenabeele, P., (1998). Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol* 161, 390-399.
- Du, J., Yuan, Z., Zhang, C., Fu, W., Jiang, H., Chen, B., Hou, J., (2010). Role of the TNF-alpha promoter polymorphisms for development of multiple myeloma and clinical outcome in thalidomide plus dexamethasone. *Leuk Res* 34, 1453-1458.
- Duckett, C.S., Thompson, C.B., (1997). CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev* 11, 2810-2821.
- Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., Chen, Z.J., (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22, 245-257.

- Fick, A., Lang, I., Schafer, V., Seher, A., Trebing, J., Weisenberger, D., Wajant, H., (2012). Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem* 287, 484-495.
- Filella, X., Blade, J., Guillermo, A.L., Molina, R., Rozman, C., Ballesta, A.M., (1996). Cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1alpha) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma. *Cancer Detect Prev* 20, 52-56.
- Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A., Wajant, H., (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.
- Gilmore, T.D., (2007). Multiple myeloma: lusting for NF-kappaB. *Cancer Cell* 12, 95-97.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., (2005). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 14507-14513.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., Scheurich, P., (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 570-575.
- Gruss, H.J., Dower, S.K., (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378-3404.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.
- Hehlgans, T., Pfeffer, K., (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.
- Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Anderson, K.C., (2004). Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104, 607-618.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K.C., (2002). NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277, 16639-16647.
- Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., Anderson, K.C., (2001a). Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5991-6000.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., Anderson, K.C., (2001b). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces

apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61, 3071-3076.

Hoffmann, A., Natoli, G., Ghosh, G., (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716.

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

Hsu, J., Shi, Y., Krajewski, S., Renner, S., Fisher, M., Reed, J.C., Franke, T.F., Lichtenstein, A., (2001). The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells. *Blood* 98, 2853-2855.

Idriss, H.T., Naismith, J.H., (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50, 184-195.

Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., Goeddel, D.V., (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.

Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A., Kaufmann, T., (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460, 1035-1039.

Jourdan, M., Moreaux, J., Vos, J.D., Hose, D., Mahtouk, K., Abouladze, M., Robert, N., Baudard, M., Reme, T., Romanelli, A., Goldschmidt, H., Rossi, J.F., Dreano, M., Klein, B., (2007). Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *Br J Haematol* 138, 160-168.

Juriscic, V., Colovic, M., (2002). Correlation of sera TNF-alpha with percentage of bone marrow plasma cells, LDH, beta2-microglobulin, and clinical stage in multiple myeloma. *Med Oncol* 19, 133-139.

Kadar, K., Kovacs, M., Karadi, I., Meleg, B., Pocsai, Z., Mikala, G., Tordai, A., Szilagyi, A., Adany, R., Fust, G., Varkonyi, J., (2008). Polymorphisms of TNF-alpha and LT-alpha genes in multiple myeloma. *Leuk Res* 32, 1499-1504.

Kast, R.E., (2005). Evidence of a mechanism by which etanercept increased TNF-alpha in multiple myeloma: new insights into the biology of TNF-alpha giving new treatment opportunities--the role of bupropion. *Leuk Res* 29, 1459-1463.

Kastritis, E., Migkou, M., Gavriatopoulou, M., Ziogiannis, P., Hadjikonstantinou, V., Dimopoulos, M.A., (2009). Treatment of light chain deposition disease with bortezomib and dexamethasone. *Haematologica* 94, 300-302.

Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y.X., Fogle, H., Price-

- Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L.A., Kumar, S., Greipp, P., Dispenzieri, A., Bryant, B., Mulligan, G., Bruhn, L., Barrett, M., Valdez, R., Trent, J., Stewart, A.K., Carpten, J., Bergsagel, P.L., (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 131-144.
- Klapproth, K., Sander, S., Marinkovic, D., Baumann, B., Wirth, T., (2009). The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood* 114, 2448-2458.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., Wajant, H., (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.
- Krome, S., (2012). [Multiple myeloma]. *Dtsch Med Wochenschr* 137 Suppl 1, S14-17.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., Kirchhoff, S., (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-20640.
- Kuhnel, F., Zender, L., Paul, Y., Tietze, M.K., Trautwein, C., Manns, M., Kubicka, S., (2000). NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 275, 6421-6427.
- Kyle, R.A., Rajkumar, S.V., (2004). Multiple myeloma. *N Engl J Med* 351, 1860-1873.
- LaCasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, R.G., (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27, 6252-6275.
- Lang, I., Fick, A., Schafer, V., Giner, T., Siegmund, D., Wajant, H., (2012). Signaling Active CD95 Receptor Molecules Trigger Co-translocation of Inactive CD95 Molecules into Lipid Rafts. *J Biol Chem* 287, 24026-24042.
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H., (2005). Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-267.
- Lavrik, I.N., Krammer, P.H., (2012). Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ* 19, 36-41.
- Li, X., Yang, Y., Ashwell, J.D., (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.
- Li, Z.W., Chen, H., Campbell, R.A., Bonavida, B., Berenson, J.R., (2008). NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr Opin Hematol* 15, 391-399.
- Lichtenstein, A., Berenson, J., Norman, D., Chang, M.P., Carlile, A., (1989). Production of cytokines by bone marrow cells obtained from patients with multiple myeloma. *Blood* 74, 1266-1273.

- Lin, Y., Choksi, S., Shen, H.M., Yang, Q.F., Hur, G.M., Kim, Y.S., Tran, J.H., Nedospasov, S.A., Liu, Z.G., (2004). Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 279, 10822-10828.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Loetscher, H., Stueber, D., Banner, D., Mackay, F., Lesslauer, W., (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., Kamata, H., Karin, M., (2005). The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling. *J Clin Immunol* 25, 541-550.
- MacFarlane, M., Williams, A.C., (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5, 674-678.
- Martin, S.J., (2001). Dealing the CARDS between life and death. *Trends Cell Biol* 11, 188-189.
- Mendoza, F.J., Ishdorj, G., Hu, X., Gibson, S.B., (2008). Death receptor-4 (DR4) expression is regulated by transcription factor NF-kappaB in response to etoposide treatment. *Apoptosis* 13, 756-770.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., Tschopp, J., (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21, 5299-5305.
- Micheau, O., Tschopp, J., (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Anderson, K.C., (2002a). Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 21, 5673-5683.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P.G., Hideshima, T., Munshi, N., Treon, S.P., Anderson, K.C., (2002b). Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 99, 4079-4086.
- Morgan, G.J., Adamson, P.J., Mensah, F.K., Spink, C.F., Law, G.R., Keen, L.J., Roman, E., Davies, F.E., Rollinson, S., Child, J.A., Bidwell, J.L., (2005). Haplotypes in the tumour necrosis factor region and myeloma. *Br J Haematol* 129, 358-365.
- Müller, N., Wyzgol, A., Münkel, S., Pfizenmaier, K., Wajant, H., (2008). Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *FEBS J* 275, 2296-2304.

Naude, P.J., den Boer, J.A., Luiten, P.G., Eisel, U.L., (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J* 278, 888-898.

Neben, K., Mytilineos, J., Moehler, T.M., Preiss, A., Kraemer, A., Ho, A.D., Opelz, G., Goldschmidt, H., (2002). Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 100, 2263-2265.

O'Donnell, M.A., Ting, A.T., (2011). RIP1 comes back to life as a cell death regulator in TNFR1 signaling. *FEBS J* 278, 877-887.

Pene, F., Claessens, Y.E., Müller, O., Viguie, F., Mayeux, P., Dreyfus, F., Lacombe, C., Bouscary, D., (2002). Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 21, 6587-6597.

Peter, M.E., Krammer, P.H., (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.

Ramakrishnan, P., Wang, W., Wallach, D., (2004). Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* 21, 477-489.

Rauert, H., Stühmer, T., Bargou, R., Wajant, H., Siegmund, D., (2011). TNFR1 and TNFR2 regulate the extrinsic apoptotic pathway in myeloma cells by multiple mechanisms. *Cell Death Dis* 2, e194.

Rauert, H., Wicovsky, A., Müller, N., Siegmund, D., Spindler, V., Waschke, J., Kneitz, C., Wajant, H., (2010). Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem* 285, 7394-7404.

Richardson, P.G., Badros, A.Z., Jagannath, S., Tarantolo, S., Wolf, J.L., Albitar, M., Berman, D., Messina, M., Anderson, K.C., (2010). Tanespimycin with bortezomib: activity in relapsed/refractory patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 150, 428-437.

Richardson, P.G., Mitsiades, C.S., Laubach, J.P., Lonial, S., Chanan-Khan, A.A., Anderson, K.C., (2011). Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. *Br J Haematol* 152, 367-379.

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

Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., Goeddel, D.V., (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.

- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., Goeddel, D.V., (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.
- Scheidereit, C., (2006). I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705.
- Seymour, A.E., Thompson, A.J., Smith, P.S., Woodroffe, A.J., Clarkson, A.R., (1980). Kappa light chain glomerulosclerosis in multiple myeloma. *Am J Pathol* 101, 557-580.
- Shetty, S., Graham, B.A., Brown, J.G., Hu, X., Vegh-Yarema, N., Harding, G., Paul, J.T., Gibson, S.B., (2005). Transcription factor NF- κ B differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 25, 5404-5416.
- Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y., Lenardo, M.J., (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
- Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G., (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Sun, S.C., Ley, S.C., (2008). New insights into NF- κ B regulation and function. *Trends Immunol* 29, 469-478.
- Takayama, K., Yokozeki, H., Ghoreishi, M., Satoh, T., Katayama, I., Umeda, T., Nishioka, K., (1999). IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 113, 541-546.
- Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., Breakefield, X.O., (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* 11, 435-443.
- Theiss, A.L., Simmons, J.G., Jobin, C., Lund, P.K., (2005). Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem* 280, 36099-36109.
- Tsimberidou, A.M., Waddelow, T., Kantarjian, H.M., Albitar, M., Giles, F.J., (2003). Pilot study of recombinant human soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor (p75) fusion protein (TNFR:Fc; Enbrel) in patients with refractory multiple myeloma: increase in plasma TNF alpha levels during treatment. *Leuk Res* 27, 375-380.
- Tu, Y., Gardner, A., Lichtenstein, A., (2000). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res* 60, 6763-6770.
- Usmani, S.Z., Chiosis, G., (2011). HSP90 inhibitors as therapy for multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11 Suppl 1, S77-81.

Usnarska-Zubkiewicz, L., (1998). [Level of interleukin-6 (IL-6), soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in untreated and progressing multiple myeloma]. *Pol Arch Med Wewn* 99, 30-37.

Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.H., Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A., Bergsagel, P.L., Karin, M., (2008). Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9, 1364-1370.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G., (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 700-714.

Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S., (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9, 2723-2735.

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

Wajant, H., (2003b). Targeting the FLICE Inhibitory Protein (FLIP) in cancer therapy. *Mol Interv* 3, 124-127.

Wajant, H., (2006). CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy. *Cancer Treat Res* 130, 141-165.

Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., Pfizenmaier, K., (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* 20, 4101-4106.

Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.

Wajant, H., Scheurich, P., (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *FEBS J* 278, 862-876.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., Chen, Z.J., (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.

Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S., 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.

Weiss, T., Grell, M., Hessabi, B., Bourteele, S., Müller, G., Scheurich, P., Wajant, H., (1997). Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol* 158, 2398-2404.

- Weiss, T., Grell, M., Siemienski, K., Muhlenbeck, F., Durkop, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Wajant, H., (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.
- Wicovsky, A., Henkler, F., Salzmann, S., Scheurich, P., Kneitz, C., Wajant, H., (2009). Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28, 1769-1781.
- Wu, C.J., Conze, D.B., Li, X., Ying, S.X., Hanover, J.A., Ashwell, J.D., (2005). TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J* 24, 1886-1898.
- Wyzgol, A., Müller, N., Fick, A., Münkkel, S., Grigoleit, G.U., Pfizenmaier, K., Wajant, H., (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.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., Israel, A., (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., Karin, M., (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.
- Zarnegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W.C., Mak, T.W., Korneluk, R.G., Cheng, G., (2008). Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 9, 1371-1378.
- Zheng, C., Huang, D.R., Bergenbrant, S., Sundblad, A., Osterborg, A., Bjorkholm, M., Holm, G., Yi, Q., (2000). Interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms in multiple myeloma. *Br J Haematol* 109, 39-45.
- Zöllinger, A., Stühmer, T., Chatterjee, M., Gattenlohner, S., Haralambieva, E., Müller-Hermelink, H.K., Andrulis, M., Greiner, A., Wesemeier, C., Rath, J.C., Einsele, H., Bargou, R.C., (2008). Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* 112, 3403-3411.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

`	Minute(n)
°C	Grad Celsius
μ	mikro (millionster Teil; 10 ⁻⁶)
4-1BB	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 9</i>
4-1BBL	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 9</i>
A	Ampere
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Ak	Antikörper
APAF1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BAFF	<i>B-cell-activating factor</i>
BAFF-R	<i>B-cell-activating factor receptor</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCMA	<i>B-cell maturation factor</i>
BH	<i>Bcl2 homology domain</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIR	<i>baculovirus internal repeat</i>
BLC	<i>B lymphocyte chemoattractant</i>
BRUCE	<i>baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi (hundertster Teil; 10 ⁻²)
ca.	circa
CARD	<i>caspase-associated recruitment domain</i>
Caspase	<i>cysteinylnyl aspartat specific proteinase</i>
CD27	<i>T-cell activation antigen S152</i>
CD27L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 7</i>
CD30	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 8</i>
CD30L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 8</i>

CD40	<i>B-cell-associated molecule</i>
CD40L	<i>T-B-cell-activating molecule</i>
CD95	<i>apoptosis-mediating surface antigen FAS</i>
CD95L	<i>apoptosis-mediating surface antigen FAS ligand</i>
cdc37	<i>cell division cycle 37 homolog</i>
cFLIP	<i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
CHX	Cycloheximid
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
clAP(s) (1/2)	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein(s) (1/2)</i>
cMyc	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD(s)	cysteinreiche Domäne(n)
d.h.	das heißt
DcR3	<i>decoy receptor 3</i>
DD	<i>death domain, Todesdomäne</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco`s PBS
DR3	<i>death receptor beta</i>
DR6	<i>death receptor 6</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDA-A1	<i>ectodermal dysplasia protein 1</i>
EDA-A2	<i>ectodermal dysplasia protein 2</i>
EDAR	<i>ectodysplasin A receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocynat
Fn14	<i>TWEAK-receptor</i>
g	Gramm
GITRL	<i>glucocorticoid-induced TNF-related ligand</i>

GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
GpL	<i>Gaussia princeps</i> Luziferase
h	Stunde(n)
HCL	Chlorwasserstoff
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HSP90	<i>heat shock protein-90</i>
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator A</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>inhibitor of NFκB kinase</i>
IKK1	<i>inhibitor of NFκB kinase alpha</i>
IKK2	<i>inhibitor of NFκB kinase beta</i>
IL	Interleukin
ILP2	<i>inhibitor of apoptosis-like protein 2</i>
I κ B	<i>inhibitor of NFκB</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIGHT	<i>herpes virus entry mediator ligand</i>
LT α	<i>lymphotoxin alpha</i>
LT α 1 β 2	<i>lymphotoxin alpha 1/beta2</i>
LT β R	<i>lymphotoxin beta receptor</i>
m	milli (tausendster Teil; 10 ⁻³)
M	molar (Mol/Liter)
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
MM	Multiples Myelom, <i>multiple myeloma</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	nano (milliardster Teil; 10 ⁻⁹)
NEMO	<i>NFκB essential modifier</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NLS	Kernlokalisationssequenz

OD	optische Dichte
OPG	<i>osteoprotegerin</i>
OX40	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 4</i>
OX40L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 4</i>
p100	<i>NFκB2</i>
p105	<i>NFκB1</i>
p50	<i>NFκB1, subunit p50</i>
p52	<i>NFκB2, subunit p52</i>
p65	<i>transcription factor p65</i>
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PLAD	<i>pre-ligand assembly domain</i>
RANK	<i>receptor activator of NFκB</i>
RANKL	<i>receptor activator of NFκB ligand</i>
rel.	relativ(e)
RelB	<i>transcription factor RelB</i>
RELT	<i>receptor expressed in lymphoid tissues</i>
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RING	<i>real interesting new gene</i>
RIP1	<i>receptor interacting protein 1</i>
RIP3	<i>receptor interacting protein 3</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
rpm	<i>round/revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
sc	<i>single chain cassette</i>
SDF1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde(n)
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SODD	<i>silencer of death domain</i>
TAB2	<i>TAK1-binding protein 2</i>
TAB3	<i>TAK1-binding protein 3</i>
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>

TAK	<i>transforming growth factor-β activated kinase</i>
tBID	<i>truncated BID</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin</i>
THD	<i>TNF homology domain</i>
TL1A	<i>TNF ligand related molecule 1</i>
TNC	<i>Tenascin-C</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor/ tumor necrosis factor</i>
TNFR (1/2)	<i>Tumornekrosefaktor-Rezeptor (1/2)/ tumor necrosis factor receptor (1/2)</i>
TPCA-1	<i>2-[(Aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF (1-3)	<i>TNFR-associated factor (1-3)</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRAILR (1-4)	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (1-4)</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
TROY	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i>
TWEAK	<i>TNF-related weak inducer of apoptosis</i>
u. a.	<i>unter anderem</i>
V	<i>Volt</i>
XEDAR	<i>X-linked ectodysplasin-A2 receptor</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
z. B.	<i>zum Beispiel</i>
zVAD	<i>N-benzyloxycarbonyl-VIa-Ala-Asp.fluoromethyl-ke-ton</i>
α	<i>anti</i>
β -TrCP	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>

9.2 Publikationen

Rauert, H., Stühmer, T., Bargou, R., Wajant, H., Siegmund, D., (2011). TNFR1 and TNFR2 regulate the extrinsic apoptotic pathway in myeloma cells by multiple mechanisms. *Cell Death Dis* 2, e194.

Rauert, H., Wicovsky, A., Müller, N., Siegmund, D., Spindler, V., Waschke, J., Kneitz, C., Wajant, H., (2010). Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem* 285, 7394-7404.

9.3 Lebenslauf