

Die Charakterisierung
des rezeptornahen Signalweges
der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)



an der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Michaela Grunert
aus Weilheim i. OB

München, Juni 2011

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Elisabeth H. Weiß

Zweitgutachter: Herr PD Dr. Daniel Krappmann

Dissertation eingereicht am: 30.06.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Zusammenfassung.....	3
2. Einleitung	5
2.1. Der NF- κ B-Signalweg.....	5
2.2. Die TNF-Familie	7
2.3. Der TNF-verwandte Apoptose induzierende Ligand „TRAIL“	8
2.3.1. TRAIL-induzierte Apoptose.....	9
2.3.2. Biologische Bedeutung von TRAIL	15
2.3.3. TRAIL-induzierte Aktivierung von NF- κ B.....	16
3. Zielsetzung.....	19
4. Material und Methoden.....	20
4.1. Material	20
4.1.1. Antikörper	20
4.1.2. Bakterienstämme.....	20
4.1.3. Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	21
4.1.4. Enzyme	22
4.1.5. Geräte und Software.....	22
4.1.6. Kommerzielle Reagenziensätze.....	23
4.1.7. Medien.....	23
4.1.8. Oligonukleotide.....	24
4.1.9. Pufferlösungen	26
4.1.10. Vektoren	27
4.1.11. Verbrauchsmaterialien.....	29
4.2. Methoden	30
4.2.1. Molekularbiologie.....	30
4.2.2. Proteinbiochemie.....	36
4.2.3. Zellbiologie	42
5. Ergebnisse	49

5.1.	Herstellung von rekombinantem humanem TRAIL	49
5.1.1.	Klonierung der TRAIL-Varianten	49
5.1.2.	Expression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung	51
5.1.3.	Funktionalität von renaturiertem TRAIL	54
5.2.	Untersuchung der TRAIL-Rezeptoren und ihrer Todesdomäne	58
5.2.1.	Klonierung der Fusionsproteine	59
5.2.2.	Funktionalität der Fusionsproteine	60
5.2.3.	Entscheidende Bedeutung der Todesdomäne für TR1 und TR2	63
5.3.	FADD als Adaptorprotein des NF- κ B-Signalweges	64
5.3.1.	Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung in HEK 293T von FADD	64
5.3.2.	Fehlende Aktivierung von NF- κ B in FADD defizienten Zellen	66
5.3.3.	TRAIL-induzierte NF- κ B Aktivierung nach Reexpression von FADD	67
5.3.4.	Abhängigkeit der FADD Funktion von der Multimerisierung von FADD	69
5.4.	Mögliche Rolle von Caspase 8 im NF- κ B-Signalweg	75
5.4.1.	Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung in HEK 293T von Caspase 8	76
5.4.2.	Fehlende Aktivierung von NF- κ B in Caspase 8 defizienten Zellen	78
5.4.3.	Stabile induzierbare Reexpression in Caspase 8 defizienten Zellen	80
6.	Diskussion	83
6.1.	Effiziente Methode der Gewinnung von rekombinantem humanen TRAIL in <i>E. coli</i>	83
6.2.	Todesdomänen von TR1 und TR2 vermitteln die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL	85
6.3.	FADD als Übermittler des NF- κ B Signals durch TRAIL	86
6.4.	Einfluss der Caspase 8 auf die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL	88
6.5.	Ausblick auf weiterführende Untersuchungen des Signalweges	91
7.	Literaturverzeichnis	93
8.	Anhang	102
8.1.	Abkürzungen	102
8.2.	Danksagung	103
8.3.	Publikationen	104
8.4.	Eidesstattliche Erklärung	105

1. Zusammenfassung

Der TNF-verwandte Apoptose induzierende Ligand TRAIL ist in der Lage, spezifisch Apoptose in Tumorzellen zu induzieren ohne normales Gewebe zu schädigen und gilt deswegen als vielversprechender Kandidat für den Einsatz in der Tumorthherapie.

Neben der Induktion von Apoptose ist TRAIL allerdings auch in der Lage den Transkriptionsfaktor NF- κ B („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“) zu aktivieren, was wiederum die Induktion von Zelltod durch TRAIL vermindert. Für die Tumorthherapie wäre es daher wünschenswert, durch TRAIL selektiv den Apoptosesignalweg und nicht NF- κ B zu aktivieren. Dazu ist ein Verständnis beider Signalwege unerlässlich. Im Gegensatz zum Signalweg der TRAIL-induzierten Apoptose ist der Signalweg der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B aber bisher wenig erforscht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das rezeptornahе Adaptorprotein und die ersten, rezeptornahen Signalschritte der NF- κ B Aktivierung durch TRAIL zu identifizieren.

Die Überexpression konstitutiv aktiver Fusionsproteine der beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 war in der Lage, NF- κ B zu aktivieren. Fusionsproteine mit verkürztem C-Terminus, der die Apoptose-vermittelnde Todesdomäne enthält, waren dabei nicht im Stande den Signalweg zu aktivieren. Dadurch konnte die entscheidende Funktion der Todesdomäne für TR1 und TR2 bei der Induktion von NF- κ B gezeigt werden.

Um Untersuchungen des TRAIL-Signalweges mit dem Liganden durchführen zu können, wurde die bakterielle Produktion und Aufreinigung von rekombinantem humanem TRAIL, sowie einem hochaktiven ILZ (Isoleucin Zipper)-TRAIL und einer inaktiven Kontrollvariante etabliert.

Die Untersuchung von FADD („fas associated death domain“)-defizienten JURKAT-Zellen, zeigte, dass diese nicht in der Lage waren, NF- κ B auf TRAIL zu aktivieren. Die transiente und auch stabile Reexpression von FADD stellte dabei die Aktivierbarkeit von NF- κ B durch TRAIL wieder her. Somit konnte FADD als Adaptorprotein für die TRAIL-induzierte Aktivierung von NF- κ B identifiziert werden.

Die Expression von FADD-Varianten mit je zwei Punktmutationen in der Todeseffektordomäne war hingegen nicht in der Lage, TRAIL-induzierte Aktivierung von NF- κ B wiederherzustellen, was auf die Notwendigkeit der Multimerisierung von FADD hinweist.

Des Weiteren aktivierten auch JURKAT-Zellen, die defizient für Caspase 8 („cysteiny-l-aspartate specific protease 8“) waren, den TRAIL-induzierten NF- κ B-Signalweg nicht. Auch die Verminderung der Expression von Caspase 8 in HEK 293T führte zu einer verminderten NF- κ B Aktivierung durch die Überexpression des konstitutiv aktiven Fusionsproteins des TRAIL-Rezeptors 2.

Im Rahmen dieser Arbeit war es somit gelungen, die Todesdomäne der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, das Adaptorprotein FADD mit seiner Todeseffektordomäne und wahrscheinlich Caspase 8 als rezeptornahe Signalschritte der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B zu identifizieren. Folglich sind die Signalwege von Apoptose und Aktivierung von NF- κ B durch TRAIL im rezeptornahen Signalweg identisch.

Damit ist es nicht möglich, an Hand der gezielten Aktivierung der rezeptornahen Signalschritte TRAIL-induzierte Apoptose selektiv zu aktivieren. Hierzu muss eine Untersuchung weiterer distaler Signalschritte erfolgen.

2. Einleitung

Die Aufgabe eines Krebsmedikaments ist es, Tumorzellen zu beseitigen. Dazu aktivieren Zytostatika Signalwege in den Tumorzellen, die den Zelltod der Tumorzellen, meist in Form von Apoptose, induzieren. Für viele Zytostatika wurde jedoch gezeigt, dass sie neben der Induktion von Apoptose auch in der Lage sind, andere Signalwege zu induzieren. Klinisch relevant sind dabei vor allem Signalwege, die Überleben und Proliferation von Tumorzellen fördern.

Die Induktion von NF- κ B („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“) ist ein Beispiel eines solchen Signalweges, der häufig neben der Induktion von Apoptose aktiviert wird. Zu den Substanzen, die dazu in der Lage sind, gehören etablierte Zytostatika wie beispielsweise Doxorubicin und Cisplatin, aber auch neue Substanzen wie TRAIL (TNF-verwandter Apoptose induzierender Ligand) (Pahl, 1999).

Eine Aktivierung von Überlebens- oder Wachstumssignalwegen in Tumorzellen durch Zytostatika ist während der Tumorthherapie unerwünscht und sollte verhindert oder zumindest eingedämmt werden. So wird nach einer Möglichkeit gesucht, den TRAIL Apoptose-Signalweg während der Tumorthherapie zu aktivieren, ohne dabei gleichzeitig NF- κ B zu induzieren. Um Signalwege selektiv aktivieren zu können, ist jedoch ein tiefes Verständnis grundlegender Signalmechanismen notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist in diesem Zusammenhang, die ersten Schritte des Signalweges der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B zu charakterisieren.

2.1. Der NF- κ B-Signalweg

Hinter dem Begriff NF- κ B verbirgt sich eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die die Expression einer großen Reihe verschiedener Zielgene regulieren (Pahl, 1999). Die wiederum an vielen unterschiedlichen Prozessen, unter anderem der Immunantwort, Entzündungsreaktionen, Wachstum, Überleben und Differenzierung beteiligt sind (Hayden & Ghosh, 2008).

Zur NF- κ B-Familie gehören die fünf Proteine p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 p50 und NF- κ B2 p52, die untereinander verschiedene Homo- und Heterodimere bilden, die dann für die Transaktivierung der Zielgene sorgen.

Die Proteine befinden sich zunächst als Dimere im Zytoplasma, wobei sie durch ein Protein der I κ B („inhibitor of κ B“) Familie, meistens I κ B α , gebunden und damit inaktiviert sind. Die Proteine p50 und p52 liegen als Vorläuferproteine p105 und p100 vor, deren C-Terminus eine I κ B-artige inhibitorische Funktion einnimmt.

Für die Aktivierung der NF- κ B Proteine unterscheidet man zwei verschiedene Wege: den kanonischen und den alternativen Signalweg, schematisch dargestellt in Abb. 1 (Sun, 2011).

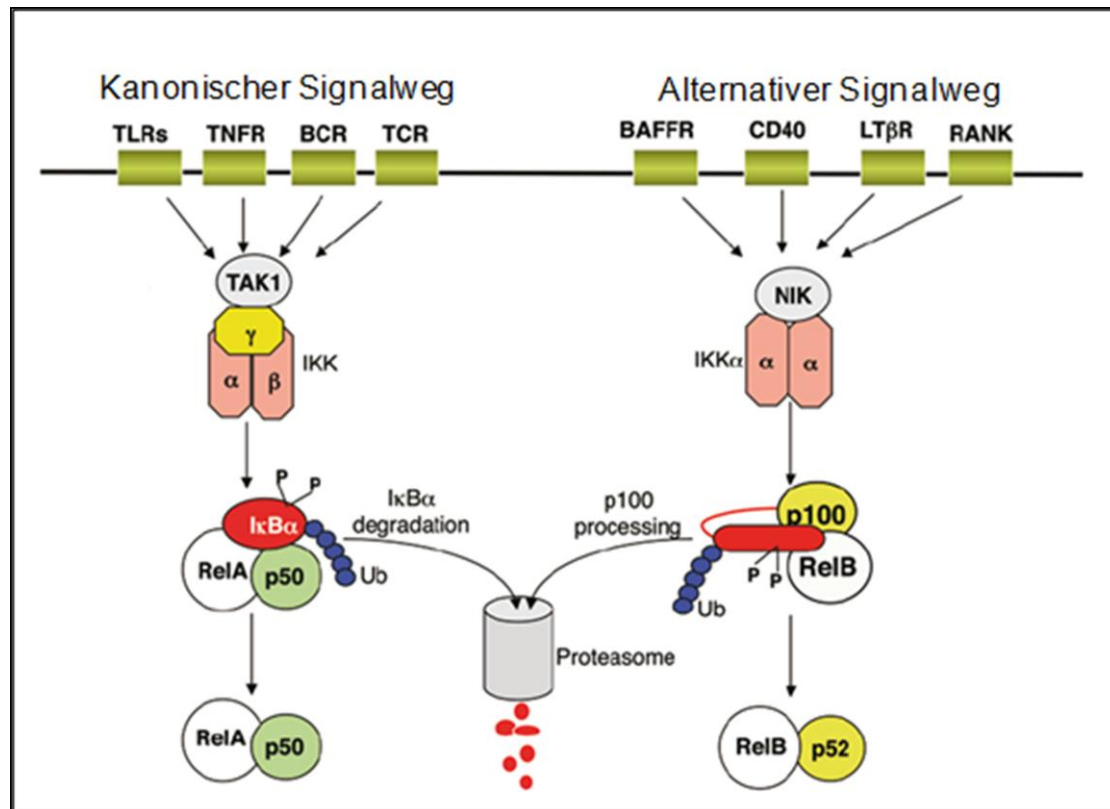


Abbildung 1: Schematische Darstellung des kanonischen und alternativen NF-κB Signalweges (modifiziert nach Sun, 2011) Die einzelnen Schritte der beiden Signalwege sind im Text beschrieben.

Im kanonischen Signalweg führt die Aktivierung zu einer raschen Phosphorylierung von IκBα durch die IκB Kinase (IKK), bestehend aus den Untereinheiten IKKα, IKKβ und NEMO („NF-κB essential modulator“, IKKγ). Die Phosphorylierung führt anschließend zur Ubiquitinierung und proteosomalen Degradation von IκBα und zur Freisetzung des NF-κB Dimers, meist p50/p65, welches dann in den Nukleus wandert.

Der alternative Signalweg aktiviert dagegen das Dimer RelB/p52 durch induzierbare Prozessierung des Vorläuferproteins p100. Während p105 konstitutiv zu p50 prozessiert wird, passiert das für p100 kaum. Für die Aktivierung wird zunächst die Kinase NIK („NF-κB inducing kinase“) aktiviert, die dann wiederum IKKα aktiviert. Der genaue Mechanismus wie p100 in der C-terminalen „NIK-responsive domain“ von NIK oder auch IKKα phosphoryliert wird, ist noch unklar, ist aber abhängig von de novo Proteinsynthese. Das phosphorylierte p100 wird dann ubiquitiniert und schließlich vom Proteasom auf ebenfalls noch unbekanntem Weg zu p52 prozessiert. Das freigesetzte Dimer RelB/p52 ist dann in der Lage, in den Kern zu wandern. Der alternative Weg läuft im Vergleich zum kanonischen deutlich langsamer ab, da er auf Proteinneusynthese angewiesen ist und er wird in der Regel seltener aktiviert als der kanonische.

Für einige Mitglieder der Tumornekrose Faktor-Familie ist eine Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalweges beschrieben. Durch TRAIL, den TNF-verwandten Apoptose-

induzierenden Liganden, um den es sich in dieser Arbeit dreht, wird nach bisherigem Wissensstand ausschließlich der kanonische Signalweg aktiviert.

2.2. Die TNF-Familie

Zu der Familie der TNF (Tumornekrose Faktor)-Liganden zählt man heute 18 Gene, die insgesamt für 19 Proteine, 18 Typ II Transmembranproteine und ein sezerniertes Protein, kodieren. Sie sind zusammen mit ihren bisher bekannten Rezeptoren in Abb. 2 dargestellt. Ihr N-terminus befindet sich intrazellulär, während der C-Terminus außerhalb der Zelle liegt. Lösliche Formen der Liganden können dabei durch limitierte Proteolyse durch zum Beispiel Metalloproteasen der ADAM („A disintegrin and metalloprotease domain“) Familie erzeugt werden. Charakteristisch für die Liganden ist eine ähnliche räumliche Struktur und die konservierte TNF homologe Domäne (THD) im C-Terminus. Sie ist für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich und ihre Aminosäuresequenz gleicht sich innerhalb der Familie um 20-30% (Bodmer et al., 2002).

Mitglieder der TNF-Familie sind unter anderem beteiligt an der Organisation und Funktion

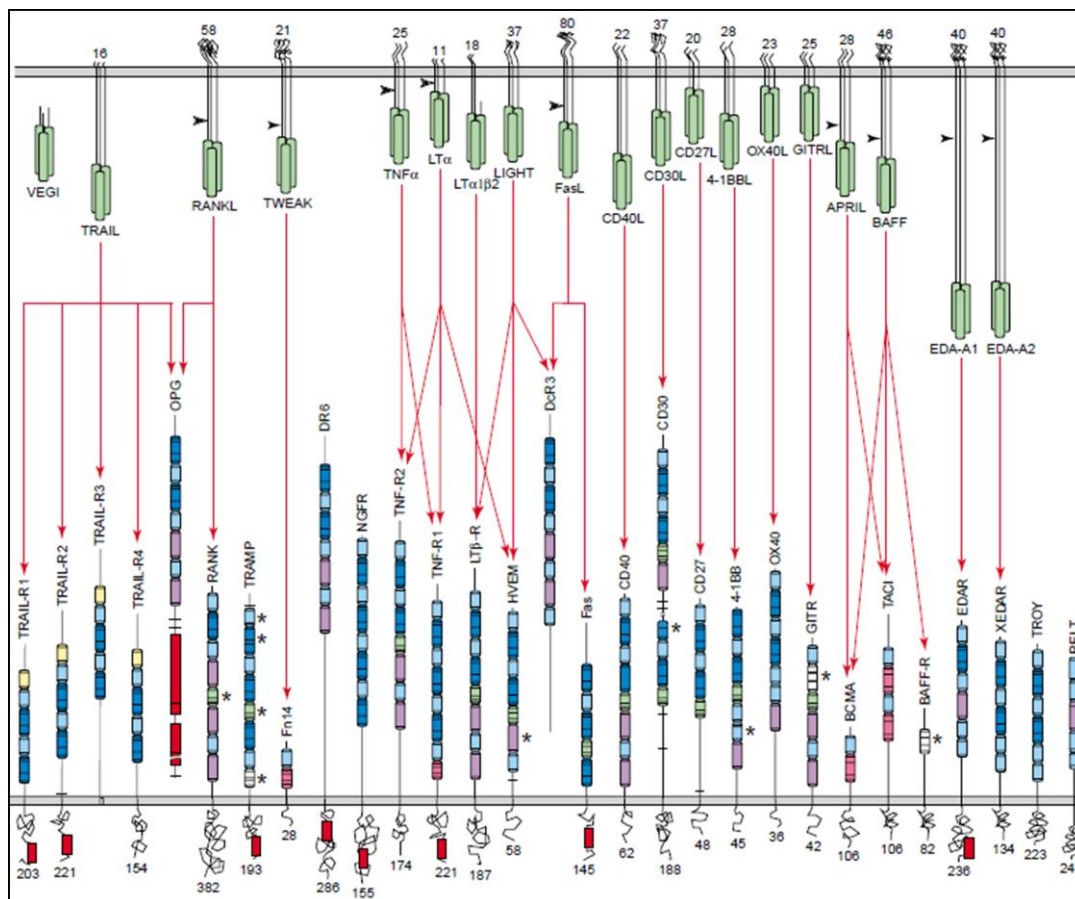


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Familie der TNF-Liganden (oben) und ihrer Rezeptoren (unten). Die Liganden sind mit ihrer konservierten TNF-homologen Domäne (grün) als Trimere dargestellt. Schwarze Pfeilspitzen deuten Stellen proteolytischer Spaltung an. Bekannte Interaktionen sind durch rote Pfeile angedeutet. Farbige Module in den extrazellulären Bereichen der Rezeptoren stellen die cysteinreichen Domänen dar, wobei die Positionen der Cysteine durch Linien angedeutet sind. Die intrazelluläre Todesdomäne ist durch eine rote Box gekennzeichnet und die Zahlen entsprechen jeweils der Anzahl intrazellulärer Aminosäuren (modifiziert nach Bodmer et al., 2002).

des Immunsystems, Entzündungsprozessen und der Induktion von Apoptose im Körper (Locksley et al., 2001). Für die Mitglieder TNF α und CD95 konnte zudem gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, in Tumorzellen Apoptose zu induzieren. Die Hoffnung diese antitumorale Wirkung für die Therapie nutzbar zu machen, erfüllte sich für diese beiden Proteine aber bisher nicht, da der systemische Einsatz akut toxisch war (Havell et al., 1988; Walczak et al., 1999).

Trotzdem stehen TNF-verwandte Proteine auch weiter im Focus für neue Therapien, da sie viele relevante Prozesse im Körper regulieren. Besonders im Bereich der genetischen Erkrankungen zeigen sich immer neue Verknüpfungen zu Proteinen der TNF-Familie. Beispielsweise ist TNF α ein wichtiger Faktor im Entzündungsgeschehen im Rahmen rheumatoider Arthritis und bietet damit einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie dieser chronischen Erkrankung. Spezifische Inhibitoren von TNF α werden bereits als sogenannte „Biologicals“ in der Therapie sehr erfolgreich eingesetzt (Feldmann & Maini, 2010).

Die Entdeckung eines weiteren Mitglieds, dem TNF-verwandten Apoptose induzierenden Liganden TRAIL, eröffnete inzwischen wieder eine neue Möglichkeit für den potentiellen Einsatz in der Tumorthherapie.

2.3. Der TNF-verwandte Apoptose induzierende Ligand „TRAIL“

Bei TRAIL („TNF related Apoptosis inducing ligand“) handelt es sich um ein 281 Aminosäuren langes Transmembranprotein, dessen extrazellulärer C-Terminus durch proteolytische Spaltung als lösliches TRAIL freigesetzt werden kann (Pitti et al., 1996). Für die Metalloprotease 2 konnte in vitro gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, TRAIL zu spalten; die physiologische Rolle des löslichen TRAILs ist jedoch relativ unklar (Secchiero et al., 2010). Im Gegensatz zu anderen TNF Familienmitgliedern wie etwa dem Fas Liganden, sind bei TRAIL sowohl die membrangebundene, als auch die lösliche Form in der Lage, Apoptose zu induzieren (Wiley et al., 1995). Für die Aktivität von TRAIL ist dabei die in Abb. 3 dargestellte Bildung eines Trimers entscheidend, welche durch das Cystein 230 von TRAIL und einem Zink-Ion koordiniert wird

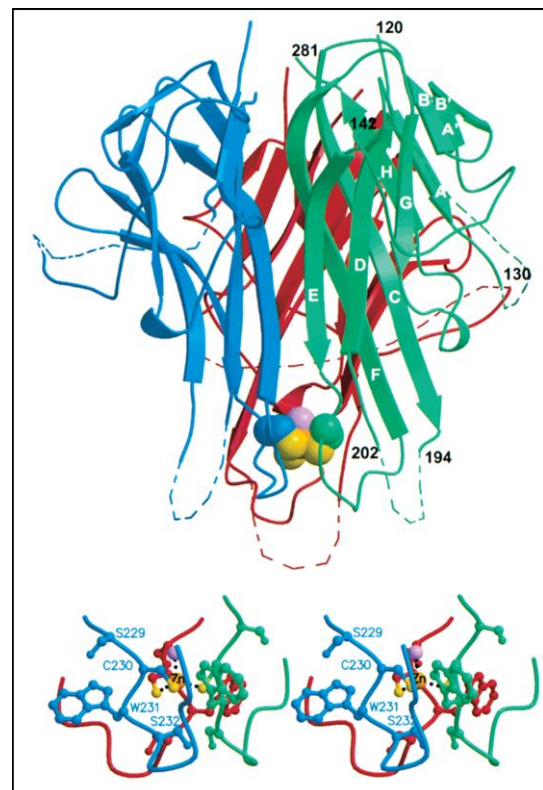


Abbildung 3: Kristallstruktur des TRAIL-Trimers (oben) und detaillierte Darstellung des zentralen Zink-Ions und der Cysteine der beteiligten TRAIL-Moleküle (unten) (Hymowitz et al., 2000)

(Hymowitz et al., 2000; Tratzuni et al., 2000). Die Substitution des Cysteins durch Serin, Glycin oder Alanin führt daher zu einem völligen Verlust der Aktivität von TRAIL (Bodmer et al., 2000; Seol & Billiar, 2000). Eine Besonderheit von TRAIL gegenüber zum Beispiel TNF α ist die Fähigkeit, spezifisch Apoptose in Tumorzellen zu aktivieren, ohne normales Gewebe zu schädigen, wobei bisher der Resistenzmechanismus nicht eindeutig geklärt ist (Tracey et al., 1986; Walczak et al., 1999; Zhang et al., 2000). Diese Eigenschaft macht TRAIL zu einem vielversprechenden Kandidaten für den Einsatz in der Tumorthherapie. TRAIL und ein agonistischer TRAIL-Rezeptor Antikörper werden momentan, teilweise in der Kombination mit konventionellen Zytostatika, in klinischen Studien getestet (www.ClinicalTrial.gov).

2.3.1. TRAIL-induzierte Apoptose

Wie der Name bereits andeutet, ist TRAIL in der Lage, in Tumorzellen Apoptose auszulösen. Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, die es erlaubt, im Körper, etwa in der Entwicklung, überflüssige oder geschädigte Zellen aus dem Gewebe zu entfernen, ohne dass eine Entzündung oder andere Schäden im Gewebe entstehen. Das Signal zur „Selbstzerstörung“ kann dabei sowohl durch intrinsische als auch durch extrinsische Signale gegeben werden. Die Bezeichnung Apoptose stammt von Kerr, Wyllie und Currie aus dem Jahre 1972 und beschreibt eine Art des Zelltods, die von charakteristischen morphologischen Veränderungen begleitet wird (Kerr et al., 1972).

Der Ablauf der Apoptose lässt sich in vier Phasen gliedern, deren Komponenten sich teilweise überlappen: Initiation, Signalübertragung, Effektorphase und „post-mortem“-Phase (Chowdhury et al., 2006). Dabei leitet zunächst ein Stimulus die Apoptose ein, das Signal wird in der Zelle weitergegeben, wo schließlich in der Effektorphase Proteasen und ihre Regulatoren aktiviert werden. In der letzten Phase der Apoptose wird das Chromatin der Zelle degradiert und in vivo die Zelle von benachbarten Zellen durch Phagozytose entfernt.

2.3.1.1. Überblick der Apoptoseinduktion durch TRAIL

Bei TRAIL findet dabei eine Induktion von Apoptose über den extrinsischen Signalweg statt. Die Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren 1 (TR1) und 2 (TR2) führt zur Bindung des Adaptorproteins FADD („Fas associated death domain“) und der Procaspasen 8 und 10 an den Rezeptorkomplex. Dabei wird die Initiatorcaspase 8 autokatalytisch aktiviert. Ob Caspase 10 ebenfalls in der Lage ist wie Caspase 8 als Initiatorcaspase zu agieren, ist umstritten aber doch wahrscheinlich (Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002; Wang et al., 2001). Die aktivierte Caspase wird vom Rezeptorkomplex freigesetzt, so dass erneut Procaspase 8 oder 10 binden kann. Die Initiatorcaspase ist dann in der Lage, zum einen die Effektorcaspase 3 zu aktivieren und damit die Caspase Kaskade in Gang zu setzen, und zum anderen das Protein Bid („BH3 interacting domain death agonist“) zu tBid (truncated

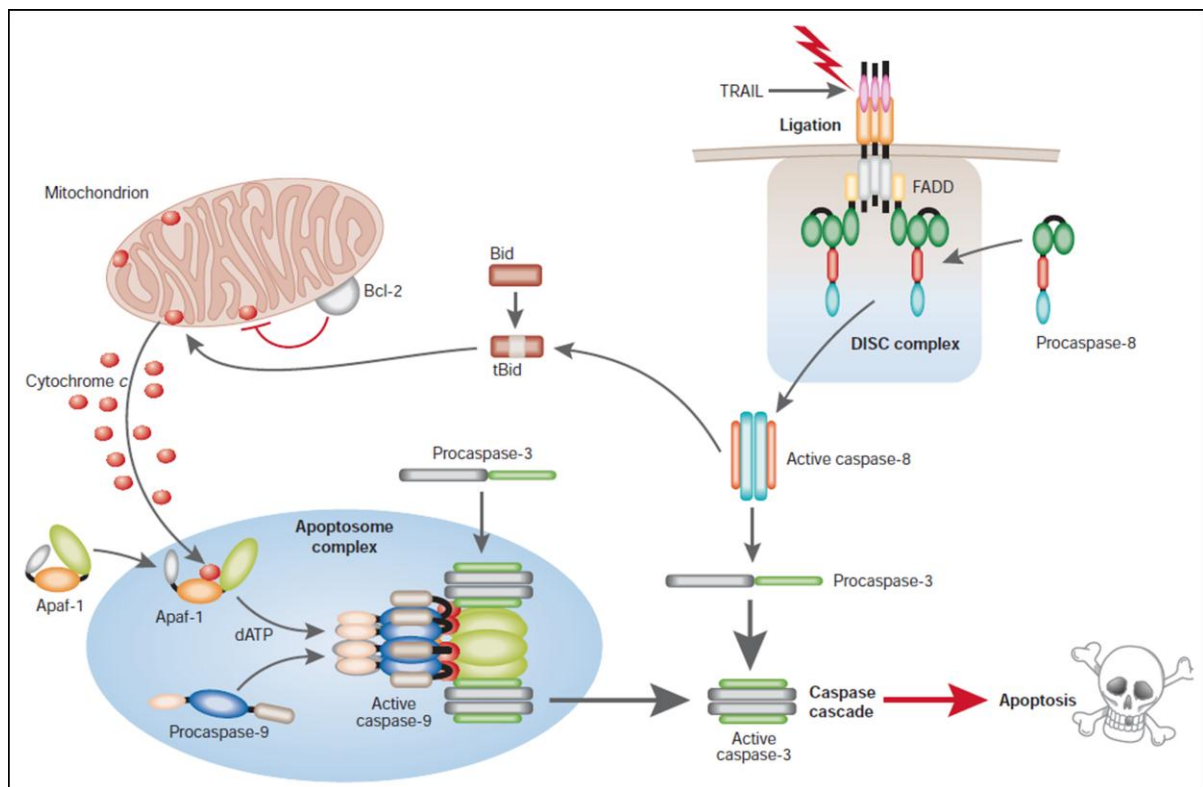


Abbildung 4: Schematische Darstellung der TRAIL-induzierten Apoptose (modifiziert nach MacFarlane & Williams, 2004). Die einzelnen Schritte der dargestellten Induktion von Apoptose sind im Text beschrieben.

Bid) zu spalten. Bid ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 („B-cell lymphoma 2“) Familie und führt nach Aktivierung zusammen mit Bak („Bcl-2 homologous antagonist killer“) und Bax („Bcl-2-associated X protein“) neben dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zu einer Freisetzung von Cytochrom C und Smac („second mitochondria-derived activator“) aus den Mitochondrien. Freies Cytochrom C bindet anschließend Apaf-1 und aktiviert auf diesem Weg Caspase 9, so dass das Apoptosom gebildet wird (Kandasamy et al., 2003). Freigesetztes Smac ist außerdem in der Lage, IAPs („inhibitor of apoptosis proteins“) zu binden und damit die Caspasenaktivierung zu verstärken (Huang et al., 2003). So wird zusätzlich eine Amplifikation der Apoptoseinduktion über den intrinsischen Signalweg erreicht. Über beide Wege werden schließlich die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert, gefolgt von den biochemischen und morphologischen Merkmalen der Apoptose, Zellkondensierung, DNS-Fragmentierung und das Abschnüren kleiner Zellkörperchen („membrane blebbing“) (Chowdhury et al., 2006). Eine vereinfachte Darstellung der Apoptoseinduktion durch TRAIL ist in Abb. 4 dargestellt (MacFarlane & Williams, 2004).

Untersuchungen des genauen Mechanismus der TRAIL-induzierten Apoptose gaben Aufschluss über den Einfluss der beiden Signalwege. Apoptose verhindern konnte die Inhibition von Caspase 8 wie auch die Überexpression von XIAP („X-linked inhibitor of apoptosis“), wodurch eine Hemmung der Caspasen 3, 7 und 9 erreicht wird. Eine Blockade

des intrinsischen Weges durch etwa die Überexpression antiapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie führte dagegen nur zu einer zeitlichen Verzögerung der Apoptose (Suliman et al., 2001).

Damit ist es TRAIL möglich, Apoptose in Zellen zu aktivieren, die auf Grund von Mutationen Defekte im intrinsischen Signalweg tragen, was einen Vorteil gegenüber der Verwendung vieler Substanzen bringt, die nur in der Lage sind diesen Signalweg der Apoptoseinduktion zu nutzen.

2.3.1.2. Der todesinduzierende Signalkomplex (DISC)

Die Induktion von Apoptose durch TRAIL wird über die beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 vermittelt und durch die Bindung des trimerisierten Liganden TRAIL initiiert. Die Aufklärung der Kristallstruktur des Komplexes aus TRAIL und TRAIL-Rezeptor 2 zeigte erstmals die genaue Anordnung der Rezeptoren um den trimerisierten Liganden (Cha, 2000; Hymowitz et al., 1999). Studien molekularer Dynamik deuten inzwischen darauf hin, dass nicht die Bindung des Liganden zu einer Trimerisierung der Rezeptoren führt, sondern dass diese bereits in der Membran aggregiert vorliegen. Die Bindung des Liganden führt dann zu einer Konformationsänderung innerhalb des Rezeptorkomplexes, durch die anschließend der aktive DISC („death inducing signaling complex“) gebildet werden kann (Wassenaar et al., 2008).

Der aktivierte Rezeptorkomplex rekrutiert anschließend FADD („Fas associated death domain“), sowie Caspase 8 und Caspase 10. Sie bilden zusammen den DISC und vermitteln die TRAIL-induzierte Apoptose (Sprick et al., 2002).

2.3.1.3. TRAIL-Rezeptoren

Neben den beiden bereits erwähnten membranständigen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, die auch als Todesrezeptoren 4 und 5 bezeichnet werden, sind noch drei weitere Rezeptoren bekannt; die beiden ebenfalls membranständigen TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 und der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (vgl. Abb. 5). Alle TRAIL-Rezeptoren besitzen extrazelluläre cysteinreiche Domänen, die für die Bindung des Liganden TRAIL notwendig sind. Die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 (TR1/TR2) tragen zudem eine intrazelluläre Todesdomäne, die für die Induktion von Apoptose durch TRAIL essentiell ist. Der TRAIL-Rezeptor 3 (TR3) besitzt dagegen keine intrazelluläre Domäne und ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden. TRAIL-Rezeptor 4 (TR4) besitzt zwar eine intrazelluläre Domäne, aber keine funktionsfähige Todesdomäne. Somit sind die TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 nicht in der Lage, das Apoptosesignal zu übermitteln, weshalb auch eine mögliche Inhibition der TRAIL-induzierten Apoptose durch diese beiden Rezeptoren diskutiert wird (Degli-Esposti et al., 1997; Pan,

1997a; Pan, 1997b; Sheridan, 1997). Osteoprotegerin (OPG) wird hingegen von der Zelle sezerniert und besitzt keine intrazelluläre Domäne. Dieser Rezeptor bindet neben TRAIL mit weit höherer Affinität an RANKL („receptor activator of NF- κ B ligand“), einen anderen Liganden der TNF-Familie, und wirkt in diesem Zusammenhang der Aktivierung von RANK („receptor activator of NF- κ B“) entgegen, weshalb OPG vor allem als Inhibitor der Osteoklastendifferenzierung in Erscheinung tritt (Simonet et al., 1997; Tekkesin et al., 2011).

2.3.1.4. Das Adaptorprotein FADD

Das Protein FADD wurde zunächst als Interaktionspartner von CD95, dem Fas Rezeptor, beschrieben, wobei kurze Zeit später dann auch seine Bindung an die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 gezeigt werden konnte (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Schneider et al., 1997).

Es besteht aus 208 Aminosäuren, mit einer N-Terminalen Todeseffektordomäne („death effector domain“, DED) und einer C-Terminalen Todesdomäne („death domain“, DD). Die Todesdomäne ist dabei notwendig für die Bindung an den Rezeptor, während die Todeseffektordomäne die Bindung zur Caspase 8 bzw. 10 vermittelt.

FADD ist essentiell für die Induktion von Apoptose durch TRAIL, obwohl zunächst ein FADD unabhängiger Signalweg postuliert wurde (Marsters et al., 1996; Schneider et al., 1997). Studien am TRAIL-Rezeptor 2 zeigten, dass weite Bereiche der Todesdomäne von FADD an der Rezeptorbindung beteiligt sind, und sich diese von den Bereichen, die für die Bindung von CD95 notwendig sind zum Teil unterscheiden (Thomas et al., 2006). Für TRAIL-Rezeptor 1 gibt es dazu allerdings bisher keine Informationen. Es konnte auch gezeigt werden, dass das konservierte Motiv RXDLL in der Todeseffektordomäne eine entscheidende Rolle bei der Aggregation von FADD Molekülen spielt. Der Austausch von nur zwei Aminosäuren der Sequenz RHDLL zu AHALL oder RHDA A führte zu einem kompletten Verlust der Fähigkeit zu aggregieren. Die sonst in FADD überexprimierenden Zellen

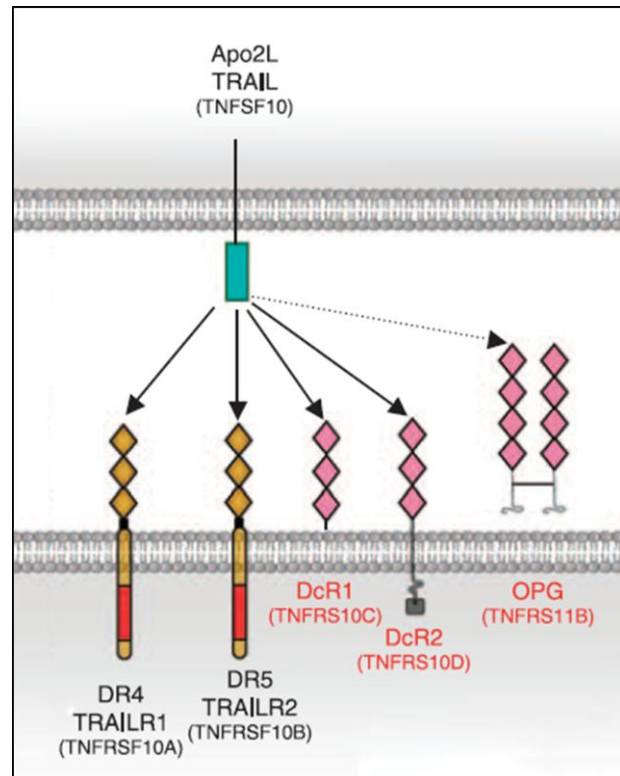


Abbildung 5: TRAIL und seine Rezeptoren. Dargestellt ist TRAIL (Apo2L) mit der TNF-homologen Domäne (blau). Gegenüber stehen seine Rezeptoren: die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 (DR4/5, TRAILR1/2) mit intrazellulärer Todesdomäne (rot) und extrazellulären cysteinreichen Domänen (◇), sowie die TRAIL-Rezeptoren 3, 4 (DcR1/2) und Osteoprotegerin (OPG). Sie besitzen zwar cysteinreiche Domänen (◇), aber keine funktionelle Todesdomäne. (Gonzalez & Ashkenazi, 2010)

beobachtete Bildung von Todeseffektorfilamenten („death effector filaments“) fand nach Veränderung des konservierten Motivs nicht mehr statt. In Untersuchungen in FADD defizienten Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass durch das Protein mit dem Motiv RHDA nach Stimulation mit Fas Ligand (FasL) keine Rekrutierung von Procaspase 8 in den CD95-DISC stattfand, obwohl eine Interaktion bei Überexpression der rekombinanten FADD Varianten AHALL und RHDA mit rekombinanter Caspase 8 prinzipiell möglich war. Durch die Tatsache, dass die FADD Varianten AHALL und RHDA nicht in der Lage waren, TRAIL- oder FasL-induzierte Apoptose zu vermitteln, konnte gezeigt werden, dass nicht allein die Bindung an den Rezeptor oder die Interaktion mit Caspase 8, sondern auch die Interaktion der FADD Moleküle im Rezeptorkomplex für die Ausbildung eines funktionellen DISC entscheidend sind (Muddipati et al., 2006).

Neben der klassischen Rolle von FADD als Adaptorprotein Todesrezeptor-induzierter Apoptose wurde für den Fas Rezeptor auch eine Beteiligung an der Induktion von NF- κ B vorgeschlagen, nachdem in einer FADD defizienten Zelllinie keine Induktion von NF- κ B durch FasL festgestellt werden konnte (Kreuz, 2004).

2.3.1.5. Caspase 8

Nach FADD konnte Caspase 8 („cysteiny-aspartate specific protease 8“), als essentielles Protein der TRAIL-induzierten Aktivierung von Apoptose identifiziert werden, wo sie durch FADD mit dem Rezeptor in Kontakt tritt (Sprick et al., 2000).

Von Caspase 8 existieren acht Isoformen, wobei vor allem aber die beiden Isoformen a und b exprimiert werden. Sie unterscheiden sich nur wenig und besitzen beide neben zwei N-terminalen Todeseffektordomänen, die große Untereinheit p20 mit dem katalytischen Zentrum und die kleine Untereinheit p10 (Scaffidi et al., 1997). Isoform a besteht aus 537 Aminosäuren, Isoform b ist dagegen mit 478 Aminosäuren etwas kleiner.

Die Eigenschaft von Caspase 8, dass sie als Initiatorcaspase in der Lage ist, sich selbst durch autoproteolytische Spaltung zu aktivieren, unterscheidet sie von den Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die ebenfalls wie Caspase 8, 9 und 10 in der Apoptose eine entscheidende Rolle einnehmen. Kontrovers diskutiert wird bisher die Rolle von Caspase 10, die ebenfalls an den TRAIL-Rezeptorkomplex rekrutiert werden kann. Sie ist möglicherweise ebenfalls eine Initiatorcaspase und in der Lage, die Funktion von Caspase 8 zu ersetzen. Jedoch gibt es auch gegenteilige Berichte, weshalb die Relevanz der Caspase 10 für TRAIL-induzierte Apoptose nicht eindeutig geklärt ist (Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002; Wang et al., 2001).

2.3.1.6. Weitere Proteine am DISC

Neben den beiden vielfach beschriebenen Interaktionspartnern FADD und Caspase 8 ist auch die Bindung von c-FLIP („cellular FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein“) in seinen beiden Spleißvarianten c-FLIP_L und c-FLIP_S an die TRAIL-Rezeptoren beschrieben (Xiao et al., 2002). Die Rolle von c-FLIP am Rezeptorkomplex wird allerdings kontrovers diskutiert. Während c-FLIP_L und c-FLIP_S in Überexpressionssituationen eine Inhibition der TRAIL-induzierten Apoptose zugeschrieben wird, konnte am Beispiel von CD95 gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen eher eine Aktivierung von Caspase 8 durch c-FLIP_L stattfindet (Bin et al., 2002; Chang et al., 2002; Seal et al., 2008). In Keratinozyten konnte außerdem eine Inhibition der TRAIL-induzierten NF- κ B Aktivierung durch c-FLIP_L gezeigt werden (Wachter et al., 2004).

Darüber hinaus wurde vereinzelt die Bindung weiterer Proteine an den TRAIL-DISC beschrieben:

Die direkte Bindung von TRADD („TNF receptor associated death domain“), TRAF2 („TNF associated factor 2“) oder RIP („receptor interacting protein“) die an der direkten Signalübertragung am TNF-Rezeptor beteiligt sind, wurde anfangs zwar für RIP und TRADD beschrieben, konnte aber an anderer Stelle nicht reproduziert werden (Chaudhary et al., 1997). Die Beteiligung dieser Proteine am TRAIL-Signalweg wurde später auch in indirekter Form als rezeptorunabhängiger Komplex II vorgeschlagen (Varfolomeev et al., 2005).

Massenspektrometrische Untersuchungen des TRAIL-Rezeptor 1-Komplexes identifizierten PRMT5 („protein arginine methyltransferase 5“) als weiteren Interaktionspartner. Überexpressionsstudien konnten die Interaktion der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 mit PRMT5 bestätigen, wobei die Bindung unabhängig von der Todesdomäne stattfand. Eine Verminderung der Expression von PRMT5 in verschiedenen Zelllinien deutete auf einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose hin (Tanaka et al., 2009). Ein weiterer in Glioblastomzellen identifizierter Interaktionspartner des TRAIL-Rezeptors 2 ist PEA-15 („phosphoprotein enriched in diabetes or in astrocyte-15“), das dabei nur in einer resistenten Zelllinie, nicht aber in einer sensitiven Zelllinie an den DISC rekrutiert wurde. Die Autoren vermuten eine durch PEA-15 regulierte Resistenz gegen TRAIL-induzierte Apoptose durch Verhinderung der Translokation des TRAIL-Rezeptor 2-Komplexes in „lipid rafts“ (Bellail et al., 2010; Xiao et al., 2002). Dabei handelt es sich um spezielle Bereiche in der Zellmembran, die sich unter anderem durch eine veränderte Lipidzusammensetzung auszeichnen. Für TNF-Rezeptor 1 ist die Translokation in „lipid rafts“ als kritischer Schritt der TNF α induzierten NF- κ B Aktivierung beschrieben (Legler et al., 2003). Studien an Cholesterin-verarmten Zellen deuten allerdings darauf hin, dass zumindest die NF- κ B und ERK Aktivierung von TRAIL unabhängig von „lipid rafts“ stattfindet (Song et al., 2007).

Das Protein IG20 („Insulinoma-Glucagonoma clone 20“) bindet an TRAIL-Rezeptor 1, sowie TRAIL-Rezeptor 2 und soll dabei zu einem Anstieg der TRAIL-induzierten Apoptose führen, während Spleißvarianten des Proteins im Gegenzug zur Resistenz von Zellen beitragen können (Prabhakar et al., 2008; Ramaswamy et al., 2004).

Ein weiterer potentieller Interaktionspartner von TRAIL-Rezeptor 1, der in einem Hefe-zwei-Hybrid-System identifiziert wurde, ist Bcl-10 (auch c-E10). Die Interaktion der beiden Proteine konnte allerdings auch bei Überexpression in einer Immunpräzipitation nicht eindeutig gezeigt werden (Costanzo et al., 1999).

In der Zukunft werden noch weitere Interaktionspartner der TRAIL-Rezeptoren entdeckt werden, so dass immer komplexere Zusammenhänge der Signalwege offensichtlich werden. Im Moment können wir über die Funktion einiger dieser Proteine am DISC nur mutmaßen, da bisher vor allem der Apoptosesignalweg untersucht wurde.

2.3.2. Biologische Bedeutung von TRAIL

Die biologischen Funktionen von TRAIL sind sehr vielfältig, aber in weiten Bereichen noch wenig aufgeklärt. Auch die TRAIL-defiziente Maus brachte dabei wenig Klarheit, da sie keinen eindeutigen Phänotyp zeigt (Falschlehner et al., 2009). Die Expression von TRAIL wurde jedoch in verschiedenen Geweben, vor allem der glatten Muskulatur, Lunge, Schilddrüse, Gebärmutter, Prostata und im Kleinhirn nachgewiesen (Daniels et al., 2005).

Im Folgenden sind daher nur einige Beispiele der bisher beschriebenen Funktionen von TRAIL genannt.

Für vaskuläre glatte Muskelzellen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass TRAIL durch die Aktivierung von NF- κ B Proliferation induziert, gleichzeitig aber die Zellerneuerung in den Gefäßwänden durch Induktion von Apoptose steuert (Kavurma et al., 2008). Untersuchungen an Ratten deuteten sogar auf TRAIL als einen Regulator des Gefäßtonus hin, möglicherweise bedingt durch TRAIL-induzierte Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Zellen des Gefäßendothels (Vaccarezza et al., 2007).

Abhängig von NF- κ B führt die Überexpression der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, wie auch die Aktivierung durch einen agonistischen Antikörper, in verschiedenen Zelllinien zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie etwa Interleukin 8 (IL-8) und TNF α , was wiederum stark auf eine Rolle von TRAIL in Entzündungsreaktionen hindeutet (Tang et al., 2009).

Häufiger untersucht wurde die Expression von TRAIL in verschiedenen Zellen des Immunsystems, die wiederum abhängig vom Stimulationsstatus der jeweiligen Zellen ist. Dazu gehören natürliche Killerzellen (NK-Zellen), T-Zellen, natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen), dendritische Zellen und Makrophagen.

In NK-Zellen konnte dabei eine direkte tumor-suppressive Wirkung durch TRAIL gezeigt werden. Sie sind durch die Interferon- γ induzierte Expression von TRAIL zum einen in der Lage, Tumorzelllinien in vitro abzutöten und zum anderen die Bildung experimenteller

Tumore und Metastasen in vivo zu verhindern (Kayagaki et al., 1999; Takeda et al., 2001a; Takeda et al., 2001b).

Darüber hinaus wurde eine Rolle von TRAIL in der Immunantwort viraler Infektionen beschrieben. Zum Beispiel regulieren humane Fibroblasten nach Infektion mit humanem Cytomegalie-Virus (HCMV) die Expression der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 hoch und werden dadurch sensitiv für TRAIL-induzierte Apoptose (Sedger et al., 1999). Im Gegenzug ist aber auch gezeigt worden, dass das Masernvirus in der Lage ist, sich die TRAIL-induzierte Apoptose zu Nutze zu machen und damit die Immunreaktion zu unterdrücken. Dabei induzieren dendritische Zellen nach Infektion die Expression von TRAIL und sind so in der Lage, aktivierte T-Zellen zu eliminieren und damit die antivirale Immunantwort zu hemmen (Vidalain et al., 2000).

TRAIL scheint somit in verschiedenen Geweben und Zelltypen komplexe Funktionen zu erfüllen, die nicht nur auf die Induktion von Apoptose beschränkt sind, sondern bei denen auch die Aktivierung von NF- κ B eine wichtige Rolle spielt. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch weitgehend unerforscht.

2.3.3. TRAIL-induzierte Aktivierung von NF- κ B

Da das Hauptaugenmerk der Forschung vor allem auf den Apoptosesignalweg gerichtet war, ist bis heute verhältnismäßig wenig über die weiteren von TRAIL-induzierten Signalwege und ihre Bedeutung erforscht. Bereits 1997/98 konnte in der Arbeitsgruppe und auch anderen Laboren gezeigt werden, dass TRAIL in der Lage ist, NF- κ B zu aktivieren, wobei die beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, aber auch TRAIL-Rezeptor 4 diese Aktivierung vermitteln (Degli-Esposti et al., 1997; Jeremias & Debatin, 1998; Schneider et al., 1997). Die beobachtete Beteiligung von I κ B α und Aktivierung von p50 und p65 sprechen dabei für eine Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges (Secchiero, 2003).

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten die Rolle der TRAIL-induzierten NF- κ B Aktivierung bei der Regulation der Apoptosesensitivität (Jeremias et al., 1998). Häufig wurde beobachtet, dass eine Inhibition von NF- κ B zu einer Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose führte, diese aber in bestimmten Zelllinien nicht in der Lage war, eine vollständige Resistenz zu überwinden (Bellail et al., 2010; Jeremias et al., 1998; Keane et al., 2000).

In verschiedenen Zelllinien und auch primärem Tumormaterial konnte zudem in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL sogar in der Lage war, Überleben und Proliferation zu induzieren, was eine sehr nachteilige Wirkung für den Einsatz in der Tumorthherapie darstellt. TRAIL-induzierte Proliferation konnte dabei in 25% der primären Proben ermittelt werden, was dafür spricht, dass es sich um ein relativ häufiges Phänomen in Tumorzellen handelt. Es gelang auch die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 als die Vermittler der TRAIL-induzierten Proliferation zu identifizieren. Der Einsatz von NF- κ B Inhibitoren und ein fehlender Effekt auf IKK γ -negative Zellen zeigten die Abhängigkeit der

Proliferation von NF- κ B. Ein ebenfalls fehlender Effekt auf RIP-defizienten Zellen, deutete zudem auf eine Beteiligung von RIP an der TRAIL-induzierten Proliferation hin (Baader et al., 2005; Ehrhardt et al., 2003).

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Proteine als mögliche Regulatoren der TRAIL-induzierten NF- κ B Aktivierung vorgeschlagen, aber bis heute ist nicht geklärt, wie die Vermittlung der Aktivierung vom Rezeptor zu NF- κ B vonstattengeht.

Ein Einfluss auf die Aktivierung wurde zum einen für PRMT5 beobachtet. Das Protein hatte zwar keinen Einfluss auf die Formierung des DISC, der Einsatz einer siRNA gegen PRMT5 erhöhte allerdings die Apoptoseinduktion und verringerte parallel die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar (Tanaka et al., 2009).

Studien in defizienten Mausfibroblasten, deuteten zum anderen auch auf eine Rolle von RIP in der Aktivierung von NF- κ B durch TRAIL hin, wobei hier keine direkte Interaktion mit dem Rezeptor gezeigt werden konnte (Lin et al., 2000). Dafür spricht auch die fehlende TRAIL-induzierte Proliferation in RIP-defizienten Zellen (Ehrhardt et al., 2003). TRAF2 defiziente Mausfibroblasten waren dagegen in der Lage, NF- κ B wie der Wildtyp zu aktivieren, wodurch TRAF2 zumindest kein essentieller Bestandteil des Signalweges zu sein scheint (Lin et al., 2000).

Für c-FLIP_L gibt es dagegen Hinweise auf eine inhibitorische Wirkung auf den TRAIL-induzierten NF- κ B-Signalweg, auch wenn c-FLIP und seinen Prozessierungsprodukten anderweitig NF- κ B induzierende Eigenschaften zugeschrieben werden (Kataoka & Tschopp, 2004; Li et al., 2003; Wachter et al., 2004).

Bisher war es jedoch nicht gelungen, ein Protein zu identifizieren, das essentiell für die NF- κ B Aktivierung ist und gleichzeitig eine direkte Verbindung zu den TRAIL-Rezeptoren darstellt.

Neben NF- κ B wurde nach Stimulation mit TRAIL auch die Aktivierung weiterer Signalwege beobachtet, deren Funktionen in diesem Zusammenhang weitgehend ungeklärt sind. Die Beteiligung der verschiedenen Signalwege scheint zwischen Zelllinien zu variieren, aber die Phosphorylierung von Akt (Proteinkinase B) und ERK1/2 („extracellular signal-regulated kinase 1/2“) wurde mehrfach beschrieben (Secchiero et al., 2004; Xu et al., 2010). Auch die Aktivierung von JNK („c-Jun N-terminal kinase“) und p38 MAP Kinase („P38 mitogen-activated protein kinase“), die möglicherweise über dieselbe Kinase MEKK1 („MAP/ERK kinase kinase 1“) aktiviert werden, ist bekannt (Sun et al., 2011).

Daraus ergibt sich ein immer komplexeres Bild der Wirkung von TRAIL, wobei praktisch alle diese Signalwege Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose zu haben scheinen. Für ein besseres Verständnis der Wirkung von TRAIL und dem Mechanismus der Apoptoseresistenz ist daher weitere Forschung notwendig.

Zusammenfassend stellt TRAIL ein vielversprechendes zukünftiges Zytostatikum dar, das aktuell in klinischen Studien der Phasen I und II getestet wird. Neben der Induktion von Apoptose ist TRAIL allerdings auch in der Lage, NF- κ B zu aktivieren und damit Überleben und Proliferation in Tumorzellen zu fördern. Um deshalb diese nachteilige Eigenschaft in der Therapie umgehen zu können, ist ein besseres Verständnis des Signalweges der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B nötig. Daher war es Ziel dieser Arbeit, den rezeptornahen Signalweg genauer zu untersuchen.

3. Zielsetzung

TRAIL, der TNF-verwandte Apoptose induzierende Ligand, gilt als vielversprechender Kandidat für den Einsatz in der Tumorthherapie, da TRAIL gezielt Tumorzellen abtötet, ohne normales Gewebe zu schädigen. TRAIL und der agonistischen Antikörper gegen TRAIL-Rezeptor 1 TRM-1 werden aus diesem Grund in klinischen Studien getestet.

TRAIL aktiviert jedoch auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B in Tumorzellen, was die antitumorale Wirkung von TRAIL vermindern kann. Die Aktivierung von NF- κ B gilt als möglicher Mechanismus der Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. TRAIL aktiviert über NF- κ B Zielgene, die Überleben und Proliferation verstärken, so dass TRAIL in manchen Tumorzellen Proliferation induziert. Diese Wirkung von TRAIL ist während der Tumorthherapie unerwünscht.

Ideal wäre es daher für eine Tumorthherapie mit TRAIL, den Apoptosesignalweg selektiv ohne Induktion von NF- κ B durch TRAIL aktivieren zu können. Dafür ist es notwendig, den Signalweg der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B besser zu verstehen, da dieser im Gegensatz zum Apoptosesignalweg nur wenig charakterisiert ist.

Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, den rezeptornahen Signalweg der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B zu charakterisieren und das Rezeptoradaptorprotein zu identifizieren.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Antikörper

Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper für die Western-Analyse erfolgte, soweit vom Hersteller nicht anders empfohlen, in TBST mit 5% Magermilchpulver. Zur Konservierung der Primärantikörper wurde gegebenenfalls 0,1% Natriumazid zugesetzt. (BD Bioscience, Heidelberg; Cell Signaling Technology, Danvers (USA); Enzo Life Sciences, Lörrach; Elisabeth Kremmer (HMGU), München; ProSci Incorporated, Poway (USA); Abcam, Cambridge (UK); Merck, Darmstadt; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA); Southern Biotech, Birmingham(USA))

Tabelle 4.1 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
TRAIL-R1(hu):Fc(hu)	Mensch	Inhibition von TRAIL		Enzo Life Sciences
α -Tubulin mAb DM1A	Maus	Western-Analyse	1:1000	Merck
Caspase-3 mAb 3G2	Maus	Western-Analyse	1:1000	Cell Signaling
Caspase-8 mAb C15	Maus	Western-Analyse	1:1000	Enzo Life Sciences
Caspase-10 mAb 4C1	Maus	Western-Analyse	1:1000	Enzo Life Sciences
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) mAb	Kaninchen	Western-Analyse	1:1000	Cell Signaling
HA mAb 3F10	Ratte	Western-Analyse	1:10000	E. Kremmer
DR4 pAb	Kaninchen	Western-Analyse	1:1000	ProSci Incorp.
DR5 pAb	Kaninchen	Western-Analyse	1:1000	Abcam
GAPDH mAb 6C5	Maus	Western-Analyse	1:5000	BD/ Merck
c-FLIP mAb NF6	Maus	Western-Analyse	1:1000	Enzo Life Sciences
FADD mAb	Maus	Western-Analyse	1:1000	BD Bioscience
RIP mAb	Maus	Western-Analyse	1:1000	BD Bioscience
p-IkB α mAb 14D4	Kaninchen	Western-Analyse	1:1000	Cell Signaling
IkB α pAb	Kaninchen	Western-Analyse	1:1000	Santa Cruz
Mouse	Pferd	Western-Analyse	1:5000	Cell Signaling
Rabbit	Ziege	Western-Analyse	1:5000	Cell Signaling
Anti-mouse kappa	Ziege	Western-Analyse	1:5000	Southern Biotech
Anti-mouse IgG ₁	Ziege	Western-Analyse	1:5000	Southern Biotech
Anti-mouse IgG _{2b}	Ziege	Western-Analyse	1:5000	Southern Biotech

4.1.2. Bakterienstämme

Für verschiedene Anwendungen wurden modifizierte *E. coli* Stämme verwendet, die sich für den jeweiligen Verwendungszweck besonders eigneten. *E. coli* der Firma Agilent wurden direkt nach Angaben des Herstellers für die Transformation eingesetzt, die anderen Stämme wurden als Glycerolkultur erworben und wie in Kapitel 4.2.1.8. beschreiben chemisch kompetent gemacht (Agilent, Waldbronn; Gene Choice, Frederick (USA); Merck, Darmstadt).

Tabelle 4.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Hersteller
GC10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>endA1</i> <i>recA1</i> $\Delta(ara,$ <i>leu)7697</i> <i>araD139</i> <i>galU</i> <i>galK</i> <i>nupG</i> <i>rpsL</i> λ - T1R	Klonierung	Gene Choice
XL10-Gold	Tetr Δ (<i>mcrA</i>)183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> The [F' <i>proAB lacIqZ\Delta M15</i> Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Quick Change Lightning	Agilent
XL1-Blue	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ\Delta M15</i> Tn10 (Tetr)]	Quick Change II	Agilent
BL21(DE3)	F – <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB– mB–) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Proteinexpression	Merck
BL21(DE3)pLysS9	F – <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB– mB–) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)pLysS (CamR)	Proteinexpression	Merck
Rosetta(DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB m) (DE3)-B- <i>gal</i> <i>dcm</i> pRARE (CamR)	Proteinexpression	Merck

4.1.3. Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen stammen von den Firmen Bio-Rad (München), Carl Roth (Karlsruhe), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen), bzw. sind im Folgenden erwähnt.

Gel-Transfer-Puffer	Klinikum Großhadern, München
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Loading Dye (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Nonidet P-40	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Page Ruler, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Restore Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Karlsruhe
Salmon Sperm DNA	Agilent, Waldbronn
Shield-1	Cheminpharma LCC, Farmington (USA)
Super Signal West Femto (ECL)	Thermo Scientific, Karlsruhe
TNF α , human	PeproTech GmbH, Hamburg
TRAIL, human	PeproTech GmbH, Hamburg
Turbofect in vitro Transfection Reagent	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.4. Enzyme

Alle verwendete Restriktionsenzyme stammten von Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Ipswich, UK).

GoTaq DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Platinum Pxf DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.5. Geräte und Software

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese	
EasyPhor Mini und Medi	Biozym, Hessisch Oldendorf
Mini-PROTEAN 3 Elektrophorese System	Bio-Rad, München
Entwicklermaschine CP1000	AGFA, Mortsels (B)
FACScan	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Calibur	BD Bioscience, Heidelberg
Transferkammer Mini-Protean III	Bio-Rad, München
Nucleofector I	Lonza, Köln
Orion II Multiplate Luminometer	Berthold, Bad Wildbad
pH Meter HI 221	HANNA instruments, Kehl am Rhein
Stromgeber Power Supply Basic	Bio-Rad, München
Präzisionswaage 440-43N	Kern, Balingen-Frommern
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Sunrise Microplate Reader	Tecan, Männedorf (CH)
Thermo-Cycler Primus 25 advanced	Peqlab, Erlangen

Für Auswertung und graphische Darstellung von Daten wurden die Programme „Excel“ und „PowerPoint“ des Microsoft Office Paketes verwendet. Die Analyse von durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit Hilfe von „CellQuestPro“ und DNA-Sequenzen wurden mit „Clone Manager 7“ bearbeitet.

Zum Entwerfen von Mutageneseprimern wurde das QuikChange® Primer Design Program (<https://www.genomics.agilent.com>) verwendet. Die Analyse von Oligonukleotiden, Sequenzierungen und Proteinen erfolgte mit Hilfe folgender Internet-basierender Programme:

Multalign Interface Page (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>),
Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>),

Oligo Analyzer	(http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/),
Interpro Scan	(http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/)
Blast	(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

4.1.6. Kommerzielle Reagenziensätze

Amaya Human T Cell Nucleofector Kit	Lonza, Köln
Dual Luciferase Assay	Promega, Mannheim
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent, Waldbronn
QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent, Waldbronn
TransAM NF- κ B p65	Active Motif, Rixensart (B)

4.1.7. Medien

4.1.7.1. Mikrobiologie

LB-Medium	1% NaCl; 0,5% Hefeextrakt; 1% Pepton; ad 1 l ddH ₂ O, autoklavieren
LB-Agar	1% NaCl; 0,5% Hefeextrakt; 1% Pepton; ad 1 l ddH ₂ O; 1,5% Agar, autoklavieren
SOC-Medium	10 mM NaCl; 0,5% Hefeextrakt; 2% Pepton; 2,5 mM KCl; ad 1 l ddH ₂ O (pH 7,0), autoklavieren 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose steril zugeben
ZY	1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; ad 925 ml ddH ₂ O, autoklavieren
20xNPS	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1 M KH ₂ HPO ₄ ; 1 M Na ₂ HPO ₄ ; ad 1 l ddH ₂ O, sterilfiltrieren
50x5052	25% Glycerol (w/v); 2,5% Glucose; 10% α -Lactose; ad 1 l ddH ₂ O, sterilfiltrieren
Autoinduktions-Medium	5 ml NPS; 2 ml 5052; 10 mM MgCl ₂ ; ad 100 ml ZY

1000xAmpicillin 10% Ampicillin; ad 10 ml ddH₂O, sterilfiltrieren

TSS 10% Polyethylenglykol 8000; 5% DMSO; 30 mM MgCl₂ in LB-Medium

4.1.7.2. Zellkultur

RPMI RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
10% FCS (Biozol, Eching)
1% Glutamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

DMEM DMEM (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
10% FCS (Biozol, Eching)
1% Glutamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

Einfriermedium FCS (Biozol, Eching)
10% DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

4.1.8. Oligonukleotide

Für die Klonierung des Isoleucin Zipper Motivs wurde die DNA-Sequenz mittels Gensynthese durch die Firma GeneArt (Regensburg) hergestellt und in einem Transfervektor zur Verfügung gestellt. Die Sequenz ist in Tabelle 4.4 dargestellt und setzt sich aus der Sequenz des Isoleucin Zipper, verschiedener Epitope für Detektion und Reinigung und den jeweils flankierenden Schnittstellen zusammen.

Alle anderen Oligonukleotide und siRNAs wurden, soweit nicht anders angegeben, von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 4.3 siRNAs

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
AllStars Neg. siRNA		Qiagen
AF 488		
silamin Fam	ACU GCA GCA UCA UGU AAU CTT	MWG
siFADD 0602	ACG TCA TAT GTG ATA ATG TdTT	MWG
siCaspase 8	GGG UCA UGC UCU AUC AGA Utt	MWG
siCaspase 8 Besch	GCU CUU CCG AAU UAA UAG Att	MWG

Tabelle 4.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Isoleucin Zipper mit Restriktionsschnittstellen und verschiedenen Epitopen	CATATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACCCGCGGTCCATGG TTTGGAGCCACCCGCGAGTTTCGAAAAAGAAAACCTGTATTTTCAGGG AGCCATGGTTACCGGTGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG AATACCGGTACGCGTTATCCGTATGATGTGCCGGATTATGCGACGC GTGACGATGACGATAAGCCGCGGGGCTCCGGCAAGCTTAGAATGA AACAAATTGAAGACAAGATTGAAGAAATCCTTTTCGAAATTTATCAC ATCGAAATGAGATTGCCAGAATCAAGAAATTAATTGGCGAACGCA AGCTTGATCCGAATTC	Klonierung der TRAIL-Varianten
1For_DR4_AflII	GGG GGG GCT TAA GTG TTG TTG CAT CGG CTC AGG TTG	PCR
2Rev_DR4_BlnI	CCC CCC CGC TTA GCA AGC TTG GCC TCA CTG GCC GGG TGA TCA CTC CAA GGA CAC GGC AGA GCC	PCR
3For_DR5_AflII	GGG GGG GCT TAA GCT GTG GAA GAA AGT CCT TCC TTA CCT G	PCR
4Rev_DR5_BlnI	CCC CCC CGC TTA GCA AGC TTG GCC TCA CTG GCC GGG TGA TCA GGA CAT GGC AGA GTC TGC ATT ACC	PCR
T2A_Puro_Fwd	ATA AGA ATG CGG CCG CAG AGG GCA GAG GAA GTC	PCR
T2A_Puro_Rev	ATA GTT TAG CGG CCG CGG CAC CGG GCT T	PCR
FADD_Fwd_EcoRI	CCG GAA TTC ATG GAC CCG TTC CTG GTG CTG	PCR
FADD_Rev_NotI	ATA GTT TAG CGG CCG CGG ACG CTT CGG AGG TAG ATG CG	PCR
Casp8_Fwd_MfeI	CGG CCC AAT TGA TGG ACT TCA GCA GAA ATC T	PCR
Casp8_Rev_NotI	ATA GTT TAG CGG CCG CAT CAG AAG GGA AAA GTT TTT TTC TTA G	PCR
DR4deltaC_s	AGA GGA GGA GGC TGC TGG TTT AAG CAA ATG GTG CTG	Mutagenese-PCR
DR4deltaC_as	CAG CAC CAT TTG CTT AAA CCA GCA GCC TCC TCC TCT	Mutagenese-PCR
DR5deltaC_s	CTC AGA GGA GGA GGC TGT AGG TTC CAG CAA ATG AAG	Mutagenese-PCR
DR5deltaC_as	CTT CAT TTG CTG GAA CCT ACA GCC TCC TCC TCT GAG	Mutagenese-PCR
TRAIL_C230S_s	TAT TGT TGA TGA AAA GTG CTA GAA ATA GTT CTT GGT CTA AAG ATG CA	Mutagenese-PCR
TRAIL_C230S_as	TGC ATC TTT AGA CCA AGA ACT ATT TCT AGC ACT TTT CAT CAA CAA TA	Mutagenese-PCR
Casp8CS_s	CCC AAA GTG TTT TTT ATT CAG GCT TCT CAG GGG GAT AAC TA	Mutagenese-PCR
Casp8CS_as	TAG TTA TCC CCC TGA GAA GCC TGA ATA AAA AAC ACT TTG GG	Mutagenese-PCR
FADD_RHDAAs	GCG GCG CCA CGA CGC GGC GCG GCG CGT CGA C	Mutagenese-PCR
FADD_RHDAAs_as	GTC GAC GCG CCG CGC GCG GTC GTG GCG CCG C	Mutagenese-PCR
FADD_AHALL_s	CCT CCC TGC GGG CCC ACG CCC TGC TGC GGC	Mutagenese-PCR
FADD_AHALL_as	GCC GCA GCA GGG CGT GGG CCC GCA GGG AGG	Mutagenese-PCR
shC8-1_s	GAT CCG CTC TTC CGA ATT AAT AGA CTT CCT GTC AGA TCT ATT AAT TCG GAA GAG CTT TTT G	„Annealing“
shC8-1_as	AAT TCA AAA AGC TCT TCC GAA TTA ATA GAT CTG ACA GGA AGT CTA TTA ATT CGG AAG AGC G	„Annealing“
shC8-2_s	GAT CCG GGT CAT GCT CTA TCA GAT CTT CCT GTC AGA ATC TGA TAG AGC ATG ACC CTT TTT G	„Annealing“
shC8-2_as	AAT TCA AAA AGG GTC ATG CTC TAT CAG ATT CTG ACA GGA AGA TCT GAT AGA GCA TGA CCC G	„Annealing“
pSV-mitte_AK30	TCA TTA TTG CTC TCT ATC TAC AAC	Sequenzierung
Seq_pCDHPuro_Rev	AGT TCT TGC AGC TCG GTG AC	Sequenzierung
pGreenPuro_4404	GTC ATC AAC CCG CTC CAA GGA ATC	Sequenzierung
pCDH-EF1-T2AseqFor	CCA AGC TGT GAC CGG CGC	Sequenzierung
pCDH-EF1-T2AseqRev	CAC AAA TTT TGT AAT CCA GAG GTT G	Sequenzierung
pCDH-EF1-T2AseqT2AFor	ATGCGGTGACGTGGAGGAG	Sequenzierung
pCDH-T2AseqRev	GGAAGGGCCGGGATTCTC	Sequenzierung

4.1.9. Pufferlösungen

Amaza-Puffer V	0,42 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 5,36 mM KCl; 0,41 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 103 mM NaCl; 23,8 mM NaHCO_3 ; 5,64 mM Na_2HPO_4 ; 11,1 mM D-(+)-Glucose; 3,25 mM Glutathion; 20 mM HEPES
10xPBS	1,37 M NaCl; 27 mM KCl, 81 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 18 mM KH_2PO_4 (pH 7,4)
Kernpuffer A	10 mM Hepes; 1 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,5% Triton X-100 (pH 7,0)
50xTAE-Puffer	2 M Tris; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA (pH8,3)
dNTPs	10 μM dATP; 10 μM dTTP; 10 μM dGTP; 10 μM dCTP
Annealing-Puffer	100 mM NaCl; 50 mM Hepes (pH 7,4)

Lösungen für SDS-Gelelektrophorese und Western-Analyse:

10xTBS	1,42 M NaCl; 200 mM Tris (pH 7,6)
TBST	0,1% Tween20 in 1xTBS
5xSDS-Laufpuffer	124 mM Tris; 1,25 M Glycin; 0,5% SDS
Trenngelpuffer	3 M Tris; HCl (pH 8,9)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris; Phosphorsäure (pH 6,7)
2xSDS-Ladepuffer	0,5 ml 1,5 M Tris pH 6,8; 3,2 ml 50% Glycerol; 3,2 ml 10% SDS; 0,8 ml β -Mercaptoethanol; 0,8 ml 1% Bromphenolblau; 0,3 ml ddH ₂ O
4xSDS-Ladepuffer	1 ml 1,5 M Tris pH 6,8; 3,2 ml 100% Glycerol; 2,56 ml 10% SDS; 1,6 ml β -Mercaptoethanol; 0,32 ml 1% Bromphenolblau; 0,12 ml ddH ₂ O

Lösungen für TRAIL-Produktion:

Urea-Puffer	8 M Urea; 100 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM Tris (pH 8,0)
Renaturierungspuffer	100 mM Tris; 700 mM Arginin; 500 mM NaCl; 1 mM DTT (Gasparian et al., 2007)
Aufbewahrungspuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 500 mM Arginin; 100 mM NaCl; 0,02% Tween 20; 1 mM ZnCl_2 (Wissink et al., 2006)

Lösungen für kolloidale Coomassiefärbung:

Fixierlösung	34% Methanol; 2% Phosphorsäure; 17% Ammoniumsulfat
Färbelösung	0,066% Coomassie Brilliant Blue; 2% Phosphorsäure; 34% Methanol; 17% Ammoniumsulfat

ECL-Lösungen:

Lösung A 100 mM Tris (pH 8,5); 2,5 mM Luminol; 0,396 mM Coumarinsäure

Lösung B 100 mM Tris (pH 8,5); 0,0192% H₂O₂

4.1.10. Vektoren

Für die Expression von Proteinen in Bakterien und die dafür notwendigen Klonierungsschritte wurde der Vektor pET17b der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

Zur Klonierung und Mutagenese rekombinanter Proteine in humanen Zelllinien wurden die Vektoren pcDNA6 V5/His, pcDNA3 und pcDNA3.1 von Invitrogen (Karlsruhe), sowie der Vektor pCMV-HA-LMP1-lITEV-CT verwendet, der uns freundlicherweise von Arnd Kieser zur Verfügung gestellt wurde. Darin war bereits die Sequenz des viralen Proteins LMP1 enthalten, welches später für die Herstellung der TRAIL-Rezeptorfusionen verwendet wurde. Die codierende Sequenz der beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 wurde über das RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin) bezogen.

Die Vektoren pET17b TRAIL, pcDNA3 Caspase 8, pcDNA3.1 GFP und pCDH DD-MCS-T2A-GFP waren aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe vorhanden. Die Plasmide pCDH MCS-T2A-Puro-T2A-GFP, pCDH DD-MCS-T2A-Puro-T2A-GFP, pCDH DD-FADD und pCDH DD-Caspase 8 wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Kathleen Gottschalk hergestellt (Gottschalk, 2010).

Des Weiteren wurden für die lentivirale Transduktion humaner Zelllinien die Verpackungsplasmide pRSV-Rev; pMDLg/pRRE sowie pMD2.G der Firma Addgene (Cambridge, USA) eingesetzt. Dieses System wurde zum einen verwendet um Proteine mit Hilfe des Vektors pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP (System Bioscience, Mountain View, USA) zu exprimieren, zum anderen zur Verminderung der Expression bestimmter Zielproteine durch RNA-Interferenz mit Hilfe des Vektors pGreen Puro (System Bioscience, Mountain View, USA).

Plasmide, die von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden, sind in Tabelle 4.5 aufgelistet, alle im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Vektoren sind in Tabelle 4.6 zu finden.

Tabelle 4.5 verwendete Plasmide und ihre Quellen

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
pCMV-HA-LMP1-liTEV-CT	Expression von LMP1, Subklonierung	Shkoda et al., Manuskript in Präparation
3x- κ B-L	Expression der Glühwürmchen Luziferase unter Kontrolle des NF- κ B Promotors	Arenzana- Seisdedos et al., 1993
PGK Renilla	Expression der Renilla Luciferase unter Kontrolle des ubiquitären PGK- Promotors	Shkoda et al., Manuskript in Präparation
pcDNA3.1 Flag-FADD	Expression von FADD, Mutagenese von FADD und Subklonierung	Hsu et al., 1996
LMP1-TNFR1	Expression des TNFR1- Fusionsproteins als Positivkontrolle	Schneider et al., 2008
LMP1-TNFR1 Δ DD	Expression des TNFR1- Fusionsproteins als Negativkontrolle	Schneider et al., 2008

Tabelle 4.6 Hergestellte Vektoren und die darin inserierten Sequenzen

Vektor	inserierte Sequenz	Besonderheit
pCDH	DD-AHALL	Inaktive FADD-Variante
pCDH	DD-RHDAA	Inaktive FADD-Variante
pCDH	DD-Caspase 8 C360S	Katalytisch inaktive DD-Caspase 8
pcDNA6	HA-DR4(468)	
pcDNA6	HA-DR4 Δ C(353)	
pcDNA6	HA-DR5(440)	
pcDNA6	HA-DR5 Δ C(325)	
pcDNA3	Humane Caspase 8 C360S	Katalytisch inaktive Caspase 8
pcDNA3.1	Flag- AHALL	Inaktive FADD-Variante
pcDNA3.1	Flag-RHDAA	Inaktive FADD-Variante
pCMV	empty	
pCMV	LMP1 Δ C(196)	
pCMV	LMP1-li-TEV-DR4(261-468)	
pCMV	LMP1-li-TEV-DR4 Δ C(261-353)	
pCMV	LMP1-li-TEV-DR5(236-440)	
pCMV	LMP1-li-TEV-DR5 Δ C(236-325)	
pET17b	His-HA-TRAIL	TRAIL mit HA- und His-Tag
pET17b	His-HA-TRAIL-C230S	TRAIL mit Mutation des Cysteins, dass die Trimerisierung vermittelt
pET17b	His-HA-ILZ-TRAIL	TRAIL mit zusätzlicher Trimerisierungsdomäne (Isoleucin Zipper, ILZ)
pET17b	His-HA-ILZ-TRAIL-C230S	ILZ-TRAIL mit Mutation des Cysteins, dass die natürliche Trimerisierung vermittelt
pET17b	His-ILZ-TRAIL	
pET17b	His-TRAIL	
pET17b	His-TRAIL C230S	
pET17b	His-Strep-HA-ILZ-TRAIL	
pGreen Puro	shCaspase8-1	
pGreen Puro	shCaspase8-2	

4.1.11. Verbrauchsmaterialien

Dialysebehälter D-Tubes (MWCO 6-8 kDa)	Merck, Darmstadt
Immobilon-P Transfermembran (PVDF)	Millipore, Schwalbach
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen, Hilden
Plastibrand Einmal-Küvetten 1,5 ml	Brand, Wertheim
Röntgenfilme CEA RP NEW	Agfa, Mortsels (B)
Sterilfilter Rotilabo (Filter 0,22 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Sterilfilter Steriflip (Filter 0,45 µm)	Millipore, Schwalbach
Ultrafiltration Amicon Ultra-15	Millipore, Schwalbach
Ultrafiltration U-Tubes (20-10)	Merck, Darmstadt

4.2. Methoden

4.2.1. Molekularbiologie

4.2.1.1. Quantitative Bestimmung von DNA

Die Quantifizierung von DNA erfolgte über spektroskopische Messung am NanoDrop ND-1000 (Peglab). Dabei wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) ermittelt. Zur Qualitätskontrolle wurde außerdem die Referenzwellenlänge 280 nm (OD_{280}) gemessen. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} lässt Rückschlüsse auf eventuelle Kontaminationen durch zum Beispiel Proteine oder Phenol zu. Ein Quotient von etwa 1,8 bedeutete eine relativ saubere DNA-Präparation.

4.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Um DNA ihrer Größe nach aufzutrennen wurden in der Regel 1%ige Agarosegele verwendet. Bei der Auftrennung von sehr kleinen DNA-Fragmenten, wie den Oligonukleotiden für die Herstellung von shRNAs, wurden 3%ige Gele verwendet. Dabei wurde die entsprechende Menge Agarose in 1xTAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen mit 5% Ethidiumbromid-Lösung (1%ig) versetzt und gegossen.

Die Proben wurden nach Zugabe des 6xAuftragspuffer, parallel zu einem Größenstandard, elektrophoretisch bei 50 bis 100 Volt aufgetrennt.

Zur Dokumentation wurde die DNA durch das interkalierte Ethidiumbromid mit Hilfe von UV-Licht bei 254nm sichtbar gemacht.

Zur Reinigung von restriktionsverdauter DNA wurden DNA-Fragmente unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend nach Anweisung des Herstellers mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ isoliert, wobei die Elution mit Wasser durchgeführt wurde.

4.2.1.3. Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die Amplifikation kleinster DNA Mengen, wobei dabei auch Veränderungen, wie das Einfügen einer Restriktionsschnittstelle, an den Enden der Fragmente möglich sind. Die dafür notwendigen „Primer“ sind kurze sequenzspezifische Oligonukleotide, die an die Ausgangs-DNA binden und den Startpunkt für die Polymerase markieren. Diese Oligonukleotide setzen sich in der Regel aus einem kurzen Überhang, abhängig vom jeweiligen Restriktionsenzym, der Restriktionsschnittstelle und einer mit dem Zielgen überlappenden Sequenz zusammen, wobei die Schmelztemperatur des Oligonukleotids die „Annealing“-Temperatur in der PCR-Reaktion beeinflusst.

Für die Amplifikation von DNA, die für einen Restriktionsverdau vorgesehen war, wurde die Platinum Pfx DNA Polymerase verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte nach Anweisungen des Herstellers der Polymerase, wobei die Dauer der Elongation sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz richtete. Die Platinum Pfx DNA Polymerase arbeitete mit einer Syntheserate von 1000 Basen pro Minute.

Auf diese Weise wurden die codierenden Sequenzen der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 für die Klonierung der Fusionsproteine und Wildtyp-Rezeptoren amplifiziert. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Der Erfolg der PCR wurde über Gelelektrophorese überprüft und eine Reinigung der PCR-Produkte von überschüssigen Nukleotiden und Enzymen entweder über ein Agarosegel (siehe Kapitel 4.2.1.2.) oder das „MinElute PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde das PCR-Produkt immer in Wasser eluiert, um den nachfolgenden Restriktionsverdau nicht zu stören.

Für den Nachweis einer erfolgreichen Ligation von amplifizierter DNA oder verschmolzener Oligonukleotide (shRNA) in ein Plasmid wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei konnten viele *E. coli*-Kolonien eines transformierten Ligationsansatzes schnell und ohne vorherige Plasmidpräparation getestet werden.

Dazu wurden Kolonien von der Agar-Platte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in ein PCR-Reaktionsgefäß mit vorbereitetem Reaktionsansatz und dann in vorgelegtes LB-Medium mit Ampicillin getaucht. Die wenigen Bakterien, die sich beim Eintauchen in den PCR-Ansatz gelöst hatten, beinhalteten genügend Plasmid-DNA, um den Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion durchführen zu können. Der Rest der Kolonie, der in LB-Medium resuspendiert wurde, konnte dann über Nacht heranwachsen, so dass eine DNA-Präparation von Klonen, die die richtig inserierte DNA enthielten, am nächsten Tag möglich war.

Als „Primer“ eignen sich hier besonders solche Oligonukleotide, die vektorspezifisch binden, so dass an der Länge des PCR-Produkts direkt zu sehen ist, ob eine Insertion stattgefunden hat.

Für die Amplifikation wurde die GoTaq DNA Polymerase verwendet und der Reaktionsansatz gemäß Herstelleranweisung pipettiert. Die „Annealing“-Temperatur wurde entsprechend der Schmelztemperatur der „Primer“ gewählt. Sie sollte 5°C niedriger sein, als die Schmelztemperatur der „Primer“. Die Dauer der Elongation richtete sich hier ebenfalls nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks bei einer Geschwindigkeit von 1000 Basen pro Minuten. Nach 25 bis 30 Zyklen wurde der PCR-Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt und die positiven Klone identifiziert.

4.2.1.4. Punktmutagenese durch Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip beruht darauf, dass lange Oligonukleotide trotz einzelner Fehlpaarungen, vorzugsweise in der Mitte, an ein Plasmid binden können. Die dafür notwendigen Oligonukleotide werden so entworfen, dass die Base bzw. Basen, die ausgetauscht werden sollen, sich etwa mittig in der Sequenz des Oligonukleotids befinden. Man benötigt zwei solcher Oligonukleotide, die zueinander komplementär sind und als Startpunkt für die Polymerase dienen. Die Polymerase repliziert dann das vollständige Plasmid und bereits nach der zweiten Replikation trägt die Hälfte der Plasmide die gewünschte Mutation. Um am Ende der Polymerase-Kettenreaktion Plasmide zu eliminieren, die parentale DNA ohne Mutationen enthielten, nutzte man die Tatsache aus, dass Plasmide, die in *E. coli* repliziert wurden, Methylierungen tragen, während das bei synthetisch hergestellter DNA nicht der Fall ist. Das methylierungsspezifische Restriktionsenzym DpnI schneidet dabei die parentale DNA und bei der Transformation in *E. coli* entstehen dann nur Klone, die das intakte Plasmid mit der Mutation aufgenommen hatten.

Dazu wurden kommerzielle Reagentsätze der Firma Agilent verwendet, QuikChange II und QuikChange Lightning.

Für den Entwurf der Oligonukleotide wurde das „QuikChange® Primer Design Program“ von Agilent zu Hilfe genommen. Die Polymerase-Kettenreaktion mit anschließendem Verdau der DNA mit DpnI, sowie die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* wurde jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Auf diese Weise wurden die verkürzten TRAIL-Rezeptoren und LMP1 Δ C, sowie die Mutationen der TRAIL-Varianten, Caspase 8 und FADD hergestellt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese wurde die Plasmid-DNA von mindestens einer Kolonie isoliert und sequenziert.

4.2.1.5. shRNA Oligonukleotid Herstellung

Um stabil in Zellen die Expression eines Proteins zu hemmen, wurde die Methode der RNA Interferenz durch sogenannte „small hairpin RNA“ (shRNA) Sequenzen gewählt. Dabei nutzt man einen zelleigenen Abwehrmechanismus aus, der doppelsträngige RNA in der Zelle erkennt und eliminiert. Dabei wird ein Vektor, in diesem Fall als lentiviraler Partikel, stabil in die Zellen eingebracht und trägt dabei die Sequenz einer shRNA, die komplementär zur gewünschten mRNA ist. Das Transkript dieser Sequenz bildet in der Zelle eine Haarnadelstruktur, die dann von der zelleigenen RNAi-Maschinerie erkannt und geschnitten wird. Das Protein Dicer erkennt dabei die doppelsträngige RNA und zerschneidet sie zu einer funktionellen siRNA und lädt diese auf den RISC Komplex. Der wiederum dann in der

Lage ist, die endogene Ziel-mRNA zu degradieren. Dadurch wird die Translation des Zielproteins gehemmt und die Menge dieses Proteins in der Zelle nimmt ab.

Für die Herstellung der Lentiviren benötigte man einen Transfervektor, der die gewünschte shRNA trägt. Dazu wurde zunächst eine geeignete zur Ziel-mRNA komplementäre Sequenz gewählt, in der Regel eine als siRNA getestete 19 bzw. 25 Basenpaare lange Sequenz. Die Basenabfolge des Oligonukleotids für die Ligation in den Vektor wurde nach Angaben des Herstellers entworfen (vgl. „pGreenPuro™ shRNA Cloning and Expression Lentivector User Manual“).

Zunächst wurde die gewünschte siRNA-Sequenz („Sense“) mit ihrem Komplement („Antisense“) über eine 12 Basen lange Schleife mit der Sequenz CTT CCT GTC AGA verbunden. Die komplementäre Antisense-Sequenz wurde gefolgt von einem Terminator mit der Sequenz TTTTT, der in der Zelle einen Abbruch der Transkription bewirken soll. Den Gegenstrang bildete die dazu komplementäre Sequenz. An den Enden der beiden Stränge wurden nun entsprechende Basen angefügt, so dass beim Zusammenfügen der beiden Oligonukleotide Überhänge entstehen, die kompatibel zum verdauten Vektor waren.

Hier am Beispiel von shCaspase 8-1 gezeigt:

```

„Sense“      5'  GATCCGCTCTTCCGAATTAATAGACTTCCTGTCAGATCTATTAATTCGGAAGAGCTTTTTG
                |||
„Antisense“  3'  GCGAGAAGGCTTAATTATCTGAAGGACAGTCTAGATAATTAAGCCTTCTCGAAAACTTAA

```

Die unterstrichenen Bereiche markieren die siRNA-Sequenz gegen Caspase 8 und ihre komplementäre Sequenz.

Auf diese Weise wurden zwei lentivirale Plasmide mit verschiedenen shRNA-Sequenzen gegen Caspase 8 hergestellt. Diese Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG synthetisiert und sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Für die Verschmelzung wurden je 1 µl der Oligonukleotide (100 pmol/µl) mit 48 µl „Annealing“ Puffer gemischt und in der PCR-Maschine zunächst für 5 Minuten auf 90°C erhitzt. Nach weiteren 10 Minuten bei 70°C wurde der Ansatz schrittweise mit 0,5°C pro 20 Sekunden auf 37°C abgekühlt. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz auf 20°C abgekühlt und gegebenenfalls bei -20°C gelagert oder direkt verwendet.

Beim schrittweisen Abkühlen lagerten sich die Oligonukleotide komplementär aneinander, was anschließend in einem 3%igen Agarosegel überprüft wurde.

Erfolgreich verschmolzene Oligonukleotide konnten anschließend direkt für die Ligation in pGreenPuro verwendet werden.

4.2.1.6. Restriktionsverdau

Das Schneiden von Vektoren oder PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe der jeweils passenden Restriktionsenzyme. Der dabei verwendete Puffer richtete sich nach Empfehlungen des jeweiligen Herstellers. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen, wurde der Puffer gewählt, der insgesamt die besten Konditionen für beide Enzyme bot.

Grundsätzlich wurde versucht einen zweifachen Überverdau durchzuführen. Die dafür nötige Enzym-Menge bei einem einstündigen Verdau berechnete sich nach folgender Formel:

$$x = \left(\frac{\text{Schnittstellen in DNA}}{\text{Schnittstellen in Lambda}} \right) * \left(\frac{\text{Basenpaare von Lambda}}{\text{Basenpaare der DNA}} \right) * \mu\text{g DNA} * \frac{2}{\text{Units}/\mu\text{l Enzym}}$$

Bei der erstmaligen Verwendung eines Restriktionsenzym wurde getestet, ob ein längerer Verdau notwendig sein würde. Dazu wurde bei einem Doppelverdau zusätzlich jeweils ein Reaktionsansatz mit nur einem Enzym vorbereitet und in einem Agarosegel der Erfolg des Verdaus überprüft.

Die Menge der einzelnen Enzyme und die Inkubationszeit wurden so angepasst, dass jeweils ein zweifacher oder gegebenenfalls niedrigerer bzw. höherer Überverdau zustande kam. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und wurde, falls möglich, anschließend bei 65°C oder 80°C für 20 Minuten entsprechend der verwendeten Enzyme inaktiviert und über ein Agarosegel aufgereinigt.

Mit Hilfe des Restriktionsverdaus wurden die einzelnen Klonierungsschritte der TRAIL-Varianten durchgeführt, sowie der Verdau der verschiedenen Vektoren für die Insertion von DNA-Sequenzen. Die PCR-Produkte der TRAIL-Rezeptor-Sequenzen für die Fusions- und Wildtyp-Rezeptoren wurden ebenfalls durch Restriktionsverdau für die Ligation in die Vektoren pcDNA6 und pCMV vorbereitet.

4.2.1.7. Dephosphorylierung und Ligation

Um eine Ligation eines verdauten Vektors ohne Einbau des gewünschten DNA-Fragments zu verhindern, wurden die Vektoren dephosphoryliert. Dabei wurde durch alkalische Phosphatase („Shrimp Alkaline Phosphatase“) der Phosphatrest am freien 5'-Ende der DNA entfernt und eine Rezirkularisierung damit verhindert. Bei einer gewünschten Rezirkularisierung des Vektors wurde auf diesen Schritt verzichtet.

Für die Dephosphorylierung wurde 1 µg der gereinigten Vektor-DNA mit 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase, 2 µl 10xReaktionspuffer und der entsprechenden Menge Wasser gemischt, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl erreicht wurde. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei 65°C für 15 Minuten inaktiviert.

Für die Ligation linearer DNA-Fragmente wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Der gereinigte Vektor wurde mit dem einzufügenden verdauten PCR-Produkt oder dem doppelstängigen shRNA Oligonukleotid im Stoffmengenverhältnis 1 zu 10 gemischt, um optimale Ligationsergebnisse zu erzielen. Für den Fall einer Rezirkularisierung, bei der der Vektor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wurde und wieder geschlossen werden sollte, inkubierte man lediglich den Vektor mit dem Ligationsansatz.

Etwa 100 ng des vorbereiteten Vektors und, gegebenenfalls die entsprechende Menge an zu inserierender DNA, wurden mit 2 µl 10xLigase-Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase und der entsprechenden Menge Wasser für ein Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und für eine Stunde bei 22°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert.

5 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation in *E. coli* eingesetzt, der Rest bei -20°C gelagert.

4.2.1.8. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Vorkultur wurde aus der bei -80°C lagernden Glycerolkultur des gewünschten Stammes angeimpft und über Nacht in LB-Medium ohne Selektionsdruck bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde am Folgetag in frischem LB-Medium im Verhältnis 1 zu 100 verdünnt und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte (600nm) von 0,2 bis maximal 0,5 wachsen gelassen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C.

Die Kultur wurde zunächst für zehn Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für zehn Minuten bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann restlos entfernt und verworfen, das Bakteriensediment in eisgekühltem TSS resuspendiert. Das benötigte Volumen TSS entsprach dabei 10% des Kulturvolumens. Zuletzt wurden je 100 µl Bakteriensuspension in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und zügig mit Hilfe von flüssigem Stickstoff oder Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C, wobei mit Dauer der Lagerung die Kompetenz der Bakterien abnahm.

4.2.1.9. Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* der Stämme *XL1-Blue* und *XL10-Gold* erfolgte nach Angaben des Herstellers, lediglich NZY⁺-Medium wurde durch SOC-Medium ersetzt.

Für die Transformation selbst hergestellter chemisch kompetenter *E. coli* wurden die Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit 10-50 ng der gewünschten DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 90 Sekunden. Anschließend wurden die Bakterien für weitere 90 Sekunden auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 400 µl vorgewärmtem SOC-Medium ohne Antibiotikum wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl der Suspension, bzw.

500 µl bei einem ligierten Plasmid, auf Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.1.10. Plasmid-Isolation aus *E. coli*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach Anweisung der Hersteller der jeweiligen Reagentiensätze durchgeführt. Bei der Arbeit mit Plasmiden, basierend auf dem Vektor pET17b, wurde nach „Low Copy“-Protokollen verfahren, um eine größere DNA-Ausbeute zu erreichen, da dieser Vektor nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorkommt.

4.2.1.11. Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der Didesoxymethode nach Sanger bei den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms Clone Manager und der Internetseite „Multalin Interface Page“ (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)

4.2.2. Proteinbiochemie

4.2.2.1. Expression von rekombinantem humanem TRAIL in *E. coli*

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurde der Stamm *BL21(DE3)* verwendet. Chemisch kompetente *BL21(DE3)* wurden mit entsprechender DNA durch Hitzeschock transformiert, auf Selektionsagar mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für die Induktion wird die Vorkultur im Verhältnis 1 zu 50 in lactosehaltigem Autoinduktionsmedium verdünnt und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Verwendung dieses speziellen Mediums ersetzte die Induktion durch IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid). Bei Induktion mit IPTG wurde die Kultur in LB-Medium mit Ampicillin verdünnt und bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,2 – 0,6 mit in der Regel 1 mM IPTG induziert und, wie zuvor beschrieben, inkubiert.

Zur Ernte wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4500 rpm und 4°C für 20 Minuten sedimentiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment bei -20°C gelagert oder direkt aufgearbeitet.

4.2.2.2. Denaturierende Aufreinigung von rekombinantem humanem TRAIL

Die verwendeten TRAIL-Varianten werden in *E. coli* effizient produziert, dabei allerdings in Einschlusskörperchen transportiert, so dass eine Gewinnung aus dem Zytoplasma der Bakterien nicht möglich war. Um die Proteine aber aus den Einschlusskörperchen befreien zu können, war die Verwendung eines denaturierenden Lysepuffers notwendig.

Ein entscheidender Vorteil dabei war es, dass die Einschlusskörperchen vor dem Freisetzen des gewünschten Proteins von praktisch allen zellulären *E. coli* Proteinen befreit werden konnten, was einen hohen Reinheitsgrad der Präparation zur Folge hatte.

Zur Lyse der bakteriellen Zellwand wurde „BugBuster Master Mix“ nach Vorgaben des Herstellers verwendet, ebenso wie für die Reinigung der Einschlusskörperchen.

Das nun sehr reine Sediment aus Einschlusskörperchen wurde in 8 M Urea-Puffer resuspendiert und für eine Stunde rollend bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 20 Minuten bei 10000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun das denaturierte Protein und wurde in ein frisches Gefäß überführt.

Eine eventuelle Aufreinigung mit Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Renaturierung des TRAIL Proteins wurde die Proteinlösung zunächst auf Eis gekühlt und tröpfchenweise unter leichtem Schwenken mit kaltem Renaturierungspuffer verdünnt, bis das Achtfache des ursprünglichen Volumens erreicht wurde.

Um das Protein anschließend wieder aufzukonzentrieren, wurde das Volumen der Lösung mittels Ultrafiltration in „U-Tubes“ nach Angaben des Herstellers bei 4°C reduziert.

Für den Pufferaustausch wurden „D-Tubes“ mit Wasser aktiviert und mit der Proteinlösung gefüllt. Die Dialyse erfolgte bei 4°C über Nacht in Aufbewahrungspuffer, wobei dessen Volumen etwa das 500 bis 1000-fache der zu dialysierenden Lösung war.

Am Folgetag wurde die Proteinlösung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Mengenbestimmung erfolgte über SDS-Gelelektrophorese und colloidale Coomassie-Färbung im Vergleich zu einem BSA-Standard.

Für die exemplarische Bestimmung des Gehalts an Lipopolysacchariden (LPS) der Präparation wurde eine Probe HA-TRAIL von der Firma Profos AG (Regensburg) analysiert. Es wurde ein Gehalt von ca. 788 EU/mg Protein ermittelt.

4.2.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Quantifizierung von Proteinen in Lösungen wurde das „Bio-Rad Protein Assay“ verwendet. Es basiert auf der Methode nach Bradford, die darauf beruht, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 bei Proteinbindung von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

Die Proteinlösungen wurden stets im Vergleich zu einer BSA-Standardkurve gemessen. Dafür wurde zunächst eine Eichkurve mit 0 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg und 25 µg BSA in einem Gesamtvolumen von 800 µl pipettiert. Um auszuschließen, dass der Probenpuffer die Messung beeinflussen könnte, wurde die Eichkurve zusätzlich auch in Anwesenheit des Puffers im Standard gemessen. Die zu bestimmende Probe wurde

ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 800 µl pipettiert und anschließend alle Proben mit 200 µl der Färbelösung versetzt, zügig gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zunächst die Standardproben für die Eichkurve und dann die eigentlichen Proben bei 595 nm im Photometer gemessen. Das BioPhotometer berechnete dann aus der Absorption mit Hilfe der Eichkurve den Proteingehalt der jeweiligen Proben.

4.2.2.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese können Proteine entsprechend ihrer Größe im Vergleich zu einem Größenstandard aufgetrennt werden.

Dafür wurden 12%ige Polyacrylamidgele mit 5%igem Sammelgel gegossen. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 4.7 aufgeführt. Dabei wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm mit 10 oder 15 Taschen eingesetzt. Nach dem vollständigen Aushärten konnten die Gele direkt verwendet oder in SDS-Laufpuffer wenige Tage bei 4°C gelagert werden.

Tabelle 4.7 Lösungen für ein SDS-Polyacrylamidgel

	12%iges Trenngel (5 ml)	5%iges Sammelgel (2 ml)
30% Acrylamid Mix	2 ml	0,33 ml
ddH ₂ O	1,6 ml	1,4 ml
Trenngelpuffer	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,25 ml
20% SDS	50 µl	20 µl
10% APS	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Für den Gellauf wurden die Proben mit 2x oder 4xSDS-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard aufgetragen. Der Gellauf wurde zunächst bei konstanten 80 Volt gestartet. Nach Einlaufen der Proben ins Trenngel wurde die Spannung auf maximal 180 Volt erhöht. Der Gellauf wurde in der Regel gestoppt, wenn die blaue Laufront das Gel durchlaufen hatte, das entsprach in etwa der 10 kDa Bande des Größenstandards. Bei der Betrachtung sehr kleiner oder sehr großer Proteine wurde der Gellauf entsprechend früher oder später beendet.

Das Gel konnte nun mit Coomassie-Lösung gefärbt oder für den Proteintransfer eingesetzt werden.

4.2.2.5. Colloidale Coomassie-Färbung

Proteine, die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, können mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 sichtbar gemacht werden. Er lagert sich

unspezifisch an basische Seitenketten der Proteine an, wobei die Färbung mit colloidalem Coomassie die höchste Sensitivität bietet. Selbst Banden im einstelligen Nanogramm Bereich können sichtbar gemacht werden. Das wurde unter anderem für die Quantifizierung gereinigter Proteine ausgenutzt.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde dafür zunächst für eine Stunde in Fixierlösung und dann für ein bis fünf Tage, je nach gewünschter Sensitivität, in der Färbelösung bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit destilliertem Wasser entfärbt, so dass die Banden optimal sichtbar wurden.

4.2.2.6. Western-Analyse

Der „Western Blot“ ermöglicht den Transfer von Proteinen auf eine Membran, nachdem sie zuvor in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Dabei werden die Proteine auf der PVDF-Membran immobilisiert und können anschließend mit Hilfe von Antikörpern spezifisch detektiert werden.

Der Transfer erfolgte im „wet blot“-Verfahren mit Hilfe des Mini-Protean III Systems der Firma Bio-Rad. Zunächst wurde die zugeschnittene PVDF-Membran kurz mit Methanol aktiviert, für zwei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in Gel-Transfer-Puffer äquilibriert. Das Gel wurde ebenfalls für zehn Minuten in Gel-Transfer-Puffer eingelegt. Für den Transfer wurde dann auf die weiße Seite der Halterung ein in Gel-Transfer-Puffer getränktes Schwämmchen gelegt, darauf zwei zugeschnittene, getränkte Whatman Filterpapiere und die aktivierte PVDF-Membran. Auf die Membran wurde dann das Gel luftblasenfrei aufgelegt und mit zwei getränkten Whatman Filterpapieren und einem weiteren getränkten Schwämmchen bedeckt. Die Halterung wurde dann geschlossen und so in die Kammer eingebracht, dass jeweils die schwarze Seite der Halterung zur schwarzen Seite der Kammer zeigte. Die Kammer wurde mit Gel-Transfer-Puffer aufgefüllt und der Deckel geschlossen. Der Transfer erfolgte bei konstanten 200 mA für zwei Stunden oder 40 mA über Nacht.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit 5% Milchpulver in TBST für eine Stunde blockiert, so dass unspezifische Bindungen abgesättigt wurden. Anschließend wurde die Membran zunächst mit dem gewünschten Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert und dann dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur, gefolgt von dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 10 Minuten.

Die Detektion des Signals erfolgte dann mit Hilfe der Chemolumineszenz. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase setzte das ECL-Substrat um und erzeugte dabei Licht, das mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wurde.

Dafür wurde die Membran mit frisch gemischtem ECL-Reagenz benetzt und in einer Folie in eine lichtdichte Expositionskassette gelegt. Unter Rotlicht wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und nach unterschiedlichen Belichtungszeiten entwickelt.

4.2.2.7. Nachweis der Phosphorylierung von I κ B α

Um die Aktivierung von NF- κ B durch TRAIL in verschiedenen Zelllinien nachzuweisen, wurde die Phosphorylierung des Inhibitors I κ B α mit Hilfe spezifischer Antikörper untersucht.

Für die Stimulation wurden die Zellen zunächst gezählt und je eine bzw. zwei Millionen Zellen in einem Milliliter FCS-freiem Medium in neun 1,5 ml Reaktionsgefäße ausgesät. Eine Probe blieb dabei unstimuliert, drei erhielten 300 ng TNF α für entweder 3, 5 oder 15 Minuten und weitere fünf Proben wurden mit 1 μ g ILZ-TRAIL für 5, 15, 30, 60 oder 90 Minuten stimuliert. Am Ende der Stimulationsdauer wurden die Zellen sofort auf Eis abgekühlt, dann bei 4°C und 900 g für fünf Minuten sedimentiert und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das trockene Zellsediment bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden zytoplasmatische Extrakte der stimulierten Zellen hergestellt. Dazu wurde zunächst Kernpuffer A frisch mit Protease Inhibitor-Cocktail Set I (Merck) und Natriumorthovanadat versetzt und das Zellsediment in 100 μ l resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann für fünf Minuten bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Überstände wurden mit 4xSDS-Laufpuffer versetzt und parallel in zwei SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Der Nachweis der Phosphorylierung von I κ B α erfolgte mit Hilfe der Western-Analyse (siehe Kapitel 4.2.2.6.) und den Primärantikörpern gegen p-I κ B α und I κ B α . Als Ladungskontrolle wurde auf den Membranen anschließend GAPDH nachgewiesen.

4.2.2.8. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde auch an Hand der Aktivierung von p65 in einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest untersucht.

Dabei befinden sich in den Vertiefungen einer 96-Lochplatte kovalent gekoppelte Oligonukleotide mit der Konsensus-Sequenz für NF- κ B. Aktiviertes p65 im Zellextrakt bindet an die DNA, der Extrakt wird durch Waschen entfernt und gebundenes p65 kann dann mit einem spezifischen Antikörper gegen p65 und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Farbreaktion nachgewiesen werden.

Um die Aktivierung von p65 durch TRAIL und TNF α nachzuweisen, wurden fünf Ansätze mit je 2 Millionen Zellen der zu untersuchenden Zelllinien in FCS-freiem RPMI stimuliert. Für TNF α erfolgte die Stimulation mit 300 ng/ml für eine Stunde. TRAIL wurde mit einer

Konzentration von 1 µg/ml für eine, zwei oder drei Stunden inkubiert. Die Kontrolle wurde nicht stimuliert.

Nach dieser Zeit wurden die Ansätze zunächst auf Eis gekühlt und für 5 Minuten bei 4°C und 900 g sedimentiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellsedimente bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Herstellung der Gesamtzelllysate erfolgte direkt vor der Verwendung für den Immunadsorptionstest. Dafür wurden die Zellsedimente in 80 µl des im TransAM NF-κB p65 Reagentiensatz enthaltenen Lysepuffers AM2 nach Zugabe von Proteaseinhibitor und DTT resuspendiert und für 10 Sekunden mit höchster Intensität gemischt. Dann 10 Minuten bei 150 rpm auf Eis inkubiert und anschließend erneut für 30 Sekunden gemischt. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 14000 g und 4°C wurde der Überstand in ein frisches vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt des Extraktes wurde nach der Bradford-Methode (siehe Kapitel 4.2.2.3) bestimmt und anschließend die einzusetzende Menge an Extrakt berechnet.

Die Durchführung des ELISAs erfolgte mit Gesamtzellextrakt nach Angaben des Herstellers. Die einzusetzende Proteinmenge wurde an die vorhandenen Konzentrationen der Extrakte angepasst, so dass von einer Zelllinie immer die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde. Maximal wurden 20 µl Extrakt bzw. 40 µg Protein eingesetzt. Alle Verdünnungen der Extrakte erfolgten in AM2 mit Zusätzen. Für die Entwicklung der Enzymreaktion wurde die Platte für 10 Minuten inkubiert, gestoppt und im „Sunrise Microplate Reader“ gemessen.

4.2.2.9. Bestimmung der Luziferase-Reportergen-Aktivierung

Um unter anderem den Einfluss von Überexpression bestimmter rekombinanter Proteine auf den NF-κB-Signalweg messen zu können, wurde die Expression eines Reportergens untersucht, welches unter Kontrolle eines NF-κB abhängigen Promotors stand.

Man verwendet dazu das Plasmid 3x-κB-L, welches das Gen der Glühwürmchen-Luziferase unter Kontrolle des NF-κB Promotors exprimiert und das Plasmid PGK-Renilla, mit dem Gen der Renilla-Luziferase unter Kontrolle des Promotors der ubiquitär vorkommenden Phosphoglycerat-Kinase (Arenzana-Seisdedos et al., 1993; Shkoda et al., Manuskript in Präparation). Letzteres dient als interne Kontrolle, die die Effizienz der Transfektion anzeigt. Die relative Menge der beiden Reporterproteine kann durch Lichtemission nach Substratzugabe ermittelt werden, wobei beide Luziferasen unterschiedliche Substrate umsetzten. Für die Lyse der Zellen und Messung der Luziferaseaktivität im Luminometer wurde der Reagentiensatz „Dual Luciferase Assay“ der Firma Promega verwendet, der die Messung der beiden Luziferasen in einem Ansatz ermöglicht und alle dafür benötigten Lösungen bereitstellt.

Für Überexpressionsstudien wurden diese beiden Plasmide zusammen mit dem zu untersuchenden Plasmid in HEK 293T Zellen mittels Lipofektion (vgl. Kap. 4.2.3.3.) transfiziert. Die DNA wurde dabei in folgendem Verhältnis eingesetzt: 500 ng des zu untersuchenden Plasmids, 5 ng 3x-κB-L, 25 ng PGK-Renilla und 470 ng inerte DNA (Salmon Sperm DNA).

Die Lyse der Zellen erfolgte nach 24 Stunden mit „Passive Lysis Buffer“ nach Angaben des Herstellers. Die Luziferaseaktivität in den Lysaten wurde im Luminometer Orion II nach Angaben des Herstellers gemessen.

Für die Messung der Luziferaseaktivität nach Stimulation mit TRAIL wurden HEK 293T Zellen wie zuvor beschrieben transfiziert, wobei die DNA-Menge des zu untersuchenden Plasmids durch inerte DNA ersetzt wurde. Am Folgetag wurden die Zellen für die Dauer von sechs Stunden mit den entsprechenden Dosen TRAIL, bzw. TNFα inkubiert und anschließend wie zuvor beschrieben lysiert und gemessen.

Für Reexpressionsversuche mit FADD in Suspensionszelllinien wurden die Reporter-Plasmide und das Expressionsplasmid für FADD durch Nukleofektion (vgl. Kap. 4.2.3.4.) in die Zellen gebracht. Dabei wurde eine maximale DNA-Menge von insgesamt 5 µg eingesetzt, wovon 2,66 µg auf pcDNA3.1 FADD; 1,67 µg auf 3x-κB-L und 0,67 µg auf das Plasmid PGK-Renilla entfielen. Laut Hersteller ist für die Nukleofektion auch ein Maximalvolumen von 5 µl vorgesehen, so dass gegebenenfalls die DNA-Menge reduziert wurde. Die Verhältnisse blieben dabei aber bestehen. Nach der Nukleofektion wurden die Zellen in Anwesenheit von 5 µM Caspaseinhibitor qVD-OPh (Merck) über Nacht kultiviert und anschließend für 6 Stunden mit 1 µg/ml ILZ-TRAIL, 1 µg/ml TRAIL C230S oder 300 ng/ml TNFα stimuliert. Lyse der Zellen und Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte wie oben beschrieben.

Die Auswertung der Messwerte („relative light units“, RLU) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{relative Luciferaseaktivität} = \frac{(\text{RLU Glühwürmchen Luziferase} - \text{Leermessung})}{(\text{RLU Renilla Luziferase} - \text{Leermessung})}$$

4.2.3. Zellbiologie

4.2.3.1. Kultivierung humaner Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten ausschließlich humanen Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. HEK 293T wurden dabei in DMEM mit 10% FCS und 1%

Glutamin, alle anderen Zelllinien in RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Glutamin gehalten. Abgesehen von HEK 293T und SHEP, handelt es sich ausschließlich um Suspensionszellen. Je nach Teilungsrate der jeweiligen Zelllinien wurden die Kulturen etwa jeden dritten Tag im Verhältnis 1:3 bis 1:10 geteilt und mit frischem Kulturmedium mit Zusätzen aufgefüllt. Adhärenz wachsende Zellen wurden dafür zunächst mit PBS gewaschen, durch Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst und nach Zugabe von FCS-haltigem Medium ebenfalls im Verhältnis 1:10 geteilt und mit frischem Medium aufgefüllt.

Die Zelllinien stammten entweder von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig), der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville) oder der in Tabelle 4.8 angegebenen Quelle.

Tabelle 4.8 Auflistung aller verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Humaner Zelltyp	Quelle
A3	T-Zellleukämie (ALL)	Juo et al., 1998
A3 Caspase 8 def. (I9.2)	T-Zellleukämie (ALL)	Juo et al., 1998
A3 FADD def. (I2.1)	T-Zellleukämie (ALL)	Juo et al., 1999
HEK 293T	Embryonale Nierenfibroblasten, exprimieren das „SV40 large T-Antigen“	
JURKAT	T-Zellleukämie (ALL)	Ehrhardt et al., 2003
J-TR	T-Zellleukämie (ALL)	
NALM-6	Prä-B-Zellleukämie	
SHEP	Neuroblastom	

4.2.3.2. Auftauen und Einfrieren humaner Zelllinien

Zelllinien wurden bei -80°C bzw. längerfristig in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Dazu wurden Zellen sedimentiert, das Kulturmedium verworfen und das Zellsediment in Einfriermedium bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO resuspendiert. Das Abkühlen auf -80°C erfolgte in speziellen Kryoröhrchen mit Gewinde in Behältern mit 4°C kaltem Isopropanol um ein schrittweises Abkühlen der Zellen ermöglichen. Nach etwa 24 Stunden wurden die Röhrchen mit den Zellen in Boxen für die Lagerung bei -80°C, bzw. -196°C überführt.

Beim Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus -80°C, bzw. -196°C, in ein 37°C warmes Wasserbad gebracht und zügig in vorgewärmtes Medium mit 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Antibiotikum durch Waschen entfernt.

4.2.3.3. Stimulation von Zelllinien

Um die Induktion von Apoptose durch TRAIL in Suspensionszelllinien zu ermitteln, wurden diese mit einer Dichte von 800.000 Zellen/ml in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen in einem Volumen von 100 µl ausgesät. Die Verdünnungsreihen für die TRAIL-Endkonzentrationen 1, 3, 10, 30, 100, 300 und 1000 ng/ml wurden in PBS pipettiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen bzw. Zellen, die mit einer Verdünnungsreihe des Aufbewahrungspuffers stimuliert wurden.

Für die spezifische Inhibition von TRAIL mit TRAIL-R1:Fc wurden 5 µg TRAIL für eine Stunde bei 4°C mit einem Überschuss von 50 µg TRAIL-R1:Fc inkubiert und anschließend für die Herstellung einer Verdünnungsreihe eingesetzt. Dabei wurde die Verdünnung durch Zugabe des Rezeptors berücksichtigt, so dass die TRAIL-Konzentration unverändert blieb. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen bzw. Zellen, die mit einer Verdünnungsreihe mit TRAIL-R1:Fc stimuliert wurden.

Die Dauer der Stimulation betrug in der Regel 48 Stunden, gefolgt von der Messung der Apoptoserate im Durchflusszytometer (siehe Kap. 4.2.3.9.).

4.2.3.4. Transfektion adhärenter Zelllinien mittels Lipofektion

Für die Transfektion von HEK 293T und SHEP mit Plasmid-DNA wurde das „TurboFect in vitro Transfection Reagent“ der Firma Fermentas verwendet. Dabei handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches DNA komplexieren und in Zellen einschleusen kann.

Die Durchführung der Transfektion richtete sich nach Angaben des Herstellers und ist hier am Beispiel einer Transfektion von HEK 293T in einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte beschrieben.

Je 100 000 Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer 24-Loch-Platte in 1 ml DMEM mit 10% FCS und 1% Glutamin ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion.

Dazu wurde zunächst der Transfektionsansatz vorbereitet, wobei für eine Vertiefung je 100 µl DMEM ohne FCS mit 1 µg DNA und 1 µl Turbofect gemischt wurden. Nach 15 bis 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde anschließend leicht geschwenkt, um die Komplexe gleichmäßig zu verteilen und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Um transient in HEK 293T die Expression bestimmter Proteine zu hemmen, wurden Zellen mit Hilfe des „TurboFect in vitro Transfection Reagent“ mit siRNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie für Plasmid-DNA bereits beschrieben, wobei für die Größenordnung einer 12-Loch-Platte je 150 pmol siRNA und 1 µl Turbofect in 200 µl DMEM eingesetzt wurden und die Zellen in 2 ml Medium mit Zusätzen ausgesät wurden. Um die Effizienz der

Inhibition zu erhöhen, wurde die Transfektion mit siRNA in der Regel repetitiv durchgeführt. Die zweite Transfektion folgte dabei der ersten im Abstand von etwa 24 Stunden.

4.2.3.5. Transfektion von Suspensionszelllinien mittels Nukleofektion

Die Nukleofektion, eine Form der Elektroporation, ist eine effiziente Methode Suspensionszelllinien zu transfizieren. Dabei handelt es sich um ein optimiertes Verfahren der Elektroporation, bei der die DNA direkt bis in den Zellkern vordringen kann und damit eine höhere Transfektionseffizienz erreicht werden kann.

Für einen Transfektionsansatz wurden eine bis maximal vier Millionen Zellen eingesetzt, sowie maximal 5 µg, bzw. 5 µl DNA.

Die Zellen wurden dafür zunächst bei 1500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und das Kulturmedium verworfen. Das Zellsediment wurde dann in 100 µl „Amaya-Puffer V“ oder „Human T Cell Nucleofector Solution“ resuspendiert. Die DNA wurde zugegeben und der komplette Ansatz in eine Küvette überführt. Die Küvette wurde in den Nucleofector I gestellt und mit dem Programm C16 elektroporiert. Dann wurden die Zellen sofort aus der Küvette in vorgewärmtes Medium überführt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

4.2.3.6. Herstellung lentiviraler Partikel

Eine schnelle und für längere Zeit stabile Integration von Transgenen in das Genom einer Zelle wurde durch den Einsatz eines lentiviralen Transduktionssystems ermöglicht.

Es basiert darauf, dass einzelsträngige RNA-Viren, in diesem Fall das Lentivirus HIV1, nach Infektion einer Zelle zunächst ihre RNA durch reverse Transkription in DNA umschreiben, dann die Kernmembran überwinden und ihre DNA in das Genom des Wirts integrieren.

Das hier verwendete System gehört zur sogenannten dritten Generation lentiviraler Transduktionssysteme. Dabei befinden sich die Informationen für die Bildung der Viruspartikel auf den drei verschiedenen Verpackungsplasmiden pRSV-Rev, pMDLg/pRRE und pMD2.G, die aber wiederum kein Signal zum Verpacken ihrer RNA in die Viruspartikel enthalten. Somit werden in der Produzentenzelllinie alle Proteine, die für die Viruspartikel nötig sind, produziert; die RNA, die für die Weitergabe dieser Information durch das Virus nötig wäre, fehlt aber im fertigen Viruspartikel. Lediglich die RNA, die von den Transfervektoren pCDH oder pGreenPuro abgelesen wird, enthält die notwendigen Verpackungssignale und wird folglich in die Viruspartikel verpackt.

Alle Arbeiten mit lentiviralen Partikeln erfolgten unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 2.

Für die Herstellung der Partikel wurde die Zelllinie HEK 293T verwendet. Sie trug das große SV40 T-Antigen und eignete sich damit besonders für die Produktion lentiviraler Partikel mit hohem Titer.

Die drei Verpackungsplasmide und der Transfervektor wurden durch Lipofektion mit Turbofect in HEK 293T Zellen transfiziert. Dabei wurden auf eine Vertiefung einer Platte mit 6 Vertiefungen folgende DNA-Mengen eingesetzt:

1 µg	pRSV-Rev
2 µg	pMDLg/pRRE
0,5 µg	pMD2.G
1 µg	Transfervektor

Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel 4.2.3.3. beschrieben.

Nach 72 Stunden wurden die Überstände der transfizierten HEK 293T Zellen gesammelt, welche nun die Viruspartikel enthielten. Mit 10 minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm wurden zunächst ganze Zellen und Zellbruchstücke entfernt und der Überstand über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Um die Partikel anzureichern wurde das Volumen des Überstands anschließend über Ultrafiltration mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa auf circa 200 µl reduziert.

Die lentiviralen Partikel wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert bzw. direkt für die Infektion eingesetzt.

4.2.3.7. Lentivirale Transduktion

Um die in lentivirale Partikel verpackte DNA in adhärente Zellen einzubringen, wurden diese zunächst am Vortag in eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät, so dass die Zellen bei Infektion etwa 50% konfluent waren. Die Viruspartikel wurden direkt vor der Infektion mit 1 ml Medium vermischt, welches 8 µg/ml Polybren enthielt. Das Kulturmedium wurde dann von den Zellen entfernt und durch das virushaltige Medium ersetzt.

Nach 24 Stunden im Inkubator wurde das virushaltige Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium überschichtet. Die Transgenexpression, etwa GFP, konnte nach 48 Stunden nach Infektion gemessen werden.

Bei Suspensionszellen wurden eine Million Zellen pro Infektion verwendet. Die Zellen wurden sedimentiert und direkt in Medium mit Virus und 8 µg/ml Polybren resuspendiert. Nach 24 Stunden im Inkubator wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frisches Medium gegeben. Die Transgenexpression war ebenfalls nach etwa 48 Stunden zu beobachten.

Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgte mit Puromycin für 24 Stunden. Die eingesetzte Menge variierte dabei zwischen den verschiedenen Zelllinien und wurde im Vorfeld jeweils empirisch ermittelt.

4.2.3.8. „Proteo Tuning“ System

Die Expression proapoptotischer Proteine in Zelllinien ist meist nur unzufrieden stellend möglich, daher wurde auf die Verwendung eines induzierbaren Systems zurückgegriffen.

Eine dafür relativ neue Methode stellt das „Proteo tuning“ System dar. Es reguliert nicht wie meist üblich auf Ebene der Transkription oder Translation, sondern über die Stabilität des fertigen Proteins. Eine mit dem Zielprotein fusionierte Destabilisierungsdomäne (DD) führt zu einem raschen proteosomalen Abbau und kann über Zugabe eines membrangängigen Liganden stabilisiert werden (Chu et al., 2008).

In diesem Fall wurde eine Destabilisierungsdomäne verwendet, die von dem humanen Protein FKBP12 abgeleitet ist. Dabei wurden durch Mutationen in FKBP12 Varianten erzeugt, die in der Zelle instabil sind, wenn kein Ligand gebunden ist. Sie wurde N-terminal an FADD, dessen beiden funktionslosen Varianten AHALL und RHDAA, Caspase 8 und die katalytisch inaktive Caspase 8 C360S fusioniert. Die Stabilisierung erfolgte durch Zugabe der Substanz Shield-1. Sie bindet an die DD und verhindert damit die Degradation.

Im Vorfeld wurde von Sibylle Gündisch die kodierende Sequenz der Destabilisierungsdomäne in den lentiviralen Expressionsvektor pCDH kloniert. Um später eine Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine Resistenzkassette gegen Puromycin eingefügt. Die Besonderheit dabei war, dass in diesem Vektor alle Proteine von nur einer mRNA translatiert wurden. Das virale Peptid T2A verband die offenen Leserahmen der einzelnen Gene zu einer einzigen kodierenden Sequenz. Durch einen ribosomalen Unterbrechungsmechanismus wurde an einer definierten Stelle innerhalb des Peptids keine Peptidbindung gebildet, wodurch die Proteine einzeln das Ribosom verlassen konnten. Dafür war es notwendig, bei der Klonierung darauf zu achten, dass alle Proteine, außer das letzte der Reihe, kein Stopp-Codon enthalten und alle Gene in einem Leserahmen liegen, so dass keine Verschiebungen entstanden.

Nach erfolgreicher Klonierung und Verifizierung der Plasmide wurden die lentiviralen Partikel hergestellt und die entsprechenden Zelllinien transduziert und durch die Gabe von Puromycin selektioniert.

Die Funktionalität der Destabilisierungsdomäne wurde über die Expression der Proteine in der Western-Analyse untersucht, wobei die Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration von Shield-1 getestet wurden. Dafür wurde je eine Million Zellen entweder mit 1 μ M Shield-1 für Zeitpunkte von 0 bis 72 Stunden oder mit verschiedenen Konzentrationen bis maximal 1 μ M Shield-1 für 48 Stunden inkubiert und die Lysate der Zellen in der Western-Analyse untersucht.

Für weitere Untersuchungen wurde jeweils die als optimal ermittelte Konzentration Shield-1 eingesetzt, in der Regel waren das 0,5 μ M Shield-1. Die Zugabe von Shield-1 erfolgte 24 Stunden vor dem eigentlichen Versuch.

4.2.3.9. Apoptosemessung

Für Suspensionszellen wurde die Vitalität anhand ihrer Granularität und Größe bestimmt. Dabei wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen und die Zellemissionswerte des Vorwärtsstreulichts (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) gegeneinander aufgetragen. In dieser Darstellung ergeben sich deutlich getrennte Populationen für vitale Zellen und kleinere apoptotische Zellen mit hoher Granularität. Mit Hilfe der Software CellQuestPro können die Populationen ausgewählt und deren Anteil an den gemessenen Zellen ermittelt werden. Die Apoptoserate konnte dann als absoluter Wert oder als spezifische Apoptose bezogen auf die Kontrolle angegeben werden. Die spezifische Apoptose berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{spezifische Apoptoserate} = \frac{(\text{absolute A. (Probe)} - \text{absolute A. (Kontrolle)}) * 100\%}{1 - \text{absolute Apoptoserate (Kontrolle)}}$$

Die Apoptoserate von adhärenenten Zellen wurde mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung bestimmt. Dabei wurden die Zellen von der Zellkulturplatte abgelöst und zusammen mit dem Zellkulturüberstand in ein Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert und das Zellsediment auf Eis mit PBS mit 0,1% Propidiumiodid resuspendiert. Das Propidiumiodid (PI) ist in der Lage in apoptotische, nicht aber in lebende Zellen, einzudringen und in deren DNA zu interkalieren. Durch seine Fluoreszenz ist es in den Zellen im Durchflusszytometer (FL-3-H, Rotkanal) nachweisbar. Der Anteil an Zellen mit positiver Färbung für Propidiumiodid entsprach dem Anteil apoptotischer Zellen.

Im Fall der Analyse apoptotischer Effekte durch Expression proapoptotischer Gene wurden Zellen zunächst mit den entsprechenden Plasmiden und GFP transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, mit Propidiumiodid gefärbt. Im Durchflusszytometer wurde dann die Fluoreszenz von GFP (FL-1-H) und PI (FL-3-H) gemessen. Bei der Analyse der Daten wurde dann zunächst der Anteil lebender GFP-exprimierender Zellen ermittelt (GFP+/PI-) und dann der Bereich dieser Zellen ausgewählt, der der stärksten GFP-Expression entsprach und in dem zwischen Kontrollproteinen und proapoptotischen Proteinen eine unterschiedliche Verteilung sichtbar wurde. Der Anteil der GFP positiven lebenden Zellen in diesem Bereich wurde dann für alle transfizierten Proben ermittelt und ihr Anteil an der Gesamtpopulation GFP positiver lebender Zellen berechnet. Für die graphische Darstellung wurden die Werte des Leervektors pCMV oder pcDNA6 gleich 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

5. Ergebnisse

Seit 1997 ist bekannt, dass TRAIL bzw. die TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4 den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren und dieser wiederum viele Zielgene reguliert, die mit Überleben bzw. Proliferation in Verbindung gebracht werden. Vorarbeiten der Gruppe konnten 1998 schließlich zum ersten Mal zeigen, dass die Inhibition von NF- κ B zu einer verminderten Apoptoseresistenz gegenüber TRAIL in lymphoiden Zellen führt (Jeremias et al., 1998). 2003 wurde zudem gezeigt, dass neben Resistenz auch Proliferation in Tumorzellen durch TRAIL verursacht werden kann (Ehrhardt et al., 2003). Bisher ist aber der TRAIL-induzierte NF- κ B-Signalweg relativ wenig untersucht, da der Focus der Forschung primär auf die Apoptose-Induktion durch TRAIL gerichtet war. Daher war es Ziel dieser Arbeit, den rezeptornahen Signalweg der TRAIL-induzierten NF- κ B-Aktivierung zu untersuchen und daran beteiligte Adaptorproteine zu identifizieren und ihre Rolle im Signalweg zu beleuchten.

5.1. Herstellung von rekombinantem humanem TRAIL

Um ein möglichst aktives und vielseitig einsetzbares TRAIL verwenden zu können, wurde es selbst hergestellt. Kommerzielles TRAIL war im Prinzip nur in Form des einfachen „löslichen TRAILS“ (Aminosäuren 114-281) verfügbar, weshalb die eigene Produktion eine größere Vielfalt an TRAIL-Varianten erlauben sollte. Um auch für weitere Projekte TRAIL kostengünstig und in ausreichender Menge selbst herstellen zu können, wurde ein bakterielles Expressionssystem gewählt.

5.1.1. Klonierung der TRAIL-Varianten

Für die Herstellung dieses vielseitig einsetzbaren rekombinanten humanen TRAILS wurde es mit Epitopen für die Detektion und Reinigung als auch einem zusätzlichen Trimerisierungsmotiv, dem Isoleucin Zipper, versehen (Harbury et al., 1994; Walczak et al., 1997). Der Isoleucin Zipper ist eine abgewandelte Form des Leucin Zippers, der durch Mutationen so verändert wurde, dass er nun Trimere anstatt Dimere ausbilden kann (Fanslow et al., 1994). Dafür wurde zunächst die codierende Sequenz des Isoleucin Zipper-Motivs und verschiedener Epitope durch Gensynthese hergestellt. Die einzelnen Abschnitte wurden dabei jeweils mit paarigen Schnittstellen flankiert, so dass die Möglichkeit bestand, einzelne Abschnitte wieder zu entfernen. Das ermöglichte die unkomplizierte Herstellung der verschiedenen Varianten des rekombinanten humanen TRAILS, die in Abb. 6 zusammen mit dem Wildtyp-Protein dargestellt sind. Die so entstandene Sequenz wurde anschließend mittels Restriktionsverdau vor die codierende Sequenz von löslichem TRAIL (Aminosäuren 114-281) eingefügt, die sich in dem bakteriellen Expressionsvektor pET17b befand. In pET Vektoren steht die Expression des Proteins unter Kontrolle des T7 Promotors und wird in Kombination mit einem *E. coli* Stamm verwendet, der eine chromosomale Kopie der T7-

Polymerase unter Kontrolle des Promotors lacUV5 besitzt. Dadurch kann ihre Expression durch IPTG bzw. Laktose induziert werden, um dann gezielt das rekombinante Protein in großen Mengen herzustellen. Zu den TRAIL-Varianten, die im Laufe dieser Arbeit entstanden sind, gehören auch inaktive Proteine, deren Cystein an der Position 230 durch ein Serin ersetzt wurde (vgl. Abb. 6). Diese Aminosäure ist durch ihren Schwefelrest essentiell für die Trimerbildung und damit auch für die Aktivität von TRAIL, da nur trimerisiertes TRAIL die Induktion von Apoptose vermittelt (Bodmer et al., 2000). Dazu wurde das für Cystein kodierende Basentriplett mit Hilfe einer gerichteten Punktmutagenese so verändert, dass es anschließend für Serin kodierte (vgl. Kap. 4.2.1.4). Diese inaktiven

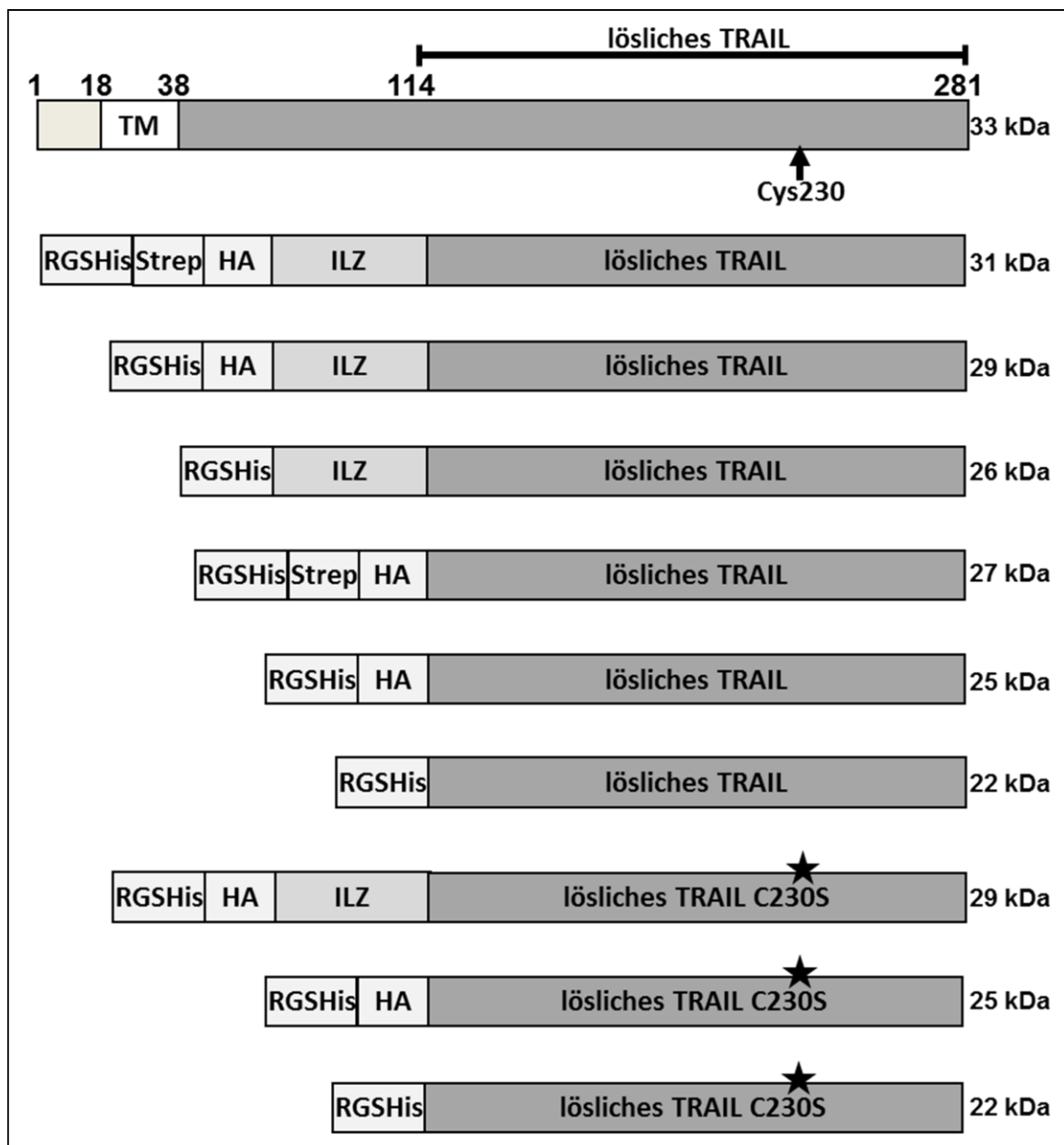


Abbildung 6: Schematische Darstellung der klonierten TRAIL-Varianten. HA= Hemagglutinin-Epitop zur Detektion und Immunpräzipitation, ILZ= Isoleucin Zipper, RGSHis= Epitop zur Detektion und Reinigung, Strep= Streptavidin-Bindedomäne, TM= Transmembrandomäne.

Proteine dienten als Kontrolle für mögliche Kontaminationen, bedingt durch die Produktion in Bakterien, da vor allem Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien in der Lage sind über Toll-like Rezeptoren NF- κ B zu aktivieren (Kirschning et al., 1998).

Somit konnten zusammenfassend die neun Plasmide für die Expression der in dieser Arbeit verwendeten TRAIL-Varianten hergestellt werden. Sie unterscheiden sich in der Verwendung verschiedener Epitope, der Isoleucin Zipper-Sequenz und den Mutationen des Cystein 230. Die Richtigkeit der Sequenzen, sowie der Erfolg der Mutagenese, wurde für jedes Plasmid durch Sequenzierung bestätigt.

5.1.2. Expression in *E. coli* und Aufreinigung

Für die Expression der TRAIL Proteine in pET17b wurde der dafür optimierte Stamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Er trägt die chromosomale Kopie der T7-Polymerase unter Kontrolle des Promotors lacUV5 und ermöglicht so eine induzierbare Expression der Zielproteine. Zunächst wurden für die Expression verschiedene Konditionen getestet. Die Induktion in Abb. 7 A erfolgte mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), worauf große Mengen TRAIL produziert wurden. Die Verwendung des Autoinduktionsmediums konnte diese Proteinmenge weiter steigern. Dabei wurde durch die Zusammensetzung aus definierten Mengen Glucose und Laktose, bei optimaler Dichte, die Kultur automatisch durch

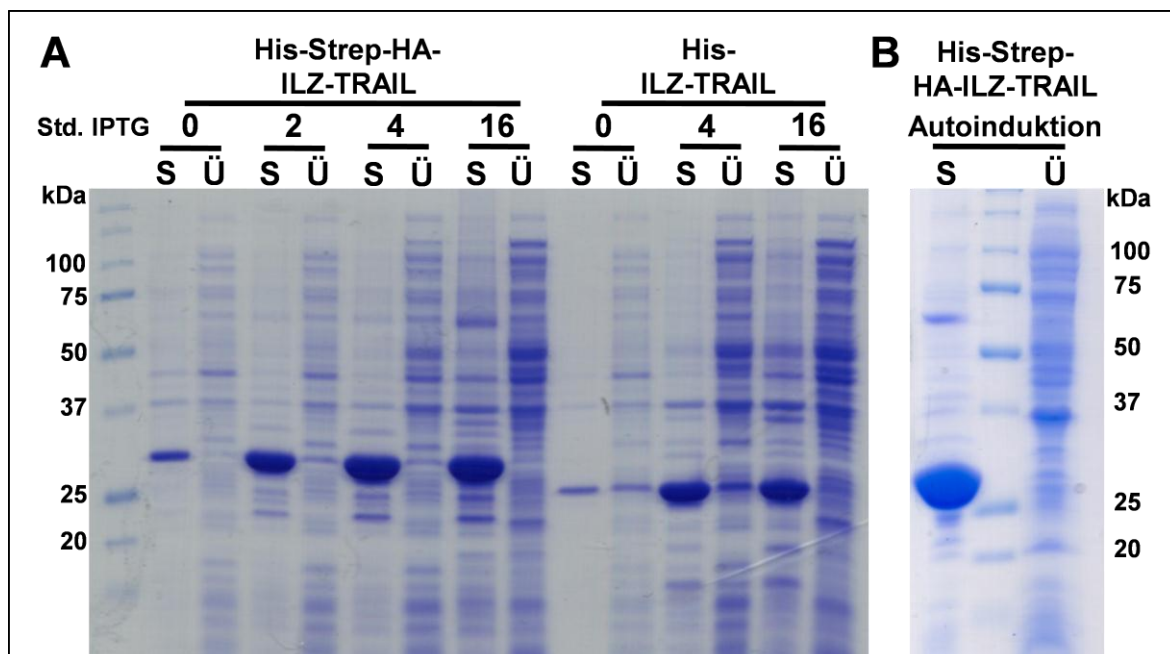


Abbildung 7: Expression der TRAIL-Varianten His-Strep-HA-ILZ-TRAIL (ca. 31 kDa) und His-ILZ-TRAIL (ca. 26 kDa) in *E. coli* BL21(DE3). *E. coli* BL21(DE3) wurden mit den für die genannten Proteine kodierenden Vektoren transformiert und mit 1 mM IPTG für die genannten Zeitpunkte (A) oder durch Autoinduktion für 16 Std. (B) bei je 37°C induziert. Es wurden je 2 ml der Kultur zu den genannten Zeitpunkten geerntet und das Bakteriensediment in 100 μ l BugBuster Master Mix (BBMM) für 20 Min. aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4xSDS-Ladepuffer versetzt und das unlösliche Sediment in 100 μ l Wasser resuspendiert und ebenfalls mit 4xSDS-Ladepuffer versetzt. Je 2 μ l des Sediments (S) und 10 μ l des Überstandes (Ü) wurden auf einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Das Sediment beinhaltet das in Einschlusskörperchen verpackte Protein.

die enthaltene Laktose induziert (Abb. 7 B). Wie man nach dem Aufschluss der Zellen feststellen konnte, war bei beiden Methoden der Großteil des Proteins in unlöslicher Form verpackt in Einschlusskörperchen vorhanden. Das erschwerte wiederum eine Gewinnung von nativem Protein aus dem Zytoplasma.

Um die Löslichkeit der Proteine zu verbessern, wurden unterschiedliche IPTG-Konzentrationen, Inkubationstemperaturen, unterschiedliche Bakterienstämme und auch verschiedene TRAIL-Varianten getestet. Auch eine periplasmatische Expression von TRAIL wurde versucht, führte aber ebenso zu unlöslichem Protein (Daten nicht gezeigt). Die Art und Stärke der Induktion, wie auch die Veränderung der Temperatur brachten keine Verbesserung (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der drei Stämme *BL21(DE3)*, *BL21(DE3)pLysS* und *Rosetta(DE3)* ergab, dass nur der Stamm *BL21(DE3)pLysS* bei der TRAIL-Variante His-Strep-HA-ILZ-TRAIL überhaupt geringe Mengen Protein im Zytoplasma aufwies (vgl. Abb. 8). Dieser Stamm ist optimiert für die Expression potentiell toxischer Proteine und besitzt zu diesem Zweck einen Repressor der T7 Polymerase. Damit wird die Expression des Zielproteins sehr stringent reguliert. Der große Nachteil dieses Stammes war allerdings die im Vergleich zu *BL21(DE3)* wesentlich geringere produzierte Gesamtproteinmenge. Zudem war, wie man in Abb. 8 deutlich erkennen kann, die lösliche Menge an Protein auch in diesem Fall im Vergleich zum unlöslichen minimal, was eine Reinigung größerer Mengen des Proteins aus dem Zytoplasma der Bakterien praktisch unmöglich machte. Die Verwendung kleinerer TRAIL Proteine ohne Isoleucin Zipper, in Abb. 8 rechts dargestellt, erhöhte die Ausbeute von löslichem Protein deutlich, aber auch diese Proteinmenge war weiterhin so gering, dass eine native Reinigung von His-HA-TRAIL mit Ni-NTA-Säulen nicht erfolgreich war (Daten nicht gezeigt).

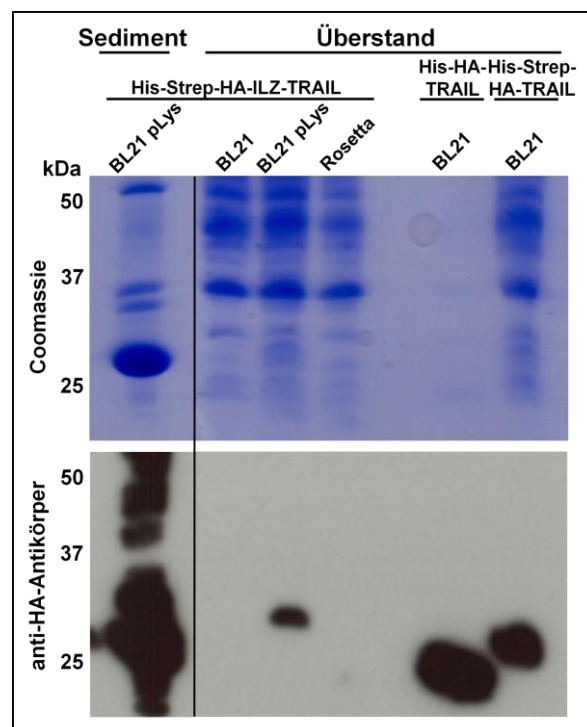


Abbildung 8: Western-Analyse von TRAIL-Varianten im Zytoplasma verschiedener *E. coli* Stämme. Die drei *E. coli*-Stämme *BL21(DE3)*, *BL21(DE3)pLysS* und *Rosetta(DE3)* wurden mit den für die genannten Proteine kodierenden Vektoren transformiert und durch Autoinduktion für 16 Std. bei je 37°C induziert. Je 2 ml der Kultur wurden geerntet und das Bakteriensediment in 100 µl BBMM aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4xSDS-Ladepuffer versetzt und das unlösliche Sediment in 100 µl Wasser resuspendiert und ebenfalls mit 4xSDS-Ladepuffer versetzt. 2 µl des Sediments von *BL21 pLysS* und 10 µl der Überstände der verschiedenen Stämme wurden auf einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt bzw. nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit anti-HA-Antikörper und einem HRP-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper durch Chemolumineszenz detektiert.

Nachdem die native Reinigung vor allem der ILZ-TRAIL-Varianten nicht möglich war, wurde auf eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen zurückgegriffen. Dabei wurden durch Verwendung von Urea-Puffer mit 8 mol/l Harnstoff die Einschlusskörperchen zerstört und das Protein freigesetzt. Somit konnten die Expressionsbedingungen mit maximaler Proteinproduktion verwendet werden. Abb. 9 A zeigt die Reinigung mit Ni-NTA-Säulen von His-HA-TRAIL unter denaturierenden Bedingungen aus Gesamtzelllysat. Es gelang dabei bereits gereinigtes Protein zu gewinnen. Bei der Optimierung konnte die Reinheit der Präparation durch eine Reinigung der Einschlusskörperchen noch weiter verbessert werden. Dazu wurden zunächst die *E. coli* Zellen in BBMM aufgeschlossen und das dabei entstandene Sediment aus Einschlusskörperchen durch mehrmaliges Waschen von zellulären Proteinen befreit (vgl. Kap. 4.2.2.2.). Erst die gereinigten Einschlusskörperchen wurden dann mit 8 M Urea-Puffer aufgeschlossen. Abb. 9 B zeigt eine Reinigung der gewaschenen Einschlusskörperchen über die Ni-NTA-Säule. Die Reinigung der Einschlusskörperchen erreichte dabei einen Reinheitsgrad, vergleichbar mit der Reinigung durch die Ni-NTA-Säule. Im Weiteren wurde daher direkt das Protein aus aufgeschlossenen gereinigten Einschlusskörperchen für die Renaturierung verwendet und auf eine weitere affinitätschromatographische Reinigung verzichtet. So konnten auch hier Proteinverluste vermieden werden.

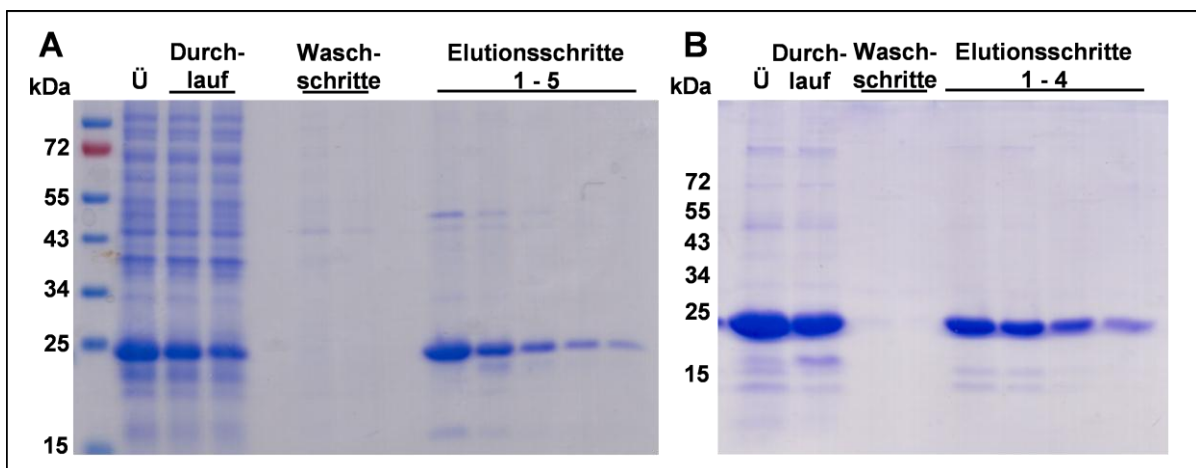


Abbildung 9: Denaturierender Aufschluss und Reinigung über Ni-NTA-Säulen von His-HA-TRAIL produziert in BL21(DE3). (A) Direkter Aufschluss des *E. coli* Sediments von 50 ml induzierter BL21(DE3)-Kultur in 5 ml 8 M Urea-Puffer. Nach Zentrifugation wurde der Überstand für die Reinigung über eine Ni-NTA-Säule eingesetzt. Je 10 µl des Überstandes (Ü) und der einzelnen Schritte der Reinigung wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen, parallel zu einem Größenstandard elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. (B) Der Aufschluss des *E. coli* Sediments von 50 ml induzierter BL21(DE3)-Kultur erfolgte in 2,5 ml BBMM. Die Einschlusskörperchen blieben dabei als unlösliches Sediments zurück, wurden mehrmals gewaschen und für den Aufschluss in 5 ml 8 M Urea-Puffer verwendet. Der Überstand nach Zentrifugation des Urea-Puffers wurde für die Reinigung über die Ni-NTA-Säule eingesetzt. Je 10 µl des Überstandes (Ü) und der einzelnen Schritte der Reinigung wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen, parallel zu einem Größenstandard elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Durch den Zusatz von Harnstoff lag das Protein in denaturierter und damit inaktiver Form vor. Um die Aktivität wieder herzustellen, wurde eine Rückfaltung durch schrittweise Verdünnung in Renaturierungspuffer durchgeführt (Gasparian et al., 2007). Dabei wurde

langsam die Harnstoffkonzentration gesenkt, so dass sich das Protein wieder in seine native Konformation zurückfalten konnte. Für die Lagerung und spätere Verwendung wurde der Renaturierungspuffer mittels Dialyse durch einen für TRAIL optimierten Aufbewahrungspuffer ersetzt (Wissink et al., 2006).

Um die Belastung der Präparation mit Lipopolysacchariden (LPS) von *E. coli* zu ermitteln, wurde eine Probe zur Quantifizierung des LPS-Gehalts von der Firma Profos untersucht. Die Probe enthielt etwa 788 „endotoxin units“ (EU) pro Milligramm Protein, was einer Menge von weniger als 1 ng LPS pro Milligramm TRAIL entsprach. Der Vergleich zeigte, dass die Endotoxinbelastung von Peprtech TRAIL mit weniger als 1000 EU pro Milligramm Protein angegeben wurde, so dass beide Präparationen für LPS von vergleichbarer Reinheit waren. Es wurden somit die optimalen Bedingungen für die TRAIL Produktion ermittelt. Die Expression in *E. coli* BL21(DE3) mit Autoinduktion bei 37°C für 16 bis 24 Stunden lieferte die maximale Proteinmenge, die dann aus den Einschlusskörperchen mit Hilfe von Harnstoff gewonnen werden konnte. Die Aktivität der Proteine wurde durch Rückfaltung und Dialyse in den Aufbewahrungspuffer gewährleistet.

5.1.3. Funktionalität von renaturiertem TRAIL

Da nach der Denaturierung die Möglichkeit bestand, dass das Protein sich bei der Renaturierung nicht in die ursprüngliche dreidimensionale Konformation zurückfalten würde, musste das zunächst über die Testung der Funktionalität der TRAIL-Varianten überprüft werden.

Da alle Funktionstests und weiteren dargestellten Versuche mit den Proteinen His-HA-TRAIL (HA-TRAIL), His-HA-ILZ-TRAIL (ILZ-TRAIL) und His-HA-TRAIL C230S (TRAIL C230S) durchgeführt wurden, werden deshalb zur Vereinfachung im Weiteren die in Klammern stehenden Abkürzungen verwendet.

In Abb. 10 sind die gereinigten Proteine HA-TRAIL und TRAIL C230S nach Coomassie-Färbung gezeigt. Dabei bildete renaturiertes HA-TRAIL zum Teil eine Bande, entsprechend der Größe des Trimers, während TRAIL C230S nur als Monomer und minimal auch als Dimer vorlag. Trabzuni et al. konnten durch chromatographische Untersuchungen zeigen, dass tatsächlich die Mutation des Cystein 230 zu einer Dimerbildung führen kann, wobei auch diese Form, wie das Monomer, nicht in der Lage war, Apoptose zu induzieren (Trabzuni et al., 2000).

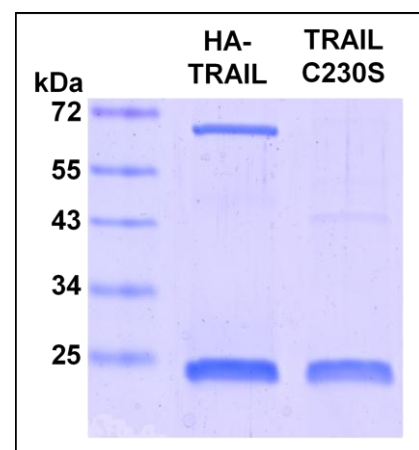


Abbildung 10: Vergleich von His-HA-TRAIL und His-HA-TRAIL C230S. Coomassie-Färbung nach Auftrennung von je 500 ng der gereinigten Proteine HA-TRAIL und TRAIL C230S in einem 12%-igen SDS-Gel in SDS-Ladepuffer ohne Zusatz von β -ME.

Um nun den Erfolg der Renaturierung zu überprüfen, wurde HA-TRAIL im Vergleich zu kommerziellem TRAIL der Firma Peprotech auf Apoptose-sensitiven NALM-6 Zellen getestet. Die Messung der Apoptoserate erfolgte für Suspensionszellen, wie NALM-6 oder JURKAT, immer mit Hilfe des Durchflusszytometers, wie in Kapitel 4.2.3.9. im Detail beschrieben. Im Prinzip wurde dabei die Veränderung von Granularität und Größe der apoptotischen Zellen im Vergleich zu lebenden Zellen als Bildung einer gut abgrenzbaren zweiten Population sichtbar, wie in Abb. 11 exemplarisch dargestellt ist.

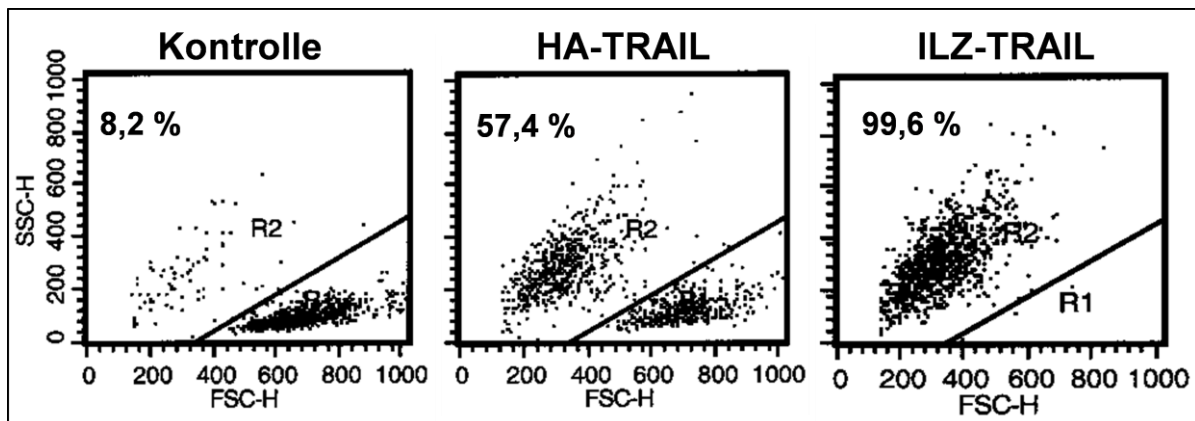


Abbildung 11: Analyse von JURKAT-Zellen im Durchflusszytometer. Je 10^5 Zellen wurden für 48 Std. mit 300 ng/ml HA- oder ILZ-TRAIL stimuliert und im Durchflusszytometer im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gemessen. Dabei wurden die Zellemissionswerte des Vorwärtsstreulichts (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) gegeneinander aufgetragen (FSC/SSC-Analyse). Die Population rechts unten (R1) stellte lebende Zellen dar, mit steigender Apoptoserate wanderten die Zellen in die zweite Population links oben (R2), die die apoptotischen Zellen umfasst. Der Wert der absoluten Apoptoserate ist jeweils im Bild angegeben.

Abb. 12 A zeigt, dass HA-TRAIL und das kommerzielle TRAIL nach 48 Stunden ähnlich stark Apoptose induzierten. Damit war die Aktivität der beiden Proteine vergleichbar.

Um einen unspezifischen Effekt durch Kontaminationen der TRAIL-Präparation mit bakteriellen Proteinen auszuschließen, wurde die Spezifität der Apoptoseinduktion untersucht. Dazu wurde HA-TRAIL wie in Kapitel 4.2.3.3. beschrieben, für eine Stunde mit einem Überschuss an rekombinantem TRAIL-Rezeptor 1-Fc Fusionsprotein (TRAIL-R1:Fc) inkubiert und anschließend auf JURKAT-Zellen im Vergleich zu unbehandeltem HA-TRAIL getestet. Der Überschuss TRAIL-R1:Fc bindet dabei spezifisch TRAIL und hemmt damit kompetitiv die Bindung an die zellulären TRAIL-Rezeptoren. Die Apoptoseinduktion durch HA-TRAIL wurde effizient durch die Inkubation mit dem rekombinanten Rezeptor inhibiert, so dass gezeigt werden konnte, dass eine spezifisch durch TRAIL-induzierte Apoptose stattfand (vgl. Abb. 12 B). Durch die Verwendung des optimierten Aufbewahrungspuffers und die Lagerung bei -80°C blieb die Aktivität von HA-TRAIL über mehrere Monate stabil (vgl. Abb. 12 C). Abb. 12 D zeigt die unterschiedlichen Aktivitäten der drei TRAIL-Varianten auf partiell resistenten JURKAT-Zellen. Während ILZ-TRAIL in der Lage war, alle Zellen zu töten, erreichte HA-TRAIL in dieser Zelllinie nur eine Apoptoserate von etwa 50%. TRAIL C230S

war dagegen nicht in der Lage, überhaupt Apoptose zu induzieren. Die Mutation des Cysteins hatte damit zum Funktionsverlust des Proteins geführt.

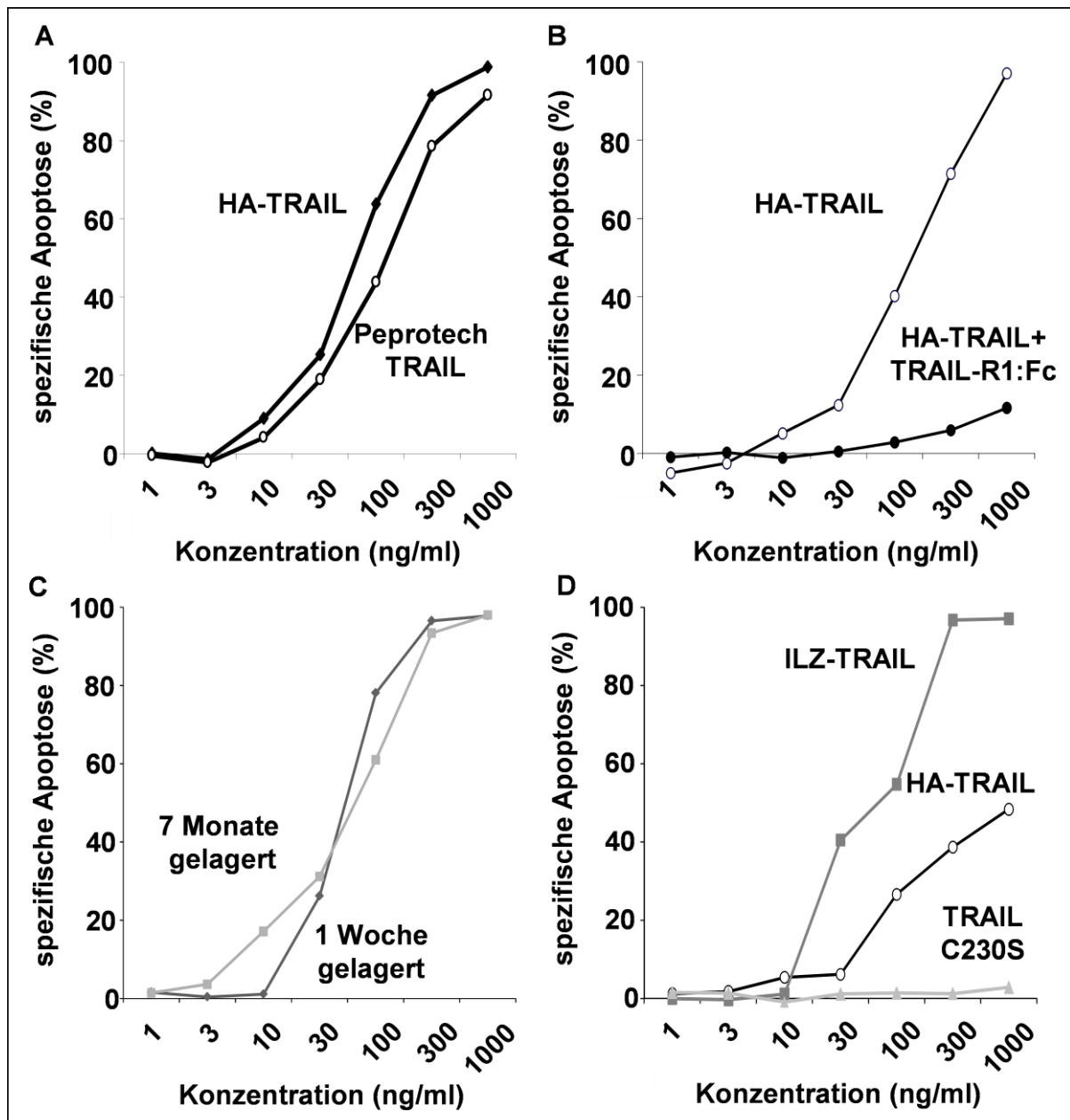


Abbildung 12: Apoptoseinduktion durch renaturiertes TRAIL in NALM-6 (A) und JURKAT Zellen (B-D), gemessen durch FCS/SSC Analyse. (A) Je 10^5 NALM-6 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen HA-TRAIL und kommerziellem TRAIL der Firma Peprotech für 48 Std. stimuliert. (B) $5 \mu\text{g}$ HA-TRAIL wurden mit $50 \mu\text{g}$ TRAIL-R1:Fc bei 4°C für 1 Std. vorinkubiert. Anschließend wurden je 10^5 JURKAT-Zellen mit den genannten Konzentrationen HA-TRAIL oder inhibiertem HA-TRAIL für 48 Std. inkubiert. (C) Je 10^5 JURKAT-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen HA-TRAIL, das für 1 Woche oder 7 Monate bei -80°C gelagert war, für 48 Std. stimuliert. (D) Je 10^5 partiell resistente JURKAT-Zellen wurden mit den genannten Konzentrationen von ILZ-TRAIL, HA-TRAIL und TRAIL C230S für 48 Std. stimuliert. (A-D) Die Apoptosemessung erfolgte durch FCS/SSC-Analyse jeweils in Doppelwerten im Durchflusszytometer und wurde als spezifische Apoptose berechnet und angegeben.

Da die Proteine primär für die Untersuchung der NF- κB Aktivierung durch TRAIL genutzt werden sollten, wurde dies mit Hilfe eines Reporter-gen-Versuchs getestet. Dafür wurden HEK 293T Zellen mit zwei Reporter-Plasmiden transfiziert. Das erste besaß das Gen der

Glühwürmchen Luziferase unter Kontrolle eines NF- κ B abhängigen Promotors (3x- κ B-L), das zweite das Gen der Renilla Luziferase unter Kontrolle des Promotors des Haushaltsgens Phosphoglycerat-Kinase (PGK-Renilla). Die Stimulation erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion für sechs Stunden. Nach Messung der Luziferase-Aktivität in den Zelllysaten, wurde zunächst die Aktivität der Glühwürmchen Luziferase auf die Aktivität der Renilla Luziferase normalisiert. Sie entsprach der Transfektionseffizienz der jeweiligen Probe.

Anschließend errechnete sich die Aktivierung aus dem Anstieg der normalisierten Luziferase-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (vgl. Kap. 4.2.2.9.). Abb. 13 zeigt, dass HA-TRAIL und ILZ-TRAIL beide konzentrationsabhängig NF- κ B aktivierten, während TRAIL C230S keine Aktivierung bewirken konnte. Somit wurde auch die Induktion von NF- κ B spezifisch von aktivem TRAIL verursacht und nicht durch bakterielle Kontaminationen. Da in HEK 293T NF- κ B nicht durch LPS aktiviert werden kann, wurden die TRAIL-Varianten ILZ-TRAIL und TRAIL C230S auch auf JURKAT-Zellen getestet. Die Stimulation und Messung der Aktivierung von NF- κ B durch Reportergenexpression zeigte dabei, dass keine LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B stattfand (Daten nicht gezeigt). Die Messung

ergab auch, dass ILZ-TRAIL, wie auch bei der Apoptoseinduktion, deutlich aktiver war als HA-TRAIL. Der Isoleucin Zipper war zu einem gewissen Grad sogar in der Lage, den Funktionsverlust durch die Punktmutation C230S zu überwinden und sowohl Apoptose als auch NF- κ B zu aktivieren, daher eignete sich das Protein His-HA-ILZ-TRAIL C230S nicht als Kontrolle für bakterielle Kontaminationen (Daten nicht gezeigt).

Es gelang somit zu zeigen, dass die Proteine HA-TRAIL und ILZ-TRAIL in der Lage waren, sowohl Apoptose als auch NF- κ B zu aktivieren, während TRAIL C230S seine Funktion für beide Signalwege vollständig verloren hatte.

Da ILZ-TRAIL in allen Versuchen die stärkste Aktivierung von NF- κ B sowie die höchsten Apoptoseraten induzieren konnte, wurde es für die weiteren Versuche verwendet, gegebenenfalls in Kombination mit TRAIL C230S als Kontrolle.

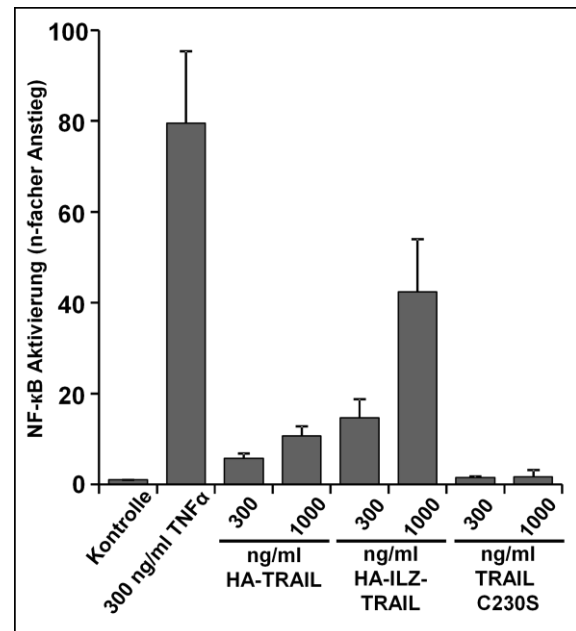


Abbildung 13: NF- κ B Aktivierung durch TRAIL-Varianten im Vergleich zu TNF α in HEK 293T. Je 10^5 HEK 293T Zellen wurden mit den Reporter-Plasmiden 3x- κ B-L und PGK Renilla transfiziert und nach 24 Std. für 6 Std. mit den angegebenen Substanzen stimuliert, die Kontrolle blieb unbehandelt. Die Lyse und Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Die Messwerte wurden auf die unstimulierte Kontrolle (1,0) normalisiert und stellen den Mittelwert und Standardfehler der Doppelmessungen von zwei unabhängigen Experimenten dar.

5.2. Untersuchung der TRAIL-Rezeptoren und ihrer Todesdomäne

Die Stimulation mit dem Liganden bietet eine gute Möglichkeit den Signalweg auf vielen unterschiedlichen Zelllinien untersuchen zu können, da dafür in der Regel keine weitere Optimierung notwendig ist. Dabei besteht allerdings keine Möglichkeit, zwischen der Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und auch 4 zu unterscheiden. Daher wurden zunächst Expressionsplasmide für die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 hergestellt, um die Aktivierung von NF- κ B durch Überexpression der Rezeptoren zu untersuchen. Allerdings besteht auch bei diesen Wildtyp-Rezeptoren die Möglichkeit einer Heteromultimerisierung mit endogenen Rezeptoren, wodurch auch bei Überexpression keine eindeutige Unterscheidung des Signals der einzelnen Rezeptoren möglich gewesen wäre. Aus diesem Grund wurden zusätzlich konstitutiv aktive Fusionsproteine der beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 hergestellt, die es ermöglichen, über eine artifizielle Multimerisierung jeweils den Effekt eines der beiden Rezeptoren zu untersuchen.

Um nun die konstitutiv aktiven TRAIL-Rezeptoren herzustellen, wurde ein Prinzip verwendet, das für TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) beschrieben ist (Schneider et al., 2008). Dabei wurde die Eigenschaft des N-Terminus des viralen Proteins LMP1 des Epstein-Barr-Virus (EBV) ausgenutzt, spontan Multimere in der Zellmembran auszubilden (Gires et al., 1997). So aktiviert LMP1 seine eigene intrazelluläre Signaldomäne (Floettmann & Rowe, 1997) oder in diesem Fall die fusionierte Signaldomäne des TNF-Rezeptors 1. Da die Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren, ähnlich wie bei anderen TNF-Rezeptoren, durch Trimerisierung bzw. Multimerisierung vermittelt wird, wurde dieses Prinzip hier ebenfalls angewendet (Clancy et al., 2005). Die LMP1-vermittelte Multimerisierung erlaubt so auch einen Ausschluss von Wechselwirkungen mit endogenen TRAIL-Rezeptoren, weshalb später vorrangig mit diesen Rezeptoren gearbeitet wurde.

Um zugleich den Einfluss der Todesdomäne auf die durch die beiden TRAIL-Rezeptoren vermittelte Aktivierung von NF- κ B untersuchen zu können, wurden auch verkürzte Fusionsproteine hergestellt, deren C-Terminus bis vor den Beginn der Todesdomäne verkürzt wurde. Diese verkürzten Proteine, jeweils angedeutet durch die Bezeichnung Δ C, besaßen dann noch den verbleibenden 93 bzw. 91 Aminosäuren langen C-Terminus. Die Todesdomänen der beiden TRAIL-Rezeptoren gleichen sich in ihrer Aminosäuresequenz zu 58% und sind essentiell für die Übermittlung des Apoptosesignals (Walczak et al., 1997). Nach den Todesdomänen folgte jeweils nur noch ein kurzer Bereich von 20 bzw. 18 Aminosäuren, so dass die beobachteten Effekte durch Verlust des C-Terminus höchstwahrscheinlich auf die fehlende Todesdomäne zurückzuführen sind. Eine mögliche Funktion dieser letzten Aminosäuren ist bisher nicht bekannt.

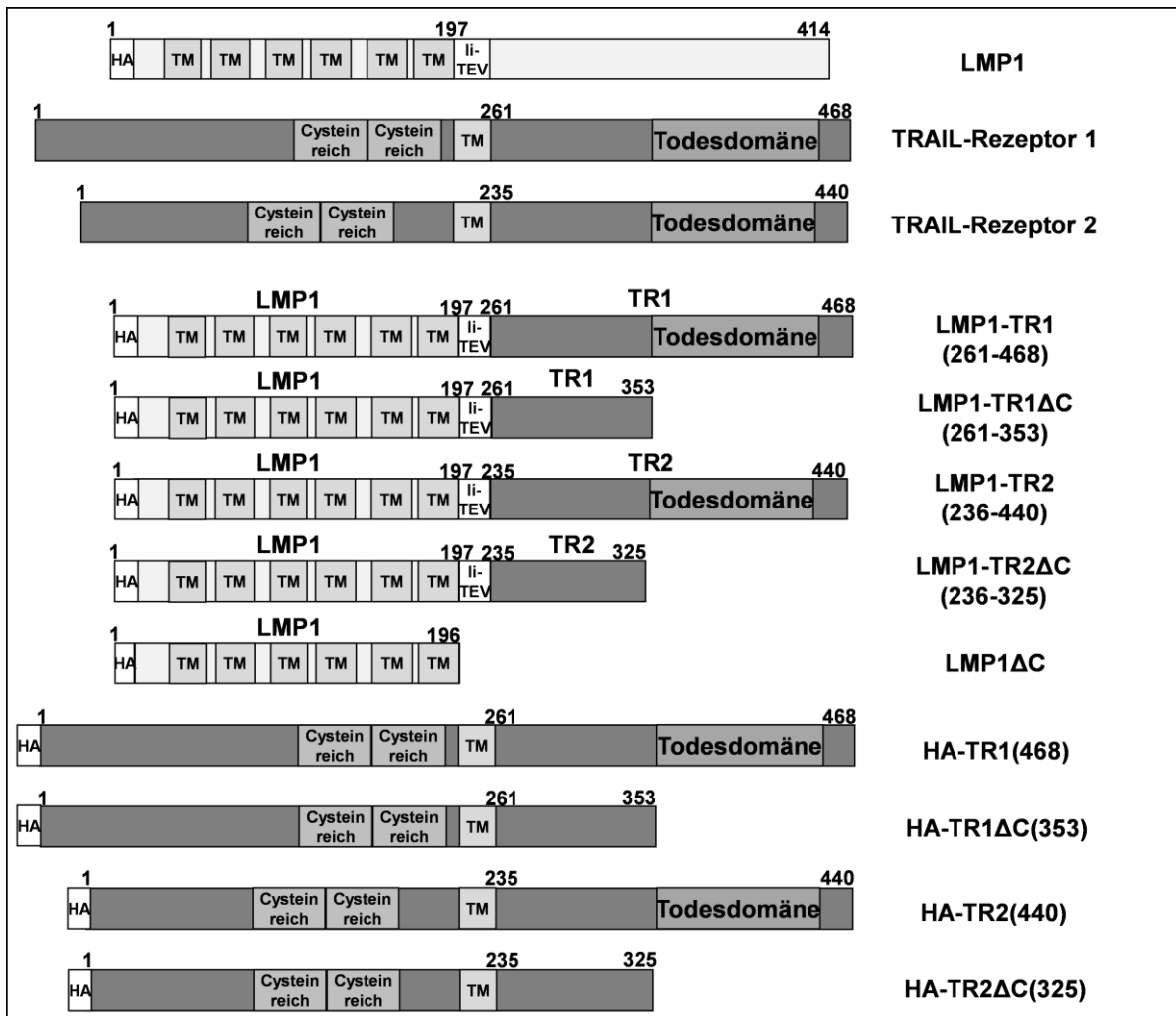


Abbildung 14: Schematische Darstellung der TRAIL-Rezeptoren und LMP1, sowie der klonierten Rezeptoren. Die Nummern an den schematischen Darstellungen und Nummern in Klammern bezeichnen die Aminosäuren, ausgehend von der Sequenz des jeweiligen Wildtyp-Proteins, die für die rekombinanten Proteine eingesetzt wurden. HA= Hemagglutinin-Epitop; li-TEV= Verbindungssequenz mit TEV-Protease Schnittstelle; TM= Transmembran Domäne.

5.2.1. Klonierung der Fusionsproteine

Bei der Klonierung der Wildtyp-Rezeptoren wurde jeweils die codierende Sequenz von TRAIL-Rezeptor 1 und 2 mit einem Hemagglutinin-Epitop (HA) in den humanen Expressionsvektor pcDNA6 kloniert.

Für die Herstellung der konstitutiv aktiven TRAIL-Rezeptoren wurden die intrazellulären Signaldomänen der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 mit dem N-Terminus von LMP1 fusioniert. Dazu wurde im Ausgangsvektor pCMV, der die kodierende Sequenz von LMP1 trägt, die Sequenz der Signaldomäne von LMP1 gegen die Sequenz der intrazellulären Domänen der beiden TRAIL-Rezeptoren ausgetauscht.

Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses der Todesdomäne auf den Signalweg wurden durch Punktmutagenese verkürzte Varianten der beiden Fusionsproteine und der beiden Wildtyp-Rezeptoren geschaffen. Durch einen Basenaustausch wurde das Kodon einer Aminosäure vor Beginn der Todesdomäne zu einem Stopp-Kodon mutiert, so dass die resultierenden Proteine keine Todesdomäne und die C-terminalen 20 bzw. 18 Aminosäuren mehr besaßen. Das wurde in Kauf genommen, da es bisher keine Hinweise auf eine Funktion dieser wenigen Aminosäuren gibt. Zusätzlich wurde das ebenfalls durch Punktmutagenese verkürzte Protein LMP1 Δ C hergestellt. Es endet vor dem Verbindungsstück, das LMP1 und die fusionierte Signaldomäne verbindet und besteht damit nur aus dem N-Terminus von LMP1 mit seinen sechs Transmembrandomänen. So konnte eine Aktivierung von NF- κ B, die bereits durch den N-Terminus von LMP1 verursacht worden wäre, ausgeschlossen werden. Abb. 14 zeigt eine Übersicht der Ausgangsproteine LMP1, TRAIL-Rezeptor 1 und TRAIL-Rezeptor 2, sowie alle davon abgeleiteten Proteine.

5.2.2. Funktionalität der Fusionsproteine

Diese Art der Fusionsproteine wurde bereits erfolgreich für TNF-Rezeptor 1 und CD40 verwendet, bisher aber nie für TRAIL-Rezeptoren, weshalb zunächst auch die Funktionalität überprüft werden musste.

Vorab wurden die klonierten Proteine in TRAIL-resistente HEK 293T Zellen transfiziert, um zu überprüfen, ob die Proteine exprimiert wurden. In Abb. 15 ist am Beispiel der beiden Fusionsproteine LMP1-TR1 und LMP1-TR2, sowie LMP1 und LMP1 Δ C die Expression in HEK 293T Zellen dargestellt. Neben dem Nachweis mit Hilfe des anti-HA-Antikörpers, war es auch möglich, die Fusionsproteine mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen TRAIL-Rezeptor 1 und 2 nachzuweisen. Alle weiteren klonierten Proteine wurden ebenfalls in HEK 293T Zellen auf ihre Expression getestet und konnten erfolgreich in der Western-Analyse mit anti-HA-Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Funktionalität der Fusionsproteine

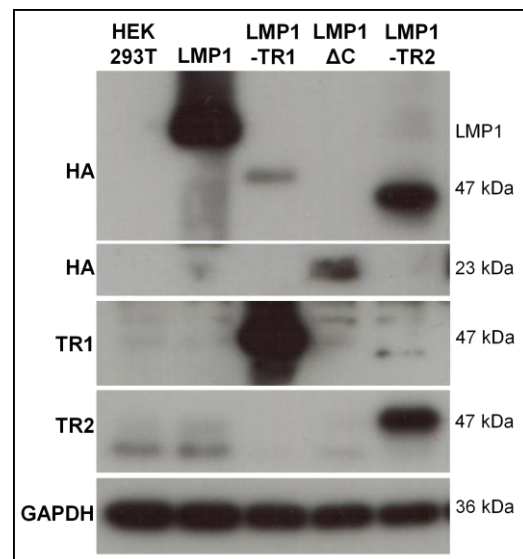


Abbildung 15: Expression der Fusionsproteine und LMP1 in HEK 293T. Je 10^5 Zellen wurden mit den aufgeführten Vektoren transfiziert und nach 24 Std. mit 1xSDS-Ladepuffer lysiert und in einem 12% SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen das HA-Epitop, TRAIL-Rezeptor 1/2, sowie GAPDH als Ladungskontrolle und den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern.

in Form einer proapoptotischen Wirkung feststellen zu können, wurde die TRAIL sensitive adhäre Zelle SHEP verwendet, die nach Stimulation mit HA-TRAIL moderat Apoptose induzierte (vgl. Abb. 16 A). Sie wurde mit den Vektoren der verschiedenen Fusionsproteine und pcDNA3.1 GFP transfiziert und nach 24 Stunden der Anteil GFP positiver Zellen und der Anteil apoptotischer Zellen nach PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Während der Gesamtanteil der GFP-positiven lebenden Zellen (GFP+/PI-) vergleichbare Werte aufwies, wurde ein deutlicher Unterschied im Bereich der stark GFP-exprimierenden Zellen sichtbar (vgl. Abb. 16 C). Während LMP1 Δ C eine gleichmäßige Verteilung der GFP-positiven Zellen über die ganze Skala des Histogramms zeigte, nahm bei LMP1-TR1 die Anzahl der Ereignisse im Bereich der starken GFP-Expression deutlich ab. Wenn man gezielt den Bereich der hochexprimierenden Zellen auswählt und mit der Expression des Leervektors

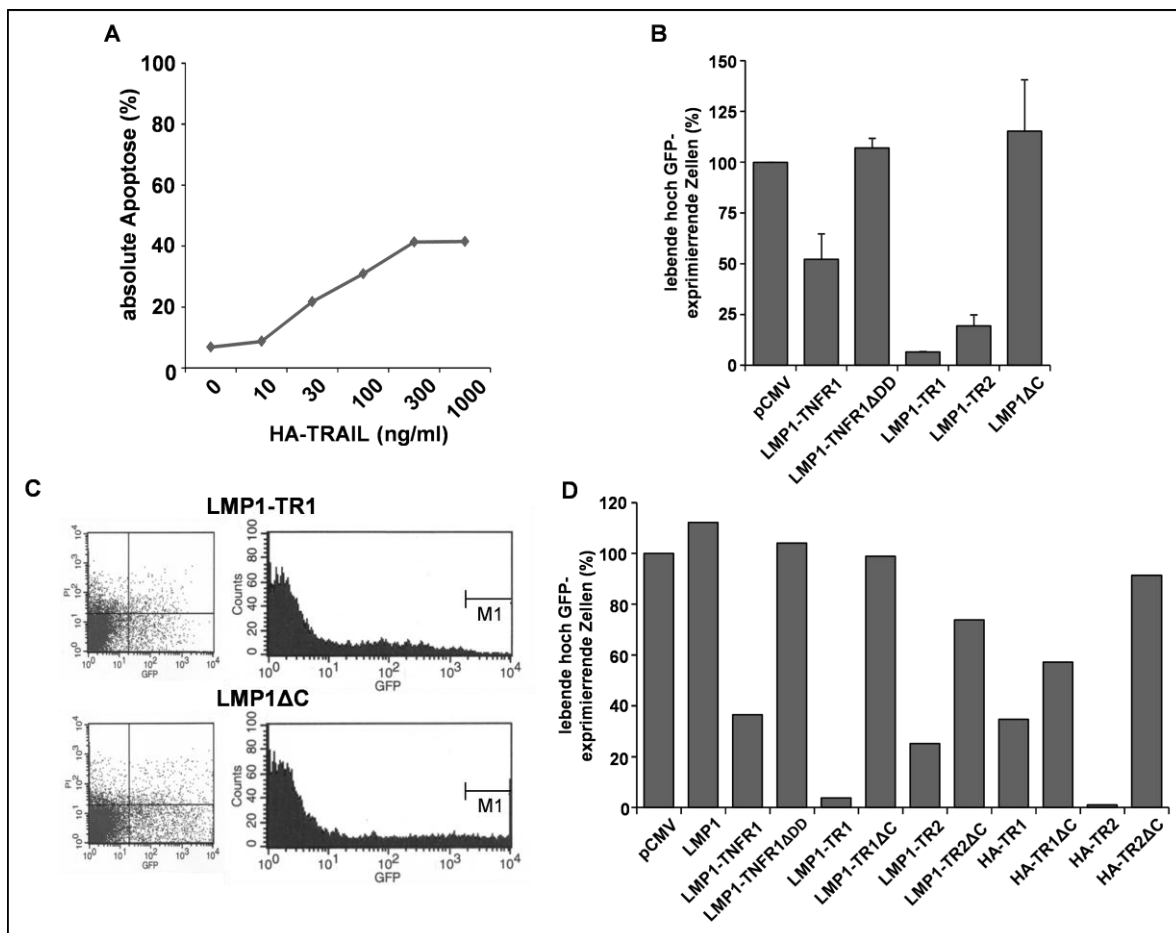


Abbildung 16: Expression der Fusionsproteine in der TRAIL sensitiven Zelllinie SHEP. (A) Je 10^5 SHEP Zellen wurden für 24 Std. mit den angegebenen Konzentrationen HA-TRAIL stimuliert. Die Apoptoserate wurde nach PI-Färbung mit 0,1% PI in PBS durchflusszytometrisch ermittelt. (B) Je 2×10^5 SHEP-Zellen wurden mit 200 ng pcDNA3.1 GFP und 800 ng der Vektoren der genannten Konstrukte transfiziert. Nach 24 Std. erfolgte die Färbung mit 0,1% PI in PBS und Messung im Durchflusszytometer. Dargestellt ist der Anteil der lebenden hoch GFP exprimierenden Zellen 24 Std. nach der Transfektion. Der Anteil lebender hoch GFP exprimierenden Zellen des Leervektors pCMV wurde gleich 100% gesetzt und die weiteren Werte in Bezug darauf dargestellt. Die Werte stellen den Mittelwert mit Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dar. (C) Exemplarische Darstellung der GFP-Expression und PI-Färbung von SHEP-Zellen aus B nach Transfektion mit pcDNA3.1 GFP und LMP1-TR1, bzw. LMP1 Δ C. M1 bezeichnet den Bereich der hoch GFP-exprimierenden Zellen. (D) Die Transfektion, Messung der GFP-Expression und Bestimmung der Apoptoserate erfolgte wie in B als Einzelexperiment mit den genannten Vektoren.

verglichen, sieht man deutlich, dass der Anteil für die proapoptotischen Fusionsproteine wesentlich geringer war, während LMP1 und LMP1 Δ C sich wie der Leervektor verhielten (vgl. Abb. 16 B). Abb. 16 D zeigt, dass auch die verkürzten Proteine ohne Todesdomäne sich ähnlich wie der Leervektor verhielten und somit deutlich weniger Einfluss auf die Viabilität der hochexprimierenden Zellen hatten. Auch die nicht konstitutiv aktiven Proteine HA-TR1 und HA-TR2 zeigen einen proapoptotischen Effekt, wobei er bei HA-TR1 geringer ausfiel. Die Überexpression der Wildtyp-Rezeptoren verursachte ebenfalls einen gewissen Grad an Aktivierung und damit eine proapoptotische Wirkung.

Somit konnte für die Fusionsproteine LMP-TR1 und LMP1-TR2, wie auch für die Wildtyp-Rezeptoren HA-TR1 und HA-TR2, eine proapoptotische Wirkung in TRAIL-sensitiven Zellen gezeigt werden, während die Verkürzung um die Todesdomäne diesen Effekt verhindern konnte.

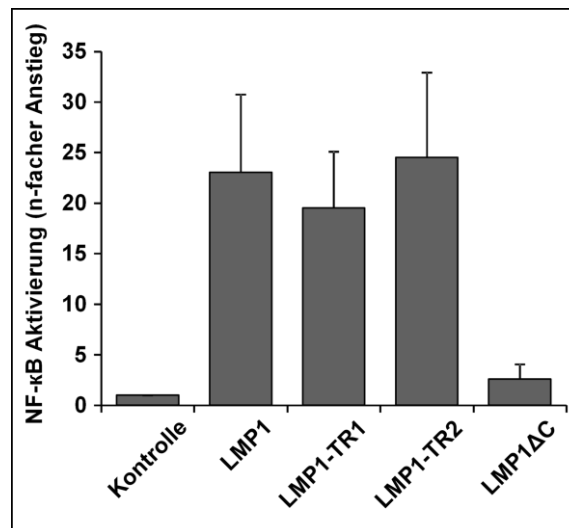


Abbildung 17: Aktivierung von NF- κ B durch Überexpression der Fusionsproteine und LMP1 in HEK 293T. Je 10^5 HEK 293T Zellen wurden mit den Reporter-Plasmiden 3x- κ B-L und PGK Renilla, sowie den genannten Vektoren mittels Lipofektion transfiziert und nach 24 Std. lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Die Aktivierung wurde jeweils auf die Kontrolle (1,0) bezogen, die mit 3x- κ B-L, PGK Renilla und inerte DNA transfiziert war. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus 3 unabhängigen Experimenten.

Nachdem die Fusionsproteine in HEK 293T exprimiert werden konnten und in einer TRAIL-sensitiven Zelllinie eine proapoptotische Wirkung aufwiesen, wurde anschließend die NF- κ B Aktivierung durch die Fusionsproteine untersucht.

Dafür wurden HEK 293T Zellen mit Reporter-Plasmiden und dem jeweiligen Fusionsprotein bzw. LMP1 und LMP1 Δ C transfiziert und die Luziferase-Aktivität nach 24 Stunden bestimmt. Abb. 17 zeigt, dass die beiden Fusionsproteine LMP1-TR1 und LMP1-TR2, wie das Wildtyp-Protein LMP1 auch, in der Lage waren, NF- κ B zu aktivieren, während LMP1 Δ C, das nur aus dem Transmembranbereich von LMP1 besteht, keinen Effekt zeigte. Damit war die gemessene NF- κ B-Aktivierung verursacht durch die Signaldomänen der TRAIL-Rezeptoren.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Fusionsproteine der beiden TRAIL-Rezeptoren in der Lage war, sowohl den Signalweg der Apoptose, als auch NF- κ B, konstitutiv zu aktivieren.

5.2.3. Entscheidende Bedeutung der Todesdomäne für TR1 und TR2

Die Fusionsproteine LMP1-TR1 und LMP1-TR2 erlauben zum einen die Unterscheidung zwischen der Aktivierung des einen oder des anderen Rezeptors, was über Stimulation mit TRAIL nicht möglich ist, zum anderen geben die verkürzten Proteine Aufschluss darüber, ob der C-Terminus mit der Todesdomäne für die Signalübertragung beider Rezeptoren relevant ist.

In Abb. 18 ist die NF- κ B Aktivierung durch die verschiedenen Proteine dargestellt. Dabei waren beide Fusionsrezeptoren LMP1-TR1 und LMP1-TR2, sowie LMP1 und LMP1-TNFR1, in der Lage, NF- κ B zu aktivieren. Die beiden konstitutiv aktiven TRAIL-Rezeptoren konnten den Signalweg dabei ähnlich stark aktivieren wie das virale LMP1. Die Wildtyp-Rezeptoren HA-TR1 und HA-TR2 aktivierten hier hingegen schwächer als die konstitutiv aktiven Proteine.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass für beide TRAIL-Rezeptoren, wie auch für den TNF-

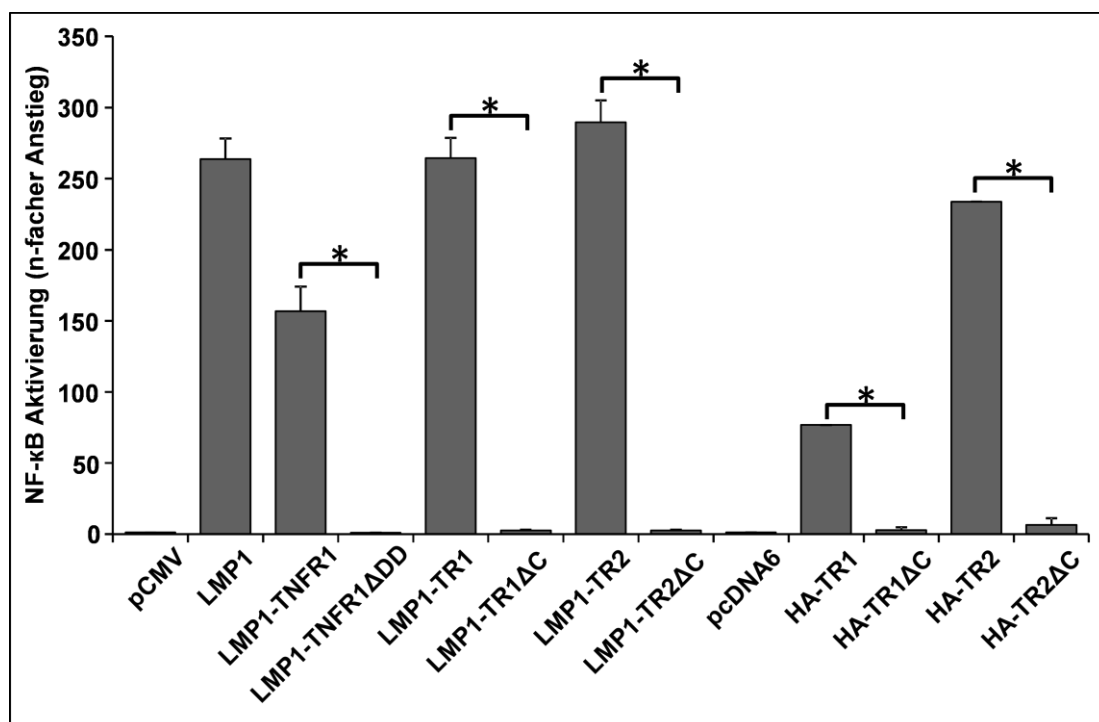


Abbildung 18: NF- κ B Aktivierung durch Überexpression der verschiedenen rekombinanten Rezeptoren in HEK 293T. Je 10^5 HEK 293T Zellen wurden mit den Reporter-Plasmiden 3x- κ B-L und PGK Renilla, sowie den genannten Vektoren mittels Lipofektion transfiziert und nach 24 Std. lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Dargestellt sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten mit Standardfehler, wobei die Aktivierung jeweils auf den entsprechenden Leervektor (1,0) bezogen wurde (pCMV für LMP1-abgeleitete Konstrukte, pcDNA6 für HA-TR-Konstrukte). Statistische Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des zweiseitigen, gepaarten t-Tests ermittelt, $p < 0,01$.

Rezeptor 1, die Anwesenheit des C-Terminus mit der Todesdomäne essentiell für die Aktivierung von NF- κ B war. Das galt sowohl für die konstitutiv aktiven Fusionsproteine als auch die Wildtyp-Rezeptoren.

Damit wurde deutlich, dass die Überexpression der Fusionsproteine der beiden TRAIL-Rezeptoren, im Besonderen für LMP1-TR1, eine stärkere Aktivierung bewirken konnten, als die Wildtyp-Rezeptoren. Die entscheidende Beobachtung war, dass die TRAIL-induzierte Aktivierung von NF- κ B vom C-Terminus der TRAIL-Rezeptoren mit ihrer Todesdomäne abhängig war. Das galt sowohl für die Fusionsproteine als auch für die Wildtyp-Rezeptoren.

Damit zeigte sich die Bedeutung des C-Terminus der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 für die Aktivierung von NF- κ B. Da es sich aber bei der Todesdomäne um eine bekannte Interaktionsdomäne handelt und den verbleibenden 20 Aminosäuren bisher keine Funktion zugeschrieben wird, ist es wahrscheinlich, dass die Todesdomäne die essentielle Rolle spielt. Damit rücken für die weitere Untersuchung des Signalweges Proteine in den Focus, die ebenfalls eine Todesdomäne besitzen, da diese in der Regel homotypische Interaktionen eingehen (Lahm et al., 2003).

5.3. FADD als Adaptorprotein des NF- κ B-Signalweges

Nachdem die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL-Rezeptor 1 und 2 von ihrer Todesdomäne abhängig war, führte das wiederum zu FADD als potentielltes Adaptorprotein. Es besitzt eine Todesdomäne, sowie eine Todeseffektordomäne und ist ein bekannter Interaktionspartner der Todesrezeptoren bei der Induktion von Apoptose (Thomas et al., 2006). Im Zusammenhang mit dem Fas Rezeptor wird FADD bereits mit der Aktivierung von NF- κ B in Verbindung gebracht, da FADD defiziente JURKAT-Zellen keine Aktivierung von NF- κ B durch FasL zeigen (Kreuz, 2004).

5.3.1. Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung in HEK 293T von FADD

Zunächst wurde der Einfluss von FADD in der TRAIL-resistenten Zelllinie HEK 293T untersucht, da diese sehr deutlich NF- κ B auf Stimulation mit TRAIL aktiviert. In Abb. 19 ist die Phosphorylierung von I κ B α in HEK 293T nach Stimulation mit ILZ-TRAIL dargestellt und man sieht eine deutliche Aktivierung bereits nach 15 Minuten, die auch nach 30 und 60 Minuten noch detektierbar war.

Einen zusätzlichen Hinweis auf einen möglichen Einfluss von FADD auf NF- κ B lieferte die Beobachtung von Hu et al., dass die Überexpression von FADD in HEK 293T in der Lage war, NF- κ B zu aktivieren (Hu et al., 2000).

Die Tatsache, dass die Überexpression von FADD NF- κ B aktiviert, lässt aber noch keinen direkten Rückschluss auf den TRAIL-Signalweg zu, da die Aktivierung nicht durch den Rezeptor, sondern bereits durch die Überexpression erfolgte.

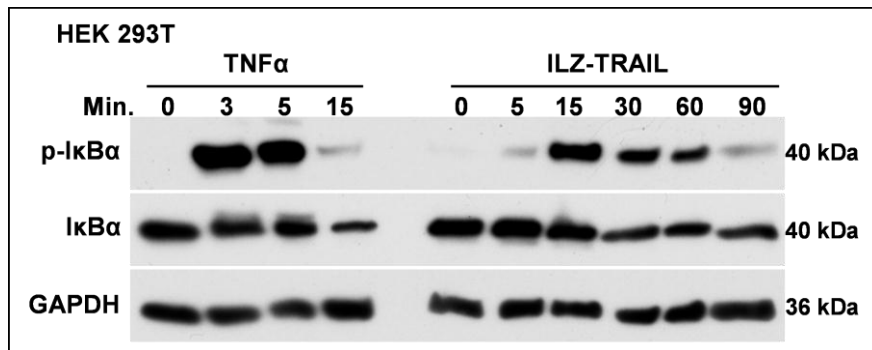


Abbildung 19: Phosphorylierung von IκBα durch ILZ-TRAIL in HEK 293T. Je 2×10^6 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 300 ng/ml TNFα oder 1 µg/ml ILZ-TRAIL stimuliert und mit 100 µl Puffer Kern A lysiert. 10 µl jeder Probe wurden in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen p-IκBα und IκBα, sowie GAPDH als Ladungskontrolle und den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern.

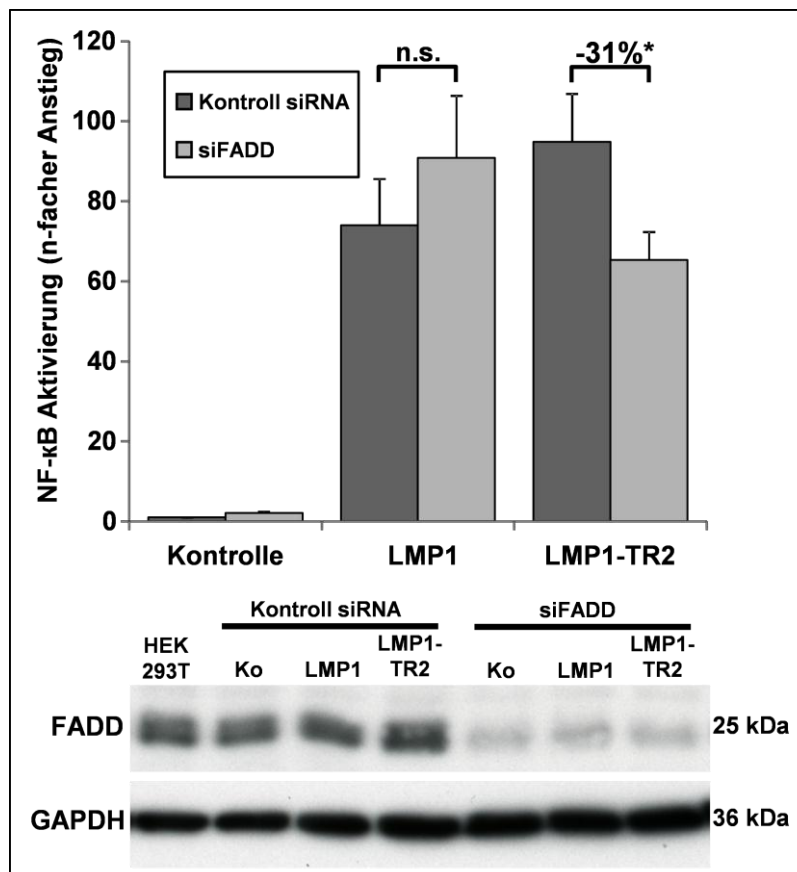


Abbildung 20: FADD beeinflusst die Aktivierung von NF-κB durch LMP1-TR2. Je $0,5 \times 10^5$ HEK 293T-Zellen wurden in eine 24-Loch-Platte ausgesät und nach 24 und 48 Std. repetitiv mit 150 pmol der siRNA gegen FADD (siFADD) oder Kontroll siRNA transfiziert. Nach 72 Std. wurden die Zellen mit 3x-κB-L und PGK-Renilla, sowie inerter DNA, LMP1 oder LMP1-TR2 transfiziert und schließlich nach 96 Std. lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Die Normalisierung erfolgte auf das NF-κB-Niveau der Kontrolle, transfiziert mit Kontroll siRNA und inerter DNA. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz (*) wurde mit Hilfe des zweiseitigen, gepaarten t-Tests ermittelt ($p < 0,005$); n.s. = nicht signifikant. Der Nachweis der Expression von FADD erfolgte in der Lysaten der Luciferase-Messung, hier exemplarisch für eine Messung dargestellt. Dazu wurden je 10 µl der Lysate der einzelnen Proben in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-FADD-Antikörper, sowie anti-GAPDH-Antikörper als Ladungskontrolle und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

Um nun zu zeigen, dass endogenes FADD einen direkten Einfluss auf die Vermittlung der NF- κ B Aktivierung durch TRAIL hat, wurde die Expression von FADD in HEK 293T Zellen mit Hilfe von RNA Interferenz transient gehemmt und anschließend die Aktivierung von NF- κ B durch LMP1-TR2 und LMP1 bestimmt (vgl. Kap. 4.2.2.9.). Zur Steigerung der Hemmung wurde dabei repetitiv mit siRNA transfiziert. Abb. 20 zeigt die NF- κ B Aktivierung durch die transfizierten Proteine in Kontrollzellen und Zellen mit verminderter FADD Expression. Die verbliebene Menge an FADD war für die gemessene Aktivierung scheinbar ausreichend, aber die Aktivierung durch LMP1-TR2 war durch die Hemmung von FADD, im Gegensatz zur Aktivierung durch LMP1, signifikant reduziert.

In HEK 293T Zellen konnte daher durch den Einsatz von RNA Interferenz gezeigt werden, dass FADD auch direkt auf die NF- κ B Aktivierung durch den konstitutiv aktiven Rezeptor LMP1-TR2 einwirken konnte und damit direkten Einfluss auf den TRAIL-Signalweg hatte. Daher wurde FADD anschließend genauer untersucht.

5.3.2. Fehlende Aktivierung von NF- κ B in FADD defizienten Zellen

Nach den Erkenntnissen aus HEK 293T Zellen, wurde die Rolle von FADD weiter in einem System untersucht, in dem kein endogenes FADD vorhanden war. Dazu wurde eine FADD defiziente JURKAT-Zelllinie A3 FADD def. und ihre parentale Linie A3 untersucht.

Das Fehlen von FADD ermöglichte hier eine klare Aussage über die Beteiligung von FADD am Signalweg.

Dazu wurden zunächst die Zelllinien A3 und A3 FADD def. auf ihre Fähigkeit untersucht, NF- κ B nach Stimulation mit TRAIL zu induzieren. Bei A3 handelt es sich um einen Klon der Zelllinie JURKAT, der eingesetzt wurde, um durch chemische Mutagenese und anschließende Selektion durch Stimulation von CD95, Fas resistente Zelllinien zu generieren. Dabei entstanden mehrere derivative Klone der Zelllinie JURKAT A3, die unterschiedliche Defekte im Apoptosesignalweg aufwiesen. Dazu zählt auch die hier verwendete Zelllinie A3 FADD def. (Juo et al., 1999).

Zunächst wurden beide Zelllinien in der Western-Analyse auf die Phosphorylierung und Degradation von I κ B α nach Stimulation mit ILZ-TRAIL und TNF α untersucht. Während in der parentalen Linie A3 I κ B α nach Stimulation mit ILZ-TRAIL phosphoryliert wurde, waren A3 FADD def. Zellen dazu nicht in der Lage (vgl. Abb. 21). Eine Degradation von I κ B α war in beiden Zelllinien nur nach Stimulation mit TNF α zu beobachten. Da die Phosphorylierung durch ILZ-TRAIL deutlich geringer ausfiel als durch TNF α , konnte für ILZ-TRAIL keine Degradation von I κ B α beobachtet werden.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die FADD defiziente Zelllinie im Gegensatz zu ihrer parentalen Zelllinie A3 nicht in der Lage war, auf Stimulation mit TRAIL NF- κ B zu aktivieren.

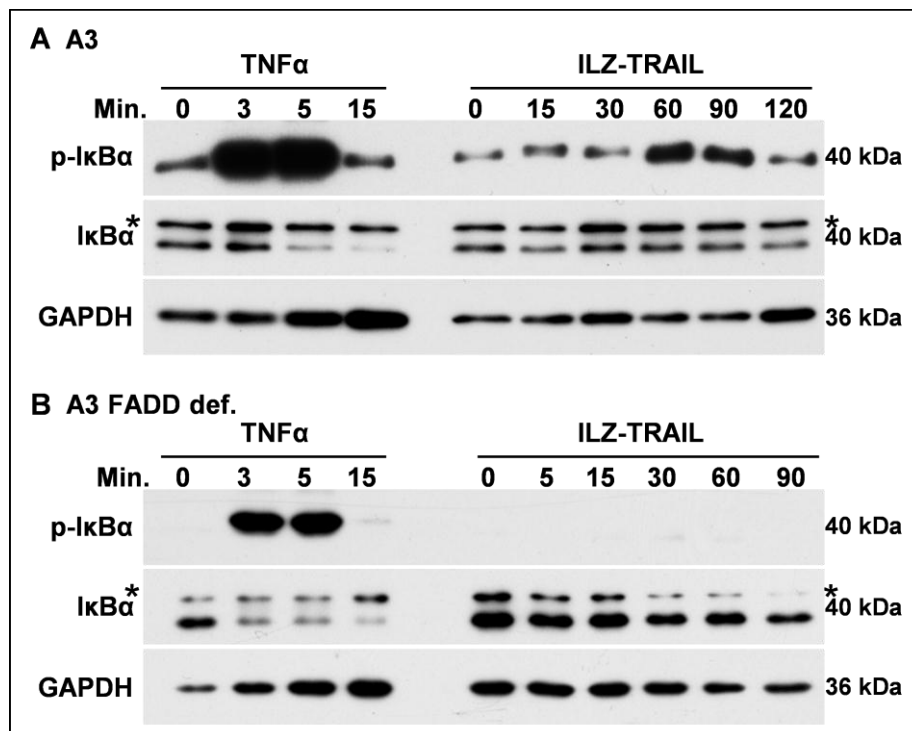


Abbildung 21: Untersuchung der Phosphorylierung von IκBα durch TRAIL in JURKAT derivativen Zelllinien A3 (A) und A3 FADD def. (B). Je 2×10^6 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 300 ng/ml TNFα oder 1 µg/ml ILZ-TRAIL stimuliert und mit 100 µl Puffer Kern A lysiert. 10 µl jeder Probe wurden in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen p-IκBα und IκBα, sowie GAPDH als Ladungskontrolle und den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Detektion mit anti-IκBα-Antikörper zeigt eine unspezifische Bande, die mit * markiert ist.

5.3.3. TRAIL-induzierte NF-κB Aktivierung nach Reexpression von FADD

Durch die Beobachtung, dass FADD defiziente Zellen kein NF-κB durch TRAIL aktivieren, stellte sich die Frage, ob allein das Fehlen von FADD dafür verantwortlich ist.

Grundsätzlich ist es möglich und wahrscheinlich, dass mutagenisierte Zelllinien neben der bekannten Mutation auch Träger weiterer Mutationen sein können. Dabei kann es sich beispielsweise um Defekte im Apoptosesignalweg oder NF-κB-Signalweg handeln. Daher ist in solchen Systemen die Kontrolle durch sogenannte Rettungsexperimente, in diesem Fall durch Reexpression von FADD, ratsam, um einen Effekt sekundärer Mutationen auszuschließen.

Um den Einfluss der Reexpression von FADD auf die Aktivierung von NF-κB durch TRAIL zu untersuchen und zugleich die Ergebnisse der Western-Analyse zu validieren, wurde der Anstieg der Luziferase-Reporter-Expression des NF-κB Reporter-Plasmids 3x-κB-L nach Stimulation in diesen Zellen untersucht.

Dabei war zunächst festzustellen, dass für A3 eine Aktivierung durch ILZ-TRAIL messbar war, für A3 FADD def. dagegen nicht. Wodurch zunächst die Ergebnisse der Untersuchung

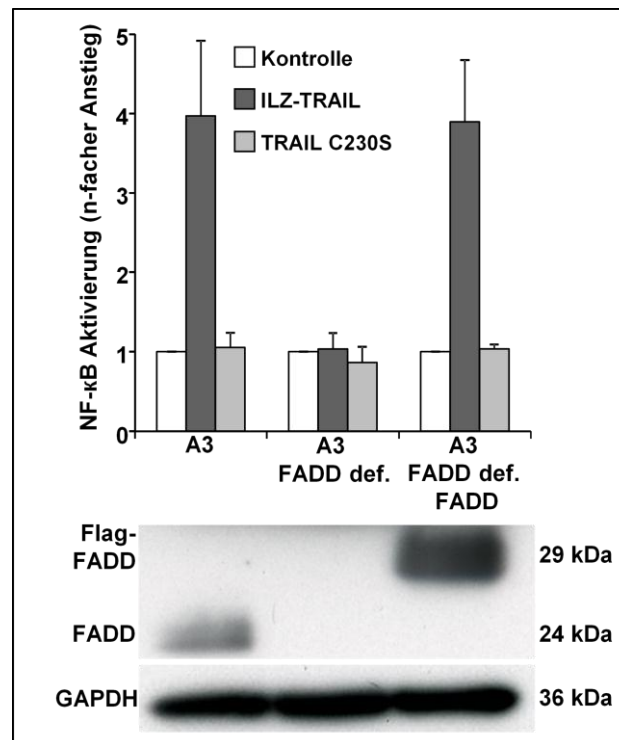


Abbildung 22: Reexpression von Flag-FADD stellt die NF-κB Aktivierung durch TRAIL wieder her. Je 4×10^6 Zellen der Zelllinien A3 und A3 FADD def. wurden mit inerte DNA, 3x-κB-L und PGK-Renilla transfiziert, weitere 4×10^6 A3 FADD def. Zellen zudem mit pcDNA 3.1 Flag-FADD, 3x-κB-L und PGK-Renilla. Die Inkubation nach der Transfektion erfolgte in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ Caspaseinhibitor qVD-OPH. 24 Std. nach Transfektion erfolgte die Stimulation von je 1×10^6 transfizierten Zellen mit $1 \mu\text{g/ml}$ ILZ-TRAIL oder $1 \mu\text{g/ml}$ TRAIL C230S. 1×10^6 Zellen blieben unstimuliert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Der Anstieg der NF-κB Aktivierung wurde auf den Wert der unstimulierten Zellen normalisiert (1,0). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten gemessen in Doppelwerten.

Der Nachweis der Expression von FADD erfolgte in der Lysaten der Luziferase-Messung. Dazu wurden $10 \mu\text{l}$ des Lysates der unstimulierten Kontrolle in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-FADD-Antikörper, sowie anti-GAPDH-Antikörper als Ladungskontrolle und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

der Phosphorylierung von IκBα bestätigt wurden. Zudem war in keiner der beiden Zelllinien eine Induktion von NF-κB durch die Stimulation mit TRAIL C230S zu beobachten.

Wenn die Zellen nun zusätzlich mit einem Plasmid transfiziert wurden, das die codierende Sequenz für Flag-FADD enthielt, konnte nach Stimulation mit ILZ-TRAIL wieder eine deutliche Aktivierung gemessen werden (vgl. Abb. 22). Die Messung der Proben wurde jeweils auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle (1,0) bezogen.

Also gelang es durch die transiente Reexpression von Flag-FADD zu zeigen, dass die Unterbrechung des Signalweges allein durch das Fehlen von FADD verursacht wurde. Die transiente Überexpression von Flag-FADD in A3 FADD def. Zellen stellte die Funktion des Signalweges der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF-κB wieder her und damit konnte FADD als das essentielle rezeptornahе Adaptorprotein der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF-κB identifiziert werden.

5.3.4. Abhängigkeit der FADD Funktion von der Multimerisierung von FADD

Um die durch den Reporter-gen-Versuch gewonnene Information, dass FADD das gesuchte Adaptorprotein war, einerseits zu bestätigen und um andererseits weiterführende Versuche zur Charakterisierung der Rolle der Todeseffektordomäne von FADD durchführen zu können, wurden zunächst FADD und die FADD-Varianten AHALL und RHDAAs in HEK 293T überexprimiert und anschließend stabil und induzierbar in den FADD defizienten Zellen reexprimiert.

Da bekannt ist, dass FADD durch Überexpression in HEK 293T NF- κ B aktiviert, wurde das zunächst auch für die beiden FADD Varianten AHALL und RHDAAs getestet. Für sie ist beschrieben, dass sie auf Grund des veränderten konservierten Motivs RXDLL bzw. RHDLL, nicht in der Lage sind, TRAIL-induzierte Apoptose zu vermitteln und zeigen bei Überexpression einen dominant negativen Effekt auf die Wirkung von endogenem FADD auf die Induktion von Apoptose. Die Ursache dafür ist eine Hemmung der Selbstassoziiierung von FADD-Molekülen, durch das zu AHALL oder RHDAAs veränderte konservierte Motiv. Dabei geht die Fähigkeit des CD95-Rezeptorkomplexes verloren, Caspase 8 zu rekrutieren, während die Bindung von FADD bzw. RHDAAs an den Rezeptor unverändert bleibt. Somit wird kein aktiver DISC ausgebildet, der Apoptose induzieren könnte (Muppidi et al., 2006).

Da der Defekt der FADD Varianten nach der Bindung an den Rezeptor und vor der Bindung der Caspase 8 eingreift, erlaubt er in der Reexpression gleichzeitig die Untersuchung beider TRAIL-Rezeptoren und zeigt die Notwendigkeit der Bildung eines funktionellen DISC, möglicherweise mit Caspase 8.

Über die an der Bindung von FADD zu den verschiedenen Rezeptoren beteiligten Aminosäuren ist relativ wenig bekannt und sie scheinen weite Bereiche der Todesdomäne zu involvieren. Zudem unterscheiden sich die Bereiche für die Bindung verschiedener Rezeptoren. Thomas et al. konnten für TRAIL-Rezeptor 2 zeigen, dass der Austausch bestimmter Aminosäuren in der Todesdomäne von FADD die Bindung zu TRAIL-Rezeptor 2 verringern konnte, aber meist nicht komplett verhinderte (Thomas et al., 2006). Der große Nachteil bei der Verwendung einer Variante mit defekter TRAIL-Rezeptor 2-Bindung wäre, dass möglicherweise der Signalweg über TRAIL-Rezeptor 1 trotzdem aktiviert würde, da der Einfluss dieser Mutationen auf die Bindung zu TRAIL-Rezeptor 1 unbekannt ist und zunächst über Immunpräzipitationen getestet werden müsste.

Die Proteine Flag-AHALL und Flag-RHDAAs wurden nun zunächst durch Punktmutagenese ausgehend von rekombinantem Flag-FADD hergestellt. Bei der Überexpression von Flag-FADD zeigt sich dann eine deutliche Aktivierung von NF- κ B, sichtbar durch den starken Anstieg der Luziferase-Aktivität in den transfizierten Zellen (vgl. Abb. 23 A). Der Wert bezog sich dabei auf das Niveau der mit Leervektor transfizierten Kontrolle (1,0). Die beiden Proteine Flag-AHALL und Flag-RHDAAs dagegen aktivierten weniger NF- κ B. Da HEK 293T

Zellen allerdings endogenes FADD besitzen, bedeutete diese Beobachtung, dass sie in der Lage waren, zusammen mit endogenem FADD NF- κ B zu aktivieren, ob sie eigenständig dazu im Stande wären, mussten die Versuche in A3 FADD def. noch zeigen. Die Western-Analyse in Abb. 23 A zeigt die Expression der Flag-Proteine in den Lysaten der Luziferase-Messung.

Für die stabile Reexpression von FADD und den FADD-Varianten AHALL und RHDA, wurden die drei Proteine als Fusionsproteine mit Destabilisierungsdomäne (DD) verwendet. Dadurch wurden die Proteine, wie in Kapitel 4.2.3.8. beschrieben, durch das sogenannte „Proteo Tuning“ reguliert. Die Destabilisierungsdomäne führt dabei zum Abbau des Zielproteins durch das Proteasom, bis der stabilisierende Ligand Shield-1 zugegeben wird. Somit sind die Proteine sehr schnell induzierbar. Die Destabilisierungsdomäne kann dabei sowohl N- als auch C-Terminal fusioniert werden und auch eine Verwendung mittig im Protein wäre möglich. Wie bei anderen induzierbaren Systemen auch, kann man im Vorfeld

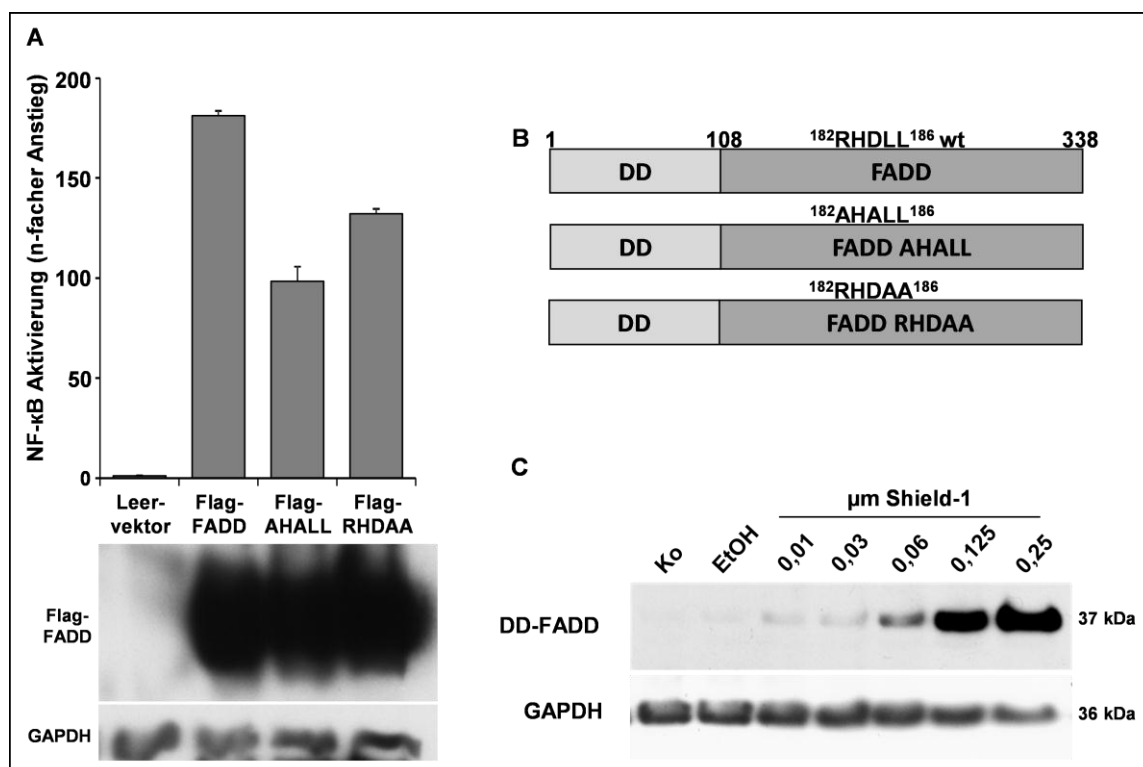


Abbildung 23: Expression von FADD, AHALL und RHDA in den Zelllinien HEK 293T und A3 FADD def. (A) Je 10^5 HEK 293T Zellen wurden mit den Reporter-Plasmiden 3x- κ B-L und PGK Renilla, sowie den genannten Vektoren transfiziert und nach 24 Std. lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Der Anstieg der Aktivierung wurde relativ zur Leervektorkontrolle (1,0) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Expression der Flag-Proteine erfolgte in der Lysaten der Luziferase-Messung. Dazu wurden 10 μ l der Lysate in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-FADD-Antikörper, sowie anti-GAPDH-Antikörper als Ladungskontrolle und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper. (B) Schematische Darstellung von DD-FADD, DD-AHALL und DD-RHDA. (C) Je 10^6 A3 FADD def. DD-FADD Zellen wurden für 48 Std. mit den angegebenen Konzentrationen Shield-1 inkubiert. Die Zellen wurden in 1xSDS-Ladepuffer lysiert und 10 μ l der Lysate in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-FADD-Antikörper, sowie anti-GAPDH-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

allerdings nicht eindeutig sagen, ob sich die Destabilisierungsdomäne immer in dem gewünschten Maß auf die Stabilität des Proteins auswirken wird (Chu et al., 2008).

Der Vektor pCDH DD-FADD wurde im Rahmen einer Masterarbeit von Kathleen Gottschalk hergestellt. Die Varianten DD-AHALL und DD-RHDAA wurden davon ausgehend durch Punktmutagenese generiert. Mit Hilfe des lentiviralen Transduktionssystems (Kap. 4.2.3.6. - 4.2.3.7.) wurden anschließend die stabilen Zelllinien in Zusammenarbeit mit Kathleen Gottschalk hergestellt und selektioniert.

In Abb. 23 B ist eine schematische Darstellung von DD-FADD, DD-AHALL und DD-RHDAA gezeigt. Hier wurde die Destabilisierungsdomäne N-terminal fusioniert, da das für ein ähnliches FKBP-FADD Fusionsprotein bereits erfolgreich beschrieben wurde (Berghe et al., 2004). Für DD-FADD ist in Abb. 23 C gezeigt, dass die Proteinexpression abhängig von der Shield-1-Konzentration in der Western-Analyse detektierbar war. Der Vergleich zum endogenen Proteinniveau von FADD ergab, dass etwa bei 0,06 μM Shield-1 eine ähnliche Menge erreicht wurde (vgl. Abb. 24 E). Zum Teil wurde auch zusätzlich die Konzentration 0,5 μM Shield-1 eingesetzt. DD-AHALL und DD-RHDAA waren bereits ohne Shield-1 in der Western-Analyse nachweisbar, die Menge ließ sich allerdings durch Zugabe von Shield-1 weiter steigern. Daher wurden die Zellen zum Teil mit je 0,5 μM Shield-1 stimuliert. Die Expression der verschiedenen Proteine unter diesen Bedingungen ist in Abb. 24 E dargestellt.

Dass DD-FADD auch in der Lage war, endogenes FADD funktionell zu ersetzen, zeigte sich durch die Resensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose. In Abb. 24 ist die Apoptoseinduktion durch ILZ-TRAIL in den verschiedenen Zelllinien, gegebenenfalls mit und ohne Shield-1, dargestellt. Die parentale Zelllinie A3 induzierte massiv Apoptose, während die Zelllinie A3 FADD def. resistent gegenüber ILZ-TRAIL-induziertem Zelltod war (A). Wurde nun die transgene Linie A3 FADD def. DD-FADD mit ILZ-TRAIL stimuliert, zeigte sich eine steigende Apoptoserate abhängig von der Menge Shield-1 (B). Während ohne Shield-1 nur wenig Zelltod zu beobachten war, was mit der minimalen Proteinmenge von FADD in der Western-Analyse (E) korrelierte, stieg in Zellen mit 0,06 und vor allem 0,5 μM Shield-1 die Apoptoserate massiv an. Für DD-AHALL (C) und DD-RHDAA (D) zeigte sich auch in Anwesenheit von 0,5 μM Shield-1 keine Apoptoseinduktion durch ILZ-TRAIL. Wie die absoluten Werte der Apoptose zeigen, waren auch keine toxischen Effekte durch die Zugabe von Shield-1 zu beobachten, da die Apoptoserate mit und ohne Shield-1 in etwa gleich war. Somit bestätigte sich, dass DD-FADD in der Lage war, die Funktion von endogenem FADD im Signalweg der TRAIL-induzierten Apoptose einzunehmen, während DD-AHALL und DD-RHDAA, wie es für diese beiden Varianten beschrieben ist, funktionslos blieben. Die Destabilisierungsdomäne hatte zudem keinen störenden Effekt auf die Induktion von Apoptose durch FADD, weshalb die fehlende Funktion bei AHALL und RHDAA auf das

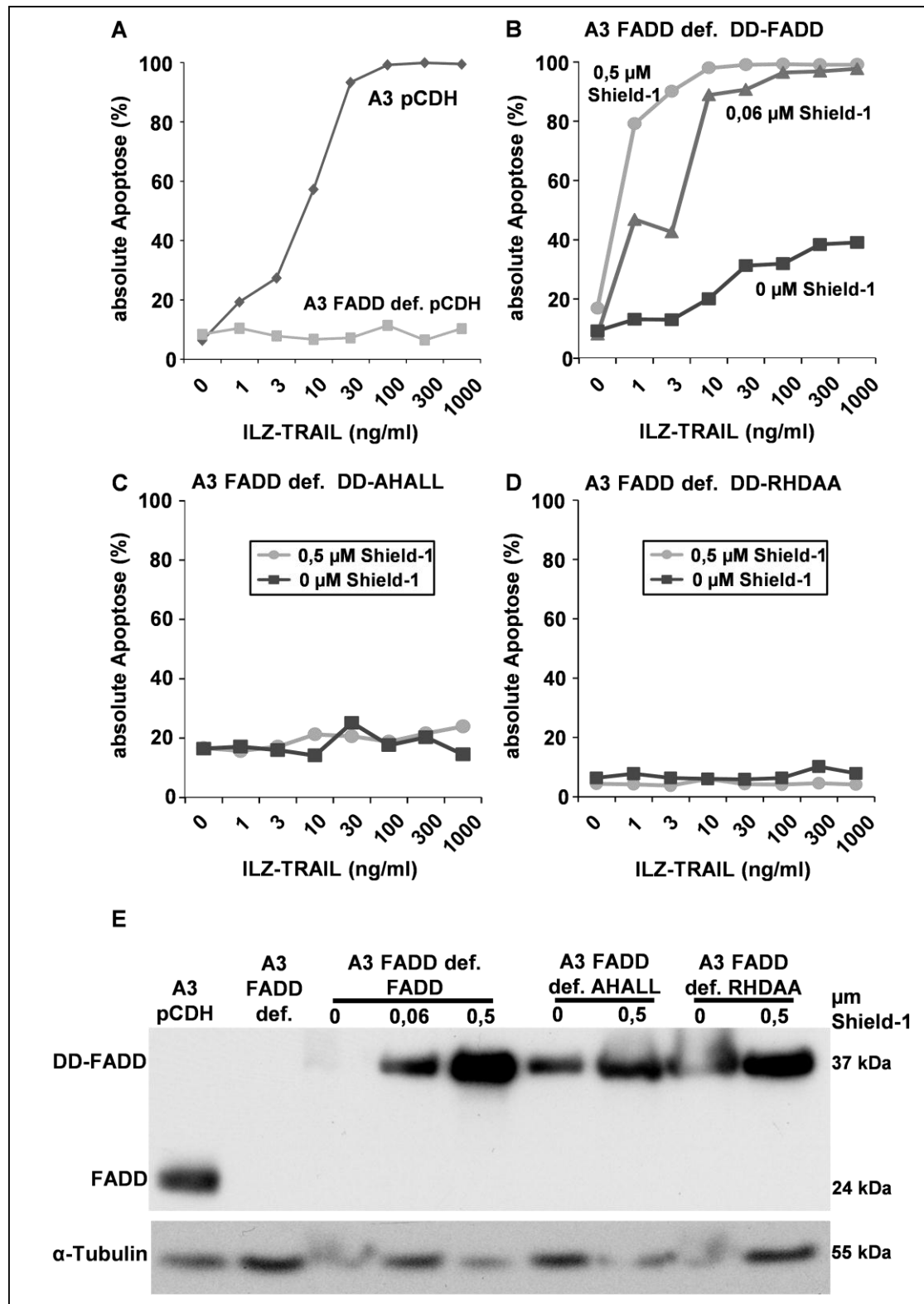


Abbildung 24: Apoptoseinduktion durch ILZ-TRAIL in A3 und A3 FADD def. (A) sowie den transgenen Zelllinien A3 FADD def. DD-FADD (B), A3 FADD def. DD-AHALL (C) und A3 FADD def. DD-RHDAA (D). Je $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden für 24 Stunden mit der angegebenen Konzentration Shield-1 vorbehandelt und anschließend für weitere 48 Stunden mit den genannten Konzentrationen ILZ-TRAIL stimuliert. Die Apoptoserate wurde mittels FSC/SSC-Analyse als Doppelwerte im Durchflusszytometer gemessen und ist als absolute Apoptoserate dargestellt. (E) Nachweis der FADD-Expression zum Zeitpunkt der Apoptosemessung. Die in A-D gemessenen Proben einer Messreihe wurden anschließend vereinigt und zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 μ l 1xSDS-Ladepuffer lysiert und davon 10 μ l in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-FADD-Antikörper, sowie anti-Tubulin-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

veränderte Motiv RHDLL zurückzuführen ist, da es die Bildung eines funktionellen DISC und wahrscheinlich die Rekrutierung von Caspase 8 verhindert.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DD-FADD den Defekt im Apoptose-Signalweg tatsächlich beheben konnte, wurde mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) die Aktivierung der NF- κ B Untereinheit p65 im Gesamtzelllysat bestimmt. Der ELISA ermöglicht eine sehr sensitive Detektion der Aktivierung von NF- κ B und ist für das induzierbare System besser anzuwenden, als die

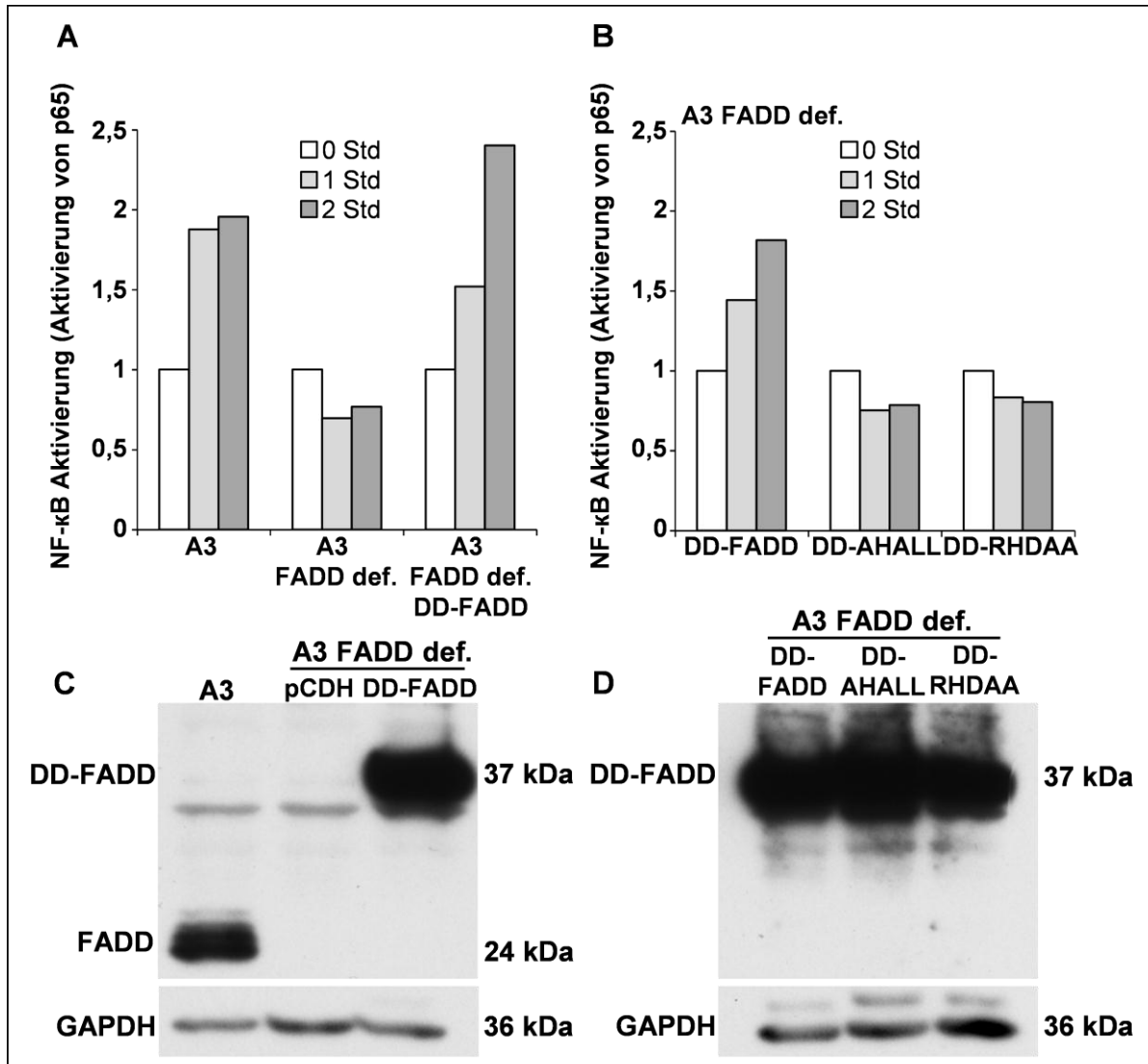


Abbildung 25: Nachweis der Aktivierung von NF- κ B p65 im ELISA. (A) Messung der Aktivierung von p65 in A3, A3 FADD def. und A3 FADD def. DD-FADD. Dargestellt ist ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten. A3 FADD def. DD-FADD wurden 24 Std. mit 0,06 μ M Shield-1 vorbehandelt. Je 2×10^6 Zellen der drei Zelllinien wurden für 0, 1 oder 2 Std. mit 1 μ g/ml ILZ-TRAIL stimuliert und geerntet. Die Lyse und der Nachweis von aktiviertem p65 im Gesamtzellextrakt erfolgte mit Hilfe des „TransAM NF- κ B p65“- Systems. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten und die Aktivierung wurde auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle (1,0) normalisiert (B) Messung der Aktivierung von p65 in A3 FADD def. Zellen rekonstituiert mit DD-FADD, DD-AHALL oder DD-RHDAA. Dargestellt ist ein repräsentatives von 2 unabhängigen Experimenten. Die Vorbehandlung mit Shield-1 erfolgte für 24 Std (DD-FADD: 0,06 μ M; DD-AHALL/DD-RHDAA: 0,5 μ M). Die Stimulation und Durchführung des ELISA erfolgte wie in A. (C/D) Nachweis der Expression von FADD und DD-Proteinen in ELISA-Lysaten der Messungen in A und B. Je 10 μ l der unstimulierten Kontrolle wurden mit 4xSDS-Ladepuffer versetzt und in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-FADD-Antikörper, sowie anti-GAPDH-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

Luziferase-Expression. Für den ELISA wird keine zusätzliche Transfektion benötigt, die mit der Vorinkubation mit Shield-1 zusammenfallen würde.

Im ELISA wird die Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors an die Konsensussequenz von NF- κ B mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen (vgl. Kap. 4.2.2.8.). In Abb. 25 A erkennt man, dass in A3 Zellen die Stimulation mit ILZ-TRAIL zu einem Anstieg der p65 Aktivierung führte, während in A3 FADD def. Zellen keine Veränderung stattfand. Nach Rekonstitution mit DD-FADD war dagegen wieder eine deutliche Aktivierung von p65 messbar. Damit konnte das Ergebnis der transienten Reexpression bestätigt werden: FADD ist essentiell für die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL.

Die Untersuchung der beiden FADD-Varianten AHALL und RHDA A im ELISA zeigte, dass beide die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL in der FADD defiziente Zelllinie nicht wiederherstellen konnten. In Abb. 25 B ist der Vergleich von DD-FADD zu DD-AHALL und DD-RHDA A dargestellt. Wie auch bei der Apoptoseinduktion waren weder Zellen die DD-AHALL noch DD-RHDA A exprimierten in der Lage, p65 vergleichbar mit DD-FADD zu aktivieren.

Der Nachweis der Expression des endogenen FADD bzw. der DD-Proteine in den Lysaten der ELISA-Messung in der Western-Analyse ist in Abb. 25 C und D zu sehen. Dabei wird erneut ersichtlich, dass A3 FADD def. Zellen tatsächlich kein endogenes FADD exprimierten. In den rekonstituierten Zelllinien ist dagegen die Expression der DD-Proteine nachweisbar. Obwohl dabei die Proteinmenge für die DD-Proteine sogar etwas höher war als die des endogenen FADD, konnte für die Proteine DD-AHALL und DD-RHDA A keine Aktivierung festgestellt werden.

In der Western-Analyse in Abb. 26 zeigten die A3 FADD def. DD-FADD Zellen (A) zudem eine deutliche Phosphorylierung von I κ B α , während in A3 FADD def. DD-AHALL Zellen (B) kein Anstieg des phosphorylierten Proteins zu beobachten war. Damit bestätigte sich die Beobachtung aus dem ELISA, dass DD-AHALL nicht, oder nur deutlich vermindert in der Lage war, NF- κ B nach Stimulation mit ILZ-TRAIL zu aktivieren.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die Expression von DD-FADD in A3 FADD def. den Defekt im Apoptose-Signalweg beheben konnte und auch die TRAIL-induzierte NF- κ B Aktivierung wiederherstellte. Damit bestätigte sich das Ergebnis der transienten Reexpression und führt damit zu dem Schluss, dass FADD sowohl das Adaptorprotein der TRAIL-induzierten Apoptose als auch der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B ist.

Die Untersuchung der beiden mutierten Proteine DD-AHALL und DD-RHDA A ergab, dass sie, wie auch in Bezug auf die Apoptoseinduktion, nicht in der Lage waren, das Signal weiterzugeben. Die Veränderung des konservierten Motivs RXDLL von FADD, das für die Selbstassoziiierung und Rekrutierung der Caspase 8 in den aktiven DISC notwendig ist,

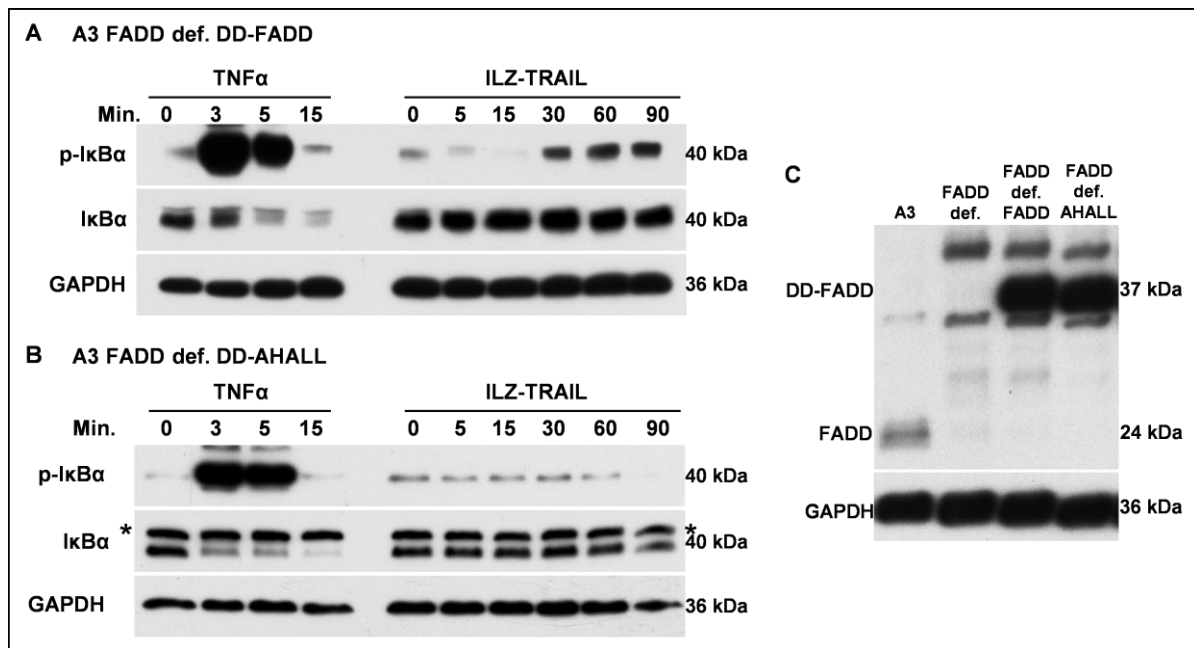


Abbildung 26: Nachweis der Phosphorylierung von IκBα in A3 FADD def. DD-FADD (A) und A3 FADD def. DD-AHALL (B). Je 2×10^6 Zellen wurden für 24 Std. mit je $0,5 \mu\text{M}$ Shield-1 vorbehandelt und anschließend für die angegebenen Zeiträume mit 300 ng/ml TNFα oder $1 \mu\text{g/ml}$ ILZ-TRAIL stimuliert und mit $100 \mu\text{l}$ Puffer Kern A lysiert. $10 \mu\text{l}$ jeder Probe wurden in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen p-IκBα und IκBα, sowie GAPDH als Ladungskontrolle und den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Detektion mit anti-IκBα-Antikörper zeigt eine unspezifische Bande, die mit * markiert ist. (C) Nachweis der FADD-Expression in Lysaten der jeweils unstimulierten Kontrollen der genannten Zelllinien, die in A und B, sowie Abb. 21, für den Nachweis der Phosphorylierung von IκBα verwendet wurden. Je $10 \mu\text{l}$ wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen FADD und GAPDH und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

verhinderte hier die Weitergabe des NF-κB Signals. Zudem aktivierten die beiden Proteine AHALL und RHDA in HEK 293T weniger NF-κB durch Überexpression als FADD. Die Oligomerisierung von FADD und möglicherweise die dadurch bedingte Rekrutierung von Caspase 8, scheint somit auch für die NF-κB Aktivierung ein essentieller Schritt zu sein.

5.4. Mögliche Rolle von Caspase 8 im NF-κB-Signalweg

Nachdem FADD als das Adaptorprotein der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF-κB identifiziert wurde, stellte sich die Frage nach dem nächsten Schritt in der Signalkette. Caspase 8 ist dabei ein bekannter Interaktionspartner von FADD am TRAIL-Rezeptor im Apoptosesignalweg. Wie die Untersuchung der FADD-Varianten AHALL und RHDA zeigte, spielt auch die Todeseffektordomäne, von der bekannt ist, dass sie die Bindung zu Caspase 8 vermittelt, eine wichtige Rolle bei der Übermittlung des NF-κB Signals. Für CD95 wurde desweiteren gezeigt, dass RHDA nicht in der Lage ist, Caspase 8 in den DISC zu rekrutieren (Muppidi et al., 2006). Daher stellte sich die Frage, ob auch Caspase 8, wie FADD, eine duale Rolle in den beiden Signalwegen einnimmt und ebenfalls an der Aktivierung von NF-κB beteiligt ist.

5.4.1. Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung in HEK 293T von Caspase 8

Einen ersten Hinweis darauf gab, ebenso wie bei FADD, die Beobachtung, dass Caspase 8 bei Überexpression in HEK 293T Zellen in der Lage ist, NF- κ B zu aktivieren (Chaudhary et al., 2000).

Für die Untersuchung der Caspase 8 wurde auch die katalytisch inaktive Caspase 8 C360S mit Hilfe einer Punktmutagenese hergestellt. Sie ist ebenso wie Caspase 8 in der Lage, durch Überexpression NF- κ B in HEK 293T zu aktivieren, was auch durch den Einsatz von Caspaseinhibitoren nicht beeinflusst wurde (Chaudhary et al., 2000). Bei der Überexpression von LMP1-TR2 in Gegenwart eines Caspaseinhibitors konnte allerdings eine Verminderung der NF- κ B-Aktivierung festgestellt werden, weshalb auch die Caspase 8 C360S untersucht werden sollte (Daten nicht gezeigt). Dazu wurde durch einen Basenaustausch das Kodon, das das Cystein 360 im aktiven Zentrum der Caspase kodiert, so verändert, dass ein Serin kodiert wurde. Damit konnte die autokatalytische Aktivierung von Caspase 8 nicht mehr stattfinden (Wang et al., 2001). Die Caspase 8 C360S ermöglicht auf diese Weise festzustellen, ob die proteolytische Aktivität der Caspase eine Rolle bei der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TRAIL spielt.

Abb. 27 zeigt, dass nach Überexpression von Caspase 8, wie erwartet eine deutliche Aktivierung von NF- κ B messbar war. Auch die katalytisch inaktive Caspase 8 C360S zeigte eine fast ebenso starke Aktivierung von NF- κ B, wie die aktive Caspase. Da die Zellen aber endogene Caspase 8 besitzen, erlaubt das alleine noch keine Aussage über die Notwendigkeit der katalytischen Aktivität. Möglicherweise fungierte die inaktive Caspase, ähnlich wie es für FLIP_L beschrieben ist, als Gerüst für die Aktivierung der endogenen Caspase 8

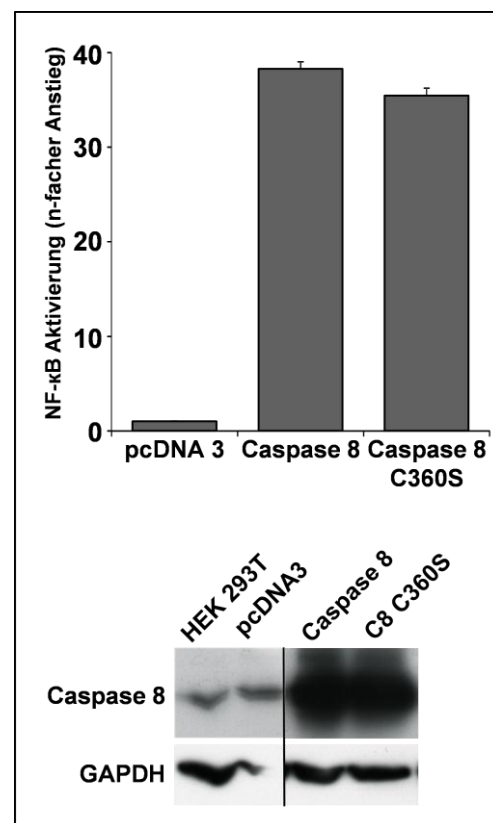


Abbildung 27: Überexpression von Caspase 8 in HEK 293T aktiviert NF- κ B. Je 10^5 HEK 293T Zellen wurden mit den Reporter-Plasmiden 3x- κ B-L und PGK Renilla, sowie den genannten Vektoren transfiziert und nach 24 Std. lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Der Anstieg der Aktivierung wurde relativ zum Leervektor pcDNA3 (1,0) berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von 5 unabhängigen Experimenten. Der Nachweis der Expression von Caspase 8 erfolgte in den Lysaten der Luziferase-Messung. Dazu wurden 10 μ l der Lysate in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-Caspase 8-Antikörper, sowie anti-GAPDH-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

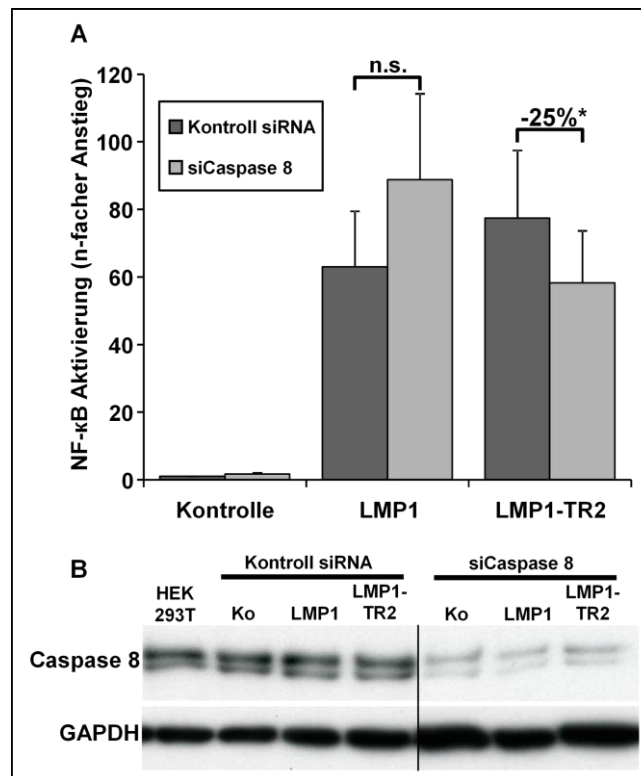


Abbildung 28: Verminderte Expression von Caspase 8 reduziert die NF-κB Aktivierung durch LMP1-TR2.

(A) Je $0,5 \times 10^5$ HEK 293T-Zellen wurden in eine 24-Loch-Platte ausgesät und nach 24 und 48 Std. repetitiv mit 150 pmol der siRNA gegen Caspase 8 (siCaspase 8) oder Kontroll siRNA transfiziert. Nach 72 Std. wurden die Zellen mit 3x-κB-L und PGK-Renilla, sowie inerte DNA, LMP1 oder LMP1-TR2 transfiziert und schließlich nach 96 Std. lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Die Normalisierung erfolgte auf das NF-κB-Niveau der Kontrolle, transfiziert mit Kontroll siRNA und inerte DNA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten, gemessen in Doppelwerten. Statistische Signifikanz (*) wurde mit zweiseitigem, gepaarten t-Test ermittelt ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant. (B) Der Nachweis der verminderten Expression von Caspase 8 erfolgte in den Lysaten der Luciferase-Messung, hier exemplarisch für eine Messung dargestellt. Dazu wurden je 10 µl der Lysate der einzelnen Proben in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit anti-Caspase 8-Antikörper, sowie anti-GAPDH-Antikörper und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

(Chang et al., 2002).

Die Überexpressionsdaten alleine lassen jedoch noch keinen Rückschluss auf den TRAIL-Signalweg zu, weshalb wie zuvor für FADD, der Einfluss einer verminderten Caspase 8 Expression auf die NF-κB Aktivierung durch LMP1-TR2 getestet wurde.

Im transienten System unter Verwendung einer siRNA gegen Caspase 8 konnte eine signifikante Verringerung der NF-κB Aktivierung durch LMP1-TR2 um ca. 25% beobachtet werden (Abb. 28 A). Die Inhibition mit siRNA war allerdings unvollständig, so dass weiterhin Caspase 8 in der Western-Analyse nachweisbar war, wenn auch deutlich weniger (Abb. 28 B).

Um die Caspase 8 stärker hemmen zu können, wurden zwei lentivirale Plasmide hergestellt, die jeweils unterschiedliche Sequenzen einer „small hairpin“ RNA (shRNA) gegen Caspase 8 enthielten, die genaue Herstellung ist in Kap. 4.2.1.5. beschrieben. Sie ermöglichen eine stabile Integration der shRNA-Sequenz ins Genom der Zielzelle. Die shRNA wird dadurch

stabil in der Zelle transkribiert und bildet eine Haarnadelstruktur aus. Diese wird von DICER zu funktioneller siRNA prozessiert und auf den RISC Komplex geladen, der wiederum für die Degradation der Ziel-mRNA verantwortlich ist.

Mit Hilfe dieser Vektoren gelang es Kathleen Gottschalk im Rahmen ihrer Masterarbeit zu zeigen, dass die NF- κ B-Aktivierung durch LMP1-TR2 auch durch den Einsatz dieser shRNA gegen Caspase 8 in HEK 293T-Zellen ebenfalls signifikant um rund 30% verringert werden konnte (Gottschalk, 2010).

Somit wurde in HEK 293T auch für Caspase 8 ein deutlicher Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B beobachtet. Die Überexpression der Caspase führte zu einer deutlichen Aktivierung von NF- κ B, während sowohl die transiente als auch stabile Verminderung der Expression von Caspase 8 die Aktivierung von NF- κ B durch LMP1-TR2 signifikant verringern konnte. Diese Beobachtung deutete wiederum auf einen direkten Einfluss auf den TRAIL-Signalweg hin.

5.4.2. Fehlende Aktivierung von NF- κ B in Caspase 8 defizienten Zellen

Neben der in Kapitel 5.3.2. verwendeten Zelllinie A3 FADD def. ist im Rahmen desselben Versuchs auch eine Caspase 8 defiziente Zelllinie entstanden. Genauere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Zelllinie eine Mutation trägt, die zu einer Verschiebung des Leserahmens der codierenden Sequenz von Caspase 8 führte und damit ein instabiles, verkürztes Protein entstand. Da dessen Nachweis nur bei in vitro translatiertem Protein gelang, ging man davon aus, dass es in der Zelle instabil war (Juo et al., 1998).

Die Zelllinie wurde wie zuvor die A3 FADD def. auf TRAIL-induzierte NF- κ B Aktivierung untersucht. In der Western-Analyse konnte dabei keine Phosphorylierung von I κ B α nachgewiesen werden (vgl. Abb. 29 A). Zur Verifizierung wurde der Nachweis der Reportergenexpression nach Stimulation mit ILZ-TRAIL durchgeführt und auch hier zeigte sich keine Aktivierung von NF- κ B durch ILZ-TRAIL in der Caspase 8 defizienten Zelllinie (vgl. Abb. 29 B). Die Positivkontrolle TNF α dagegen war in beiden Methoden in der Lage NF- κ B zu aktivieren, also I κ B α zu phosphorylieren bzw. die Luziferaseaktivität zu steigern (vgl. Abb. 29). Abb. 29 C zeigt, dass in der Western-Analyse kein Caspase 8-Protein in der defizienten Zelllinie nachweisbar war. Eine transiente Reexpression von Caspase 8 wie für FADD war jedoch nicht erfolgreich. Nach Nukleofektion waren in der Western-Analyse nur minimalste Mengen an Caspase 8 nachweisbar (Daten nicht gezeigt), so dass für weitere Versuche, wie im Kapitel 4.2.3.8 beschrieben, das „Proteo Tuning“ System für eine stabile induzierbare Expression der Caspase 8 verwendet wurde.

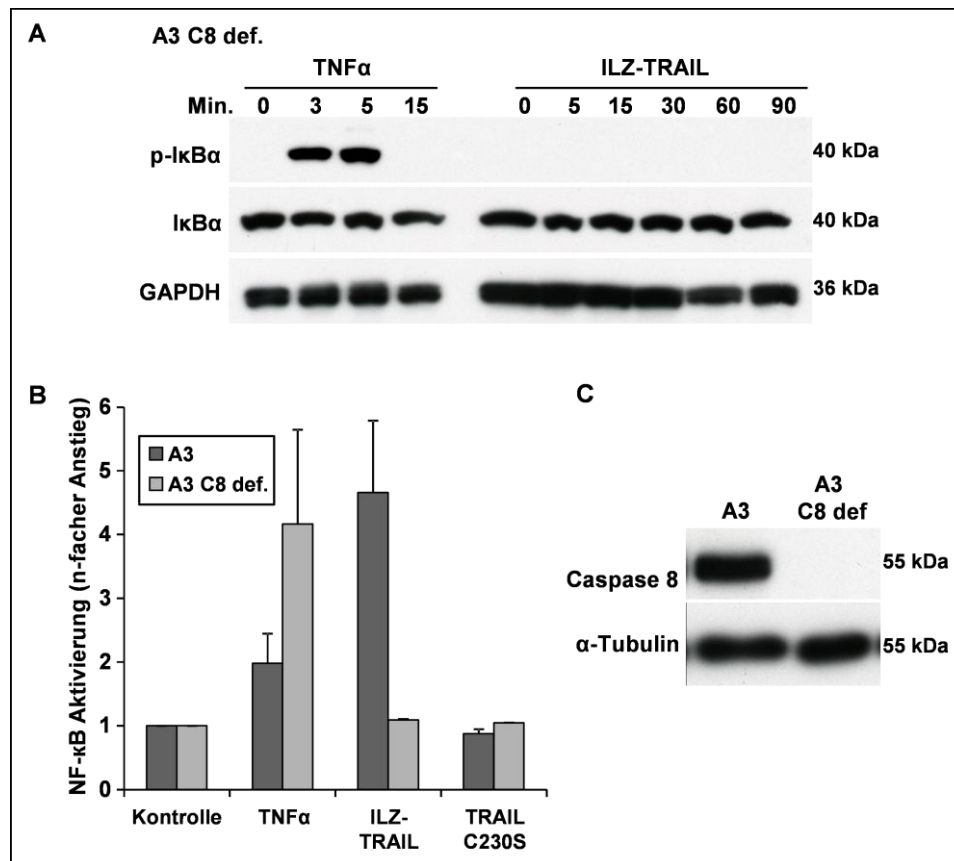


Abbildung 29: Caspase 8 defiziente A3-Zellen sind nicht in der Lage auf TRAIL NF-κB zu aktivieren. (A) Phosphorylierung von IκBα nach Stimulation mit ILZ-TRAIL. Je 2×10^6 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 300 ng/ml TNFα oder 1 µg/ml ILZ-TRAIL stimuliert und mit 100 µl Puffer Kern A lysiert. 10 µl jeder Probe wurden in einem 12% SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen p-IκBα und IκBα, sowie GAPDH als Ladungskontrolle und den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern. (B) Luziferase-Aktivierung nach Stimulation mit ILZ-TRAIL. Je 4×10^6 Zellen der Zelllinien A3 und A3 C8 def. wurden mit inerte DNA, 3x-κB-L und PGK-Renilla transfiziert. Die Inkubation nach der Transfektion erfolgte in Gegenwart von 5 µM Caspaseinhibitor qVD-OPH. 24 Std. nach Transfektion erfolgte die Stimulation von je 1×10^6 transfizierten Zellen mit 300 ng/ml TNFα, 1 µg/ml ILZ-TRAIL oder 1 µg/ml TRAIL C230S. 1×10^6 Zellen blieben unstimuliert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Lyse und Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des „Dual Luciferase Assay“-Systems. Der Anstieg der NF-κB Aktivierung wurde auf den Wert der unstimulierten Zellen normalisiert (1,0). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von 2 unabhängigen Experimenten gemessen in Doppelwerten. (C) Nachweis der Expression von Caspase 8 in A3 und A3 Caspase 8 def. in den Lysaten der Luziferase-Messung. Dazu wurden je 10 µl der Lysate der unstimulierten Kontrolle in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase 8, sowie α-Tubulin und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

Die Untersuchung der Caspase 8 defizienten Zelllinie ergab folglich, dass sie im Gegensatz zu ihrer parentalen Zelllinie A3 nicht in der Lage war, NF-κB durch TRAIL zu aktivieren. Somit liegt in der Zelllinie ein Defekt vor, der nicht nur TRAIL-induzierte Apoptose sondern auch die Aktivierung von NF-κB verhinderte.

Auf Grund der Tatsache, dass es sich um eine mutagenisierte Zelllinie handelt, wäre auch hier eine Wiederherstellung des Signalweges durch Reexpression von Caspase 8 hilfreich, um sicher zu gehen, dass allein Caspase 8 für den Defekt im Apoptose-, wie auch NF-κB-Signalweg verantwortlich ist. So könnte man eindeutig die Beteiligung von Caspase 8 am NF-κB-Signalweg beweisen, auch wenn es bisher schon deutliche Hinweise darauf gibt.

5.4.3. Stabile induzierbare Reexpression in Caspase 8 defizienten Zellen

Da die Expression der proapoptotischen Caspase 8 im transienten System nicht erfolgreich war, wurde eine stabile, induzierbare Expression notwendig. Dazu wurde wie zuvor, das „Proteo Tuning“ System in Kombination mit lentiviraler Transduktion verwendet.

Der Vektor pCDH DD-Caspase 8 war im Rahmen der Masterarbeit von Kathleen Gottschalk entstanden. Er wurde verwendet um hier zusätzlich die katalytisch inaktive Caspase 8 C360S durch Punktmutagenese herzustellen (vgl. Abb. 31 A).

Die Destabilisierungsdomäne soll die beiden Proteine induzierbar machen, so dass die Selektion der transgenen Zellen durch Puromycin zunächst ohne Expression der proapoptotischen Caspase 8 möglich ist. Die katalytisch inaktive Caspase 8 C360S soll zudem zeigen, ob eine eventuelle Rolle der Caspase 8 abhängig von ihrer proteolytischen Aktivität ist.

Für die Reexpression wurde die Caspase 8 defiziente JURKAT-Zelllinie A3 C8 def. verwendet, die wie gezeigt werden konnte, nicht in der Lage war, NF- κ B durch TRAIL zu aktivieren. Die Expression von Caspase 8, Caspase 10 und FADD in dieser Zelllinie, sowie in A3 und A3 FADD def., ist in Abb. 30 dargestellt. Da A3 C8 def. Zellen einer chemischen Mutagenese und anschließender Selektion unterzogen wurden, die sie resistent gemacht hatten gegen FasL- bzw. TRAIL-induzierte Apoptose, besteht auch hier die Möglichkeit zusätzlicher Mutationen im Signalweg, was durch die Durchführung eines Rekonstitutions-experimentes ausgeschlossen werden sollte.

Die Herstellung der im Folgenden verwendeten transgenen Zelllinien A3 pCDH, A3 C8 def. pCDH,

A3 C8 def. DD-C8 und A3 C8 def. DD-C8 C360S ist an anderer Stelle beschrieben (Gottschalk, 2010). Diese Zelllinien wurden nun zunächst eingesetzt um die Induzierbarkeit der DD-Proteine zu untersuchen. Abb. 31 B zeigt, dass bereits vor Zugabe von Shield-1 die DD-Caspase 8 in den Zellen nachweisbar war und bei steigender Shield-1-Konzentration unverändert blieb. Für DD-Caspase 8 C360S dagegen stieg die Proteinmenge mit der Shield-1-Konzentration an, auch wenn eine gewisse basale Expression zu sehen war (vgl. Abb. 31 C). In diesem Fall war es somit nur zum Teil möglich, die Proteine durch die Destabilisierungsdomäne zu regulieren.

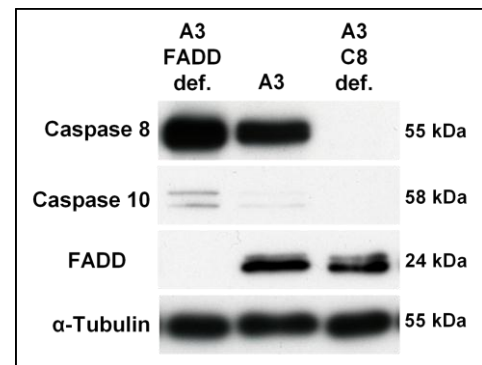


Abbildung 30: Expression von Caspase 8 und 10, sowie FADD in den verwendeten Zelllinien. Je 10^6 Zellen wurden in 100 μ l 1xSDS-Ladepuffer lysiert und 10 μ l der Lysate in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase 8, Caspase 10, FADD, sowie α -Tubulin und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

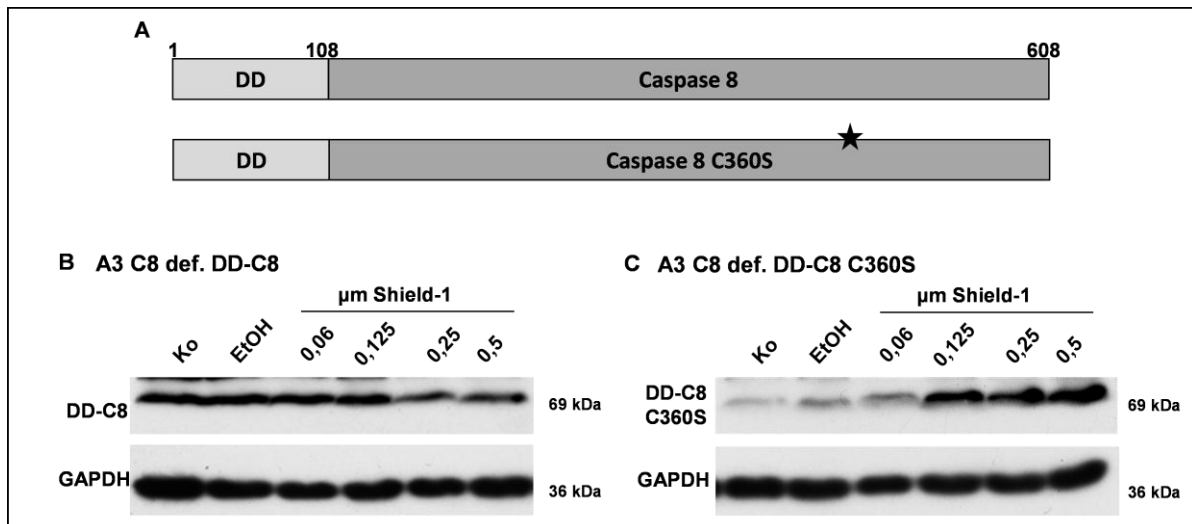


Abbildung 31: Stabile Reexpression von DD-Caspase 8 in A3 Caspase 8 def. (A) Schematische Darstellung der DD-Caspase 8, sowie der katalytisch inaktiven Caspase 8 C360S (★ symbolisiert das C360S). (B-C) Expression von DD-Caspase 8 (B) und DD-Caspase 8 C360S (C) nach Zugabe von steigenden Konzentrationen Shield-1. Je 10^6 Zellen wurden mit den genannten Konzentrationen Shield-1 bzw. Ethanol für 48 Std. stimuliert oder blieben unbehandelt und wurden anschließend in 100 µl 1xSDS-Ladepuffer lysiert. Je 10 µl des Lysates wurden in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase 8, sowie GAPDH und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

Da sie jedoch in den Zellen produziert wurden, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dabei wurde zunächst die durch TRAIL-induzierte Apoptose in den transgenen Zelllinien A3 pCDH, A3 C8 def. pCDH, A3 C8 def. DD-C8 und A3 C8 def. DD-C8 C360S untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression der DD-Caspase 8 nicht in der Lage war, den Signalweg der TRAIL-induzierten Apoptose wieder zu aktivieren. Die Zellen zeigten nur geringe Apoptosesensitivität unabhängig davon, ob sie mit Leervektor, DD-Caspase 8 oder DD-Caspase 8 C360S transduziert wurden (Abb. 32 A). Die Proteine DD-Caspase 8 und DD-Caspase 8 C360S wurden dabei jedoch exprimiert, wie in Abb. 32 B zu sehen ist.

Es war somit gezeigt worden, dass die stabilen derivativen Zelllinien der Caspase 8 defizienten A3 die DD-Caspase 8 und DD-Caspase 8 C360S zwar exprimierten, allerdings war die Expression der DD-Caspase 8 dabei konstitutiv und nicht induzierbar. Die DD-Caspase 8 war zudem nicht in der Lage, die Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren. Möglicherweise behindert die DD die Funktionalität der Caspase 8, da eine gewisse Apoptosesensitivität gegenüber hoher Konzentrationen von TRAIL vorlag und diese möglicherweise auf minimale Restmengen von Caspase 10 zurückzuführen war. Eine direkte Mutation im Apoptosesignalweg der A3 Caspase 8 def. Zellen ist daher eher unwahrscheinlich (Kischkel et al., 2001). Zudem wurde die gleiche Zelllinie von Lafont et al. mit einem GFP-Caspase 8 Fusionsprotein transfiziert und die Induktion von Apoptose durch FasL erfolgreich rekonstituiert. Allerdings wurden die Zellen dabei transient transfiziert, so dass auch der Effekt nur jeweils die transfizierten Zellen, die hier weniger als 10% der Gesamtzellen ausmachten, betraf (Lafont et al., 2010). Für den Nachweis der NF-κB

Aktivierung im ELISA oder auch in der Western-Analyse eignet sich daher diese Methode nicht, da transient zum einen die Zellzahl limitierend ist und zum anderen keine Selektion der transfizierten Zellen möglich ist. Sie wäre auf Grund der kleinen Effekte aber unbedingt notwendig.

Da für diese Zelllinie also prinzipiell die Rekonstitution mit einer anderen rekombinanten Caspase 8 erfolgreich war, deutet das darauf hin, dass die DD-Caspase 8 nicht in der Lage war, die Funktion von Wildtyp-Caspase 8 zu ersetzen. Möglicherweise interferiert die N-terminale Destabilisierungsdomäne mit der Bindung an den Rezeptor. Daher sollte für weitere Versuche eine andere Form der Induktion, wie etwa ein induzierbarer Promotor oder evtl. eine C-terminale DD, gewählt werden.

Interessant wäre an dieser Stelle auch die Untersuchung von Caspase 10, da sie wahrscheinlich die verbleibende Sensitivität der Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose verursacht und daher scheinbar die Funktion von Caspase 8 einnehmen kann. Diese Redundanz von Caspase 8 und 10 könnte auch für den NF- κ B-Signalweg eine Rolle spielen.

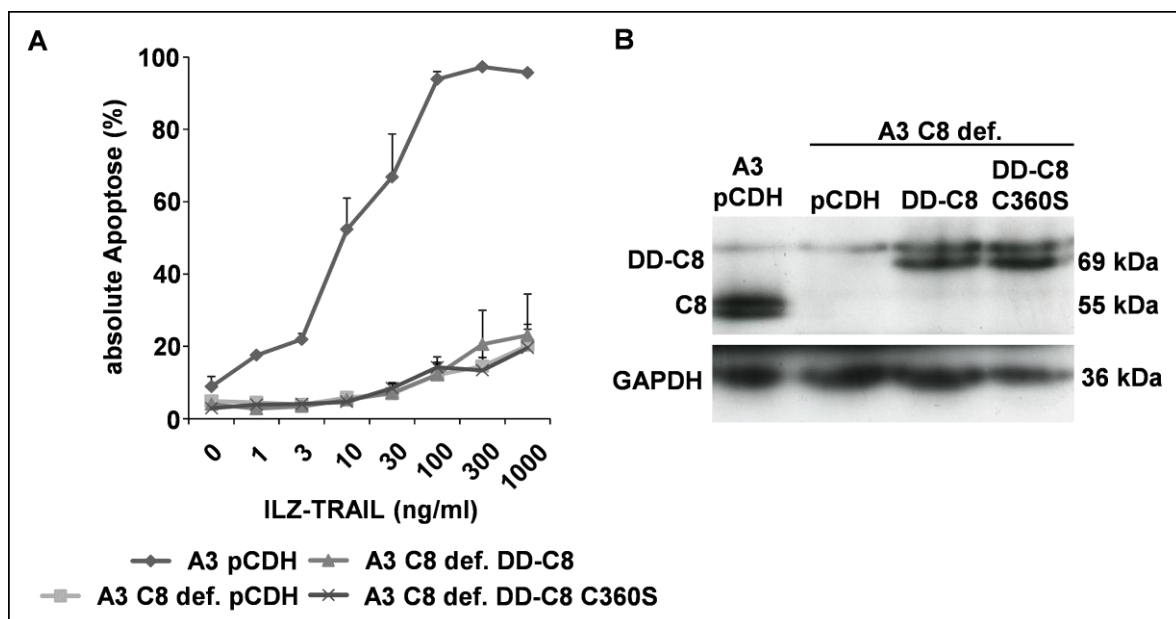


Abbildung 32: Apoptoseinduktion durch ILZ-TRAIL in A3 und A3 Caspase 8 def. Zellen, transduziert mit Leervektor pCDH, DD-Caspase 8 oder DD-Caspase 8 C360S. (A) Je $0,5 \times 10^5$ Zellen wurden für 24 Stunden mit $0,5 \mu\text{M}$ Shield-1 inkubiert, A3 pCDH und A3 C8 def. pCDH blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit den genannten Konzentrationen ILZ-TRAIL stimuliert. Die Apoptoserate wurde mittels FSC/SSC-Analyse als Doppelwerte im Durchflusszytometer gemessen und ist als Mittelwert mit Standardfehler von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Nachweis der Caspase 8-Expression zum Zeitpunkt der Apoptosemessung. Die in einem Experiment aus A gemessenen Proben einer Messreihe wurden vereinigt und zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in $100 \mu\text{l}$ 1xSDS-Ladepuffer lysiert und davon $10 \mu\text{l}$ in einem 12%-igen SDS-Gel parallel zu einem Größenstandard aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Caspase 8, sowie GAPDH und HRP-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den rezeptornahen Signalweg der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B zu charakterisieren und daran beteiligte Proteine zu identifizieren.

Es gelang, FADD als Adaptorprotein der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B zu identifizieren und eine mögliche Rolle von Caspase 8 im Signalweg aufzuzeigen. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Signalwege von Apoptose und NF- κ B nach Aktivierung durch TRAIL in den rezeptornahen Signalschritten gleichen.

In den folgenden Kapiteln werden die Vor- und Nachteile der Produktion von rekombinantem TRAIL und speziell des ILZ-TRAIL erläutert und die Experimente diskutiert, die zunächst die Abhängigkeit des Signals von der Todesdomäne zeigten und später zu FADD als Adaptorprotein führten. Auch die Rolle eines konservierten Motivs der Todeseffektordomäne von FADD bei der Weiterleitung des NF- κ B Signals wird im Folgenden erläutert.

Zudem werden die Untersuchungen diskutiert, die auf einen Einfluss von Caspase 8 auf die TRAIL-induzierte Aktivierung von NF- κ B hindeuteten.

6.1. Effiziente Methode der Gewinnung von rekombinantem humanen TRAIL in *E. coli*

Für die Untersuchung des Signalweges in unterschiedlichen Zelllinien bietet der Einsatz des Liganden zunächst die beste Möglichkeit, da er in der Regel ohne Optimierung auf den Zelllinien eingesetzt werden kann. Um aber ein möglichst hochaktives TRAIL verwenden zu können, wurde eine optimierte Variante mit Isoleucin Zipper ausgewählt, die zuvor von Walczak et al. beschreiben wurde (Walczak et al., 1997). Da diese spezielle Form nicht kommerziell angeboten wird, wurde ein bakterielles Expressionssystem für die Herstellung verwendet. Walczak et al. benutzten ursprünglich CHO Zellen für die Gewinnung des ILZ-TRAIL, was eine sehr aufwändige und kostenintensive Verfahren darstellt. Die später von Ashkenazi et al. und Ganten et al. verwendete bakterielle Expression von HA-TRAIL, bzw. ILZ-TRAIL in 10 oder 100 Liter Fermentern und anschließende native Aufreinigung des Proteins über Hydroxiapatit und Nickel-NTA Säulen war ebenfalls noch sehr aufwändig (Ashkenazi et al., 1999; Ganten, 2006).

Die Tatsache, dass angefügte Epitope und besonders der Isoleucin Zipper, die Löslichkeit des jeweiligen Proteins in *E. coli* zusätzlich verschlechterten, führte zu der Entscheidung, dass eine Extraktion unter denaturierenden Bedingungen die beste Möglichkeit darstellt. Kang et al. und Gasparian et al. beschrieben zuvor die erfolgreiche Renaturierung von TRAIL, das ebenfalls aus *E. coli* Einschlusskörperchen gewonnen wurde (Gasparian et al., 2007; Kang et al., 2007). Der anfängliche Nachteil der geringen Löslichkeit der TRAIL Proteine stellte sich somit als eigentlicher Vorteil heraus. Durch die direkte Reinigung der Einschlusskörperchen vor Zugabe von Harnstoff, wurden sehr effizient zelluläre bakterielle

Proteine entfernt, was auf diese Weise eine zusätzliche affinitätschromatographische Reinigung überflüssig machte. Durch dieses Vorgehen war es möglich, eine sehr hohe Proteinausbeute zu erzielen.

Die Renaturierung durch Verdünnung war schließlich in der Lage, die Aktivität von HA-TRAIL und ILZ-TRAIL wiederherzustellen. Neben der Induktion von Apoptose wurde auch die Aktivierung von NF- κ B durch die Proteinvarianten getestet. Auch hier zeigte sich das deutlich höhere Potential der Aktivierung beider Signalwege durch ILZ-TRAIL (vgl. Abb. 14 und 15). In sehr sensitiven JURKAT-Zellen war renaturiertes ILZ-TRAIL sogar in Konzentrationen im einstelligen Nanogramm Bereich hochwirksam. Bei 3 ng/ml konnten mehr als 35% spezifische Apoptose erreicht werden, bei 10 ng/ml waren bereits fast 80% Zelltod messbar (Daten nicht gezeigt). Es konnte zwar kein direkter Vergleich durchgeführt werden, aber das renaturierte ILZ-TRAIL scheint auch dem in CHO Zellen produzierten ILZ-TRAIL vergleichbar zu sein. Walczak et al. erreichten bei 4 ng/ml etwa eine Apoptoserate von 40%, wobei natürlich Abweichungen durch die Sensitivität der Zelllinien und die Messmethode zu berücksichtigen sind (Walczak et al., 1997).

Der Isoleucin Zipper war zudem in der Lage, die Mutation des Cystein 230 und die dadurch verhinderte cysteinvermittelte Trimerisierung zum Teil zu überwinden und dadurch beide Signalwege moderat zu aktivieren. Aus diesem Grund wurde die Variante His-HA-ILZ-TRAIL C230S nicht als Kontrollprotein eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

Die LPS-Bestimmung einer Proteinpräparation und die Versuche mit TRAIL C230S auf JURKAT-Zellen zeigten, dass es sich nicht um ein Artefakt durch LPS-vermittelte NF- κ B Aktivierung durch Toll-like Rezeptoren handelte (Wong et al., 2007). Da HEK 293T nicht durch LPS über Toll-like Rezeptoren NF- κ B aktivieren können, diente hier die Verwendung des TRAIL C230S als Kontrolle für eventuelle weitere Kontaminationen durch bakterielle Proteine (Medvedev et al., 2007).

Das trimerisierungsdefiziente TRAIL C230S in HEK 293T zeigte gleichzeitig, dass tatsächlich die Bildung des Trimers auch für die NF- κ B Aktivierung notwendig war. Monomeres TRAIL war somit weder in der Lage Apoptose noch NF- κ B zu induzieren. Der Nachweis von HA-TRAIL und TRAIL C230S in Lysaten stimulierter Zellen konnte zeigen, dass TRAIL C230S auch nur minimal an die Zellen gebunden wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Methode der TRAIL-Herstellung ließ sich auf alle in Abb. 8 dargestellten Varianten anwenden, die zum Teil für andere Fragestellungen zum Einsatz kamen und daher an dieser Stelle nicht im Detail besprochen werden. Somit scheint die Reinigung aus Einschlusskörperchen mit anschließender Renaturierung für TRAIL universell einsetzbar zu sein.

6.2. Todesdomänen von TR1 und TR2 vermitteln die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL

Die Stimulation mit dem Liganden ist einerseits sehr vielseitig einsetzbar, hat aber andererseits den Nachteil, dass keine Unterscheidung gemacht werden kann, welche der TRAIL-Rezeptoren involviert sind. Zudem besteht auch für die beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 die Möglichkeit der Bildung von Heteromultimeren, so dass hier keine klare Abgrenzung zwischen den beiden Rezeptoren möglich ist.

Zu diesem Zweck wurden die konstitutiv aktiven Fusionsproteine der beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 kloniert, die aus dem Transmembranbereich von LMP1 und der intrazellulären Signaldomäne jeweils eines TRAIL-Rezeptors bestehen. Wechselwirkungen mit endogenen TRAIL-Rezeptoren sind damit unwahrscheinlich, weshalb die gemessene Aktivierung immer das Signal des einen Fusionsrezeptors repräsentiert. Bei den ebenfalls hergestellten Rezeptoren HA-TR1 und HA-TR2 besteht im Gegenzug die Möglichkeit der Bildung von Multimeren mit endogenen Proteinen, so dass hier die Fusionsproteine das eindeutigere System darstellen.

Ihr proapoptotisches Potential wurde nach einer von Schneider et al. publizierten, leicht abgewandelten Methode in TRAIL sensitiven SHEP Zellen untersucht (Schneider & Kieser, 2004). Hohe Expressionsniveaus der Proteine LMP1-TR1 und LMP1-TR2, wie auch in geringerem Maße LMP1-TNFR1, wirkten sich dabei negativ auf die Rate der lebenden transfizierten Zellen aus, wie erwartet in Anhängigkeit von den Todesdomänen der Rezeptoren (vgl. Abb. 18). Für den Apoptosesignalweg ist die Relevanz der Todesdomäne für alle drei genannten Rezeptoren bekannt. Im Gegenzug zeigten TRAIL-resistente HEK 293T Zellen bei keinem der überexprimierten Proteine einen solchen proapoptotischen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Die Expression der Fusionsrezeptoren in HEK 293T führte dagegen zu einer starken Aktivierung von NF- κ B (vgl. Abb. 20), die sogar über das Niveau des Fusionsproteins des TNFR1 hinausging und vergleichbar war mit LMP1. LMP1-TR1 zeigte dabei eine ähnlich starke Aktivierung wie LMP1-TR2, während die Überexpression der Wildtyp-Rezeptoren für TRAIL-Rezeptor 1 eine deutlich geringere Aktivierung als für TRAIL-Rezeptor 2 induzierte. Ein ähnlicher Unterschied wurde auch von Tang et al. beobachtet und kommt möglicherweise der Situation in vivo näher als die hochaktiven Fusionsproteine (Tang et al., 2009).

Für die beiden Fusionsproteine und die beiden Wildtyp-Proteine war die NF- κ B-Aktivierung abhängig von der Anwesenheit des C-Terminus mit der Todesdomäne. Hinweise darauf, dass die 20 bzw. 18 C-terminalen Aminosäuren nach der Todesdomäne eine Funktion besitzen sind bisher nicht bekannt, weshalb der Effekt auf das Fehlen der Todesdomäne zurückzuführen sein dürfte.

Da beide in Abhängigkeit von der Todesdomäne NF- κ B aktivieren und eine starke Homologie der Todesdomänen von fast 60% aufweisen, liegt es nahe, dass beide TRAIL-Rezeptoren den Signalweg auf gleiche Weise aktivieren.

In unterschiedlichen Zelllinien und möglicherweise abhängig von der Herkunft der Zellen sind allerdings Unterschiede in der Bedeutung der jeweiligen TRAIL-Rezeptoren gezeigt worden (Kurbanov et al., 2007; van Geelen et al., 2011). In manchen Zelllinien bereits durch die Tatsache, dass nur einer der beiden Rezeptoren exprimiert wird.

Für TNFR1 ist ebenfalls bekannt, dass die Aktivierung von NF- κ B, wie auch die Induktion von Apoptose, abhängig von der Todesdomäne ist, da sie über TRADD RIP und TRAF2 bindet, die wiederum die Aktivierung von NF- κ B ermöglichen (Hsu et al., 1996; Hsu et al., 1995).

Die Notwendigkeit der Todesdomäne zeigt auch, dass das, als Regulator der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B beschriebene Protein PRMT5, nicht für die Aktivierung von NF- κ B ausreichend sein kann, da es unabhängig von der Todesdomäne bindet. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF- κ B durch den Verlust der Todesdomäne vollständig verloren ging, was nicht der Fall sein dürfte, wenn PRMT5 direkt die Aktivierung von NF- κ B weiterleiten würde. Der Effekt der PRMT5 vermittelten TRAIL-Resistenz scheint sich zudem auf Tumorzelllinien zu beschränken, da in nicht transformierten Fibroblasten kein Einfluss von PRMT5 feststellbar ist (Tanaka et al., 2009). Da Fibroblasten, wie in dieser Arbeit für HEK 293T gezeigt wurde, jedoch deutlich NF- κ B auf TRAIL aktivieren können, scheint PRMT5 kein universeller Regulator oder Mediator der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B zu sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF- κ B bei den TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 abhängig von der Todesdomäne war, wie es auch bei der Induktion von Apoptose der Fall ist.

6.3. FADD als Übermittler des NF- κ B Signals durch TRAIL

Die Beteiligung der Todesdomäne an der TRAIL-induzierten NF- κ B Aktivierung legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Adaptorprotein um ein Protein mit Todesdomäne handeln könnte, da diese in der Regel homotypische Interaktionen eingehen (Lahm et al., 2003). Eine Interaktion von TRADD, einem Protein mit Todesdomäne, das an der NF- κ B Aktivierung des TNFR1 beteiligt ist, war bisher für den TRAIL-Rezeptor nicht eindeutig gezeigt worden. Dass aber FADD, das Adaptorprotein der TRAIL-induzierten Apoptose, an beide TRAIL-Rezeptoren bindet, ist inzwischen unumstritten. Daher wurde FADD näher untersucht.

Zunächst führte die Überexpression von FADD in HEK 293T Zellen zu starker Induktion von NF- κ B, was aber alleine noch keinen Rückschluss auf die Rolle im TRAIL-Signalweg zulässt. Dazu wurde die NF- κ B Aktivierung durch LMP1-TR2 in HEK 293T untersucht, deren

Expression von FADD transient gehemmt wurde. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion des Signals um rund 31% (vgl. Abb. 22). Da die siRNA-Inhibition der FADD Expression jedoch nur unvollständig war, war eine verbleibende partielle Aktivierung durch LMP1-TR2 weiter messbar.

Um das zu vermeiden, wurde ein zusätzliches, eindeutigeres System gesucht. Als ein System ohne endogenem FADD wurden daher FADD defiziente JURKAT-Zellen (A3 FADD def.) herangezogen. Die Stimulation mit ILZ-TRAIL führte in diesen Zellen tatsächlich auch zu keiner Aktivierung von NF- κ B und es fand keine Induktion von Apoptose statt. Eine transiente Reexpression von rekombinantem FADD ermöglichte aber eine Wiederherstellung der NF- κ B Aktivierung (vgl. Abb. 23).

Damit konnte gezeigt werden, dass die Vermittlung von NF- κ B, wie auch die Induktion von Apoptose, definitiv von FADD abhängig war.

Eine verringerte Aktivierung von TNF α abhängig von FADD, wie Wajant et al. beschreiben hatten, konnte allerdings in den A3 FADD def. Zellen bei der Messung der Luziferase-Aktivität nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt) (Wajant, 2000).

Da die transiente Expression von proapoptotischem FADD relativ ineffizient war, wurde die Expression von FADD stabil unter Kontrolle einer Destabilisierungsdomäne (DD) durchgeführt, wodurch die Expression über Zugabe des stabilisierenden Liganden Shield-1 induziert werden konnte. In diesem System wurde auch die genauere Untersuchung der beiden FADD-Varianten AHALL und RHDA4 durchgeführt.

Die beiden oligomerisierungsdefizienten Varianten von FADD sind als dominant-negative Proteine in der Lage, die Induktion von Apoptose durch endogenes FADD zu hemmen bzw. aktivieren sie sie nicht, wenn sie in FADD defizienten Zellen exprimiert werden (Muppidi et al., 2006).

Apoptosetests mit ILZ-TRAIL zeigten eine Resensitivierung der mit DD-FADD rekonstituierten Zelllinie, wobei die Apoptoserate anhängig von der Menge Shield-1 war. Ohne Zugabe von Shield-1 zu A3 FADD def. DD-FADD-Zellen war eine absolute Apoptoserate von maximal etwa 40% messbar, was auf geringe basale Mengen an aktiven DD-FADD zurückzuführen sein dürfte. Eine Shield-1 Konzentration von 0,06 μ M erreichte ein Proteinniveau, das in etwa dem endogenen FADD in der parentalen Zelllinie entsprach und zeigte auch eine Dosis-Wirkungskurve für TRAIL, die mit der des Wildtyps vergleichbar war. Die Überexpression von FADD durch Zugabe von 0,5 μ M Shield-1 führte zu einer noch stärkeren Induktion von Apoptose durch ILZ-TRAIL. Somit war, abgesehen von FADD, der Apoptosesignalweg in der FADD defizienten Zelllinie intakt.

Western-Analyse und ELISA zeigten, über die Phosphorylierung von I κ B α und die Aktivierung von p65, dass DD-FADD eindeutig auch in der Lage war, die TRAIL-induzierte

Aktivierung von NF- κ B zu rekonstituieren. Damit war es gelungen, das Ergebnis der transienten Versuche zu verifizieren.

Für DD-AHALL und DD-RHDAA waren bereits höhere basale Proteinmengen festzustellen, aber weder diese noch höhere Proteinkonzentrationen durch Zugabe von Shield-1 konnten zu einer Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose führen (vgl. Abb. 26). Ebenso führten DD-AHALL und DD-RHDAA zu keiner Aktivierung von NF- κ B.

Die Veränderung des konservierten Motivs RXDLL der Todeseffektordomäne von FADD führte somit zu einem Verlust der NF- κ B Aktivierung, wie auch zu einem Defekt im Apoptosesignalweg. Der Kontakt, den FADD-Moleküle im Rezeptorkomplex über die Todeseffektordomäne untereinander aufnehmen, scheint insgesamt für die Bildung eines funktionellen DISC und somit auch für die Übermittlung des NF- κ B Signals notwendig zu sein.

Das konservierte Motiv RXDLL verändert bei einem Austausch von zwei der fünf Aminosäuren die Eigenschaften von FADD so, dass zum Beispiel bei Überexpression keine Bildung von Todeseffektorfilamenten mehr zu beobachten ist und auch die Interaktion mit Wildtyp-FADD deutlich gestört ist. Muppidi et al. konnten für RHDAA sogar zeigen, dass tatsächlich auch am CD95 Rezeptor keine Bildung eines funktionellen DISC mehr stattfindet. Es wird nach Stimulation keine Caspase 8 rekrutiert, obwohl die Proteininteraktion zwischen Caspase 8 und RHDAA prinzipiell möglich wäre (Muppidi et al., 2006). Weitere Proteine am DISC wurden in diesem Zusammenhang zwar nicht untersucht, aber es stellt einen Hinweis auf Caspase 8 als weiteren Übermittler der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B dar.

Somit konnte gezeigt werden, dass FADD das Adaptorprotein der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B ist und dabei auch die Multimerisierung von FADD, vermittelt durch seine Todeseffektordomäne, eine entscheidende Rolle spielt.

6.4. Einfluss der Caspase 8 auf die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL

Somit deuteten zum einen die bekannte Interaktion zwischen FADD und Caspase 8, sowie das Fehlen der Aktivierung durch die FADD-Variante RHDAA, die nicht in der Lage ist Caspase 8 in den DISC zu rekrutieren, auf eine mögliche Rolle der Caspase 8 bei der Aktivierung von NF- κ B hin. Zudem wurde Caspase 8, zusammen mit FADD und RIP als Mediator der NF- κ B Aktivierung von CD95 vorgeschlagen, da Zelllinien, die für jeweils eines der Proteine defizient sind, kein NF- κ B nach Stimulation mit FasL aktivieren (Kreuz, 2004). Daher wurde anschließend Caspase 8 untersucht.

Einen weiteren Hinweis auf Caspase 8 als Vermittler lieferten Untersuchungen in HEK 293T Zellen mit verminderter Expression von Caspase 8. Wie auch für FADD, führte eine Inhibition der Expression von Caspase 8 zu einer signifikant verringerten Induktion von NF- κ B durch

LMP1-TR2 um 25% bei transienter und 30% bei stabiler Inhibition (vgl. Abb. 29). Die verbleibende Aktivierung ist zum einen durch die unvollständige Hemmung der Caspase 8 Expression zu erklären und zum anderen möglicherweise bedingt durch die potentielle Redundanz zu Caspase 10. Sie wird bei der Apoptoseinduktion ebenso wie Caspase 8 an den TRAIL-Rezeptorkomplex gebunden und ist höchstwahrscheinlich in der Lage dazu, sie funktionell zu ersetzen, auch wenn diesbezüglich gegensätzliche Beobachtungen publiziert sind (Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002).

Die Verringerung der LMP1-TR2 induzierten Aktivierung von NF- κ B durch die Reduktion der Caspase 8 Expression durch RNA Interferenz, deutet somit auch auf eine Beteiligung von Caspase 8 an der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B hin.

Wie zuvor die FADD defiziente Zelllinie, wurde dann die Caspase 8 defiziente Zelllinie A3 C8 def. eingesetzt um auch hier in einem System ohne endogenem Protein arbeiten zu können. Die Caspase 8 defizienten Zellen wurden daher auf ihre Aktivierung von NF- κ B untersucht. Dabei zeigten sie weder eine Phosphorylierung von I κ B α , noch einen Anstieg der Luziferase-Aktivität nach Stimulation mit ILZ-TRAIL, obwohl FADD in den Zellen nachweislich vorhanden war (vgl. Abb. 31).

Die transiente Reexpression von Caspase 8 in A3 C8 def. konnte jedoch keine messbare Expression des Proteins bewirken (Daten nicht gezeigt). Die Expression der stark proapoptotischen Caspase wurde wahrscheinlich von den Zellen nicht toleriert, weshalb versucht wurde, die Rekonstitution in A3 C8 def. stabil über das induzierbare „Proteo Tuning“ System durchzuführen. Für den Nachweis von NF- κ B über die Phosphorylierung von I κ B α oder die Aktivierung von p65 ist es vor allem entscheidend, dass möglichst alle Zellen Caspase 8 exprimieren. Durch die Lyse der Zellen ist keine Unterscheidung zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen mehr möglich, zudem sind die benötigten Mengen an Zellen transient schwer herzustellen.

Die Expression der DD-Caspase 8 war in der stabilen Zelllinie dann überraschenderweise unabhängig von Shield-1. Sie zeigte beträchtliche basale Mengen an DD-Caspase 8, was für ein proapoptotisches Protein eigentlich unerwartet war. Allerdings führte die Expression der DD-Caspase 8 zu keiner Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose in der rekonstituierten Zelllinie. Die derivativen Zelllinien mit DD-Caspase 8, der katalytisch inaktiven DD-Caspase 8 C360S und dem Leervektor pCDH verhielten sich genau gleich, wobei aber für alle keine komplette Resistenz, sondern eine schwache Apoptoseinduktion von rund 20% nach 48 Stunden zu beobachten war (vgl. Abb. 33).

Die meist als TRAIL-resistent beschriebene Zelllinie besitzt offenbar trotz fehlender Caspase 8 eine gewisse Sensitivität gegenüber TRAIL, die hier nach Stimulation mit ILZ-TRAIL sichtbar wurde und die laut Kischkel et al. auf geringe Mengen Caspase 10 zurückzuführen ist (Kischkel et al., 2001). Deren Menge ist ebenso wie Caspase 8 deutlich

geringer als in der parentalen JURKAT Linie A3 und Milhas et al. gelang es sogar innerhalb der Zelllinie A3 C8 def. verschiedene Klone isolieren, die unterschiedlich hohe Expressionsniveaus für Caspase 10 aufwiesen. Je mehr Caspase 10 exprimiert wurde, desto sensibler waren die Zellen gegenüber FasL-induzierte Apoptose (Milhas et al., 2005). Diese Beobachtung könnte auf TRAIL-induzierte Apoptose übertragbar sein. Einerseits wird damit das Verhalten der Zelllinie durch die geringe Menge an Caspase 10 beeinflusst, zeigt aber gleichzeitig, dass im Prinzip der Apoptosesignalweg der Zelllinie intakt sein sollte.

Zudem konnte zuvor im transienten System auch eine Resensitivierung für FasL-induzierte Apoptose in dieser Zelllinie durch Expression eines GFP-Fusionsproteins der Caspase 8 erreicht werden (Lafont et al., 2010).

Da im Signalweg der FasL- und TRAIL-induzierten Apoptose im Prinzip die gleichen Proteine involviert sind, lag die fehlende Sensitivierung der rekonstituierten Zelllinie A3 C8 def. DD-Caspase 8 für TRAIL-induzierte Apoptose somit möglicherweise an einer Beeinträchtigung der Funktionalität der Caspase 8 durch die Destabilisierungsdomäne. Die N-Terminale Position am Protein führt zwar dazu, dass die DD bei der Prozessierung abgespalten würde und sie damit keinen Einfluss auf die aktivierte Caspase 8 haben sollte, jedoch könnte sie auf Grund ihrer Größe von etwa 12 kDa mit der Bindung an den Rezeptor interferieren und so die erfolgreiche Rekonstitution verhindern.

Für die Wiederherstellung der Proteinfunktion nach Zugabe von Shield-1 war der Einsatz der Destabilisierungsdomäne erfolgreich in verschiedenen Systemen eingesetzt worden, unter anderem für Caspase 3, wobei in diesem Fall jedoch keine Bindung an einen Rezeptor notwendig ist (Pratt et al., 2007). Die Verwendung von Procaspase 8 als DD-Fusionsprotein wurde bisher nicht beschrieben. Lediglich Fusionsproteine der Untereinheiten p20 und p10, jeweils fusioniert mit einer verwandten FKBP-Domäne, die als induzierbare Dimerisierungsdomäne fungiert, sind publiziert (Oberst et al., 2011). Allerdings ist dieses System ebenfalls unabhängig von der Rezeptorbindung.

Zusammenfassend konnte für den Signalweg der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B gezeigt werden, dass die Vermittlung des Signals von der Todesdomäne der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 abhängt und durch FADD vermittelt wird. Die FADD-Variante RHDA4 war außerdem nicht in der Lage, das NF- κ B Signal zu vermitteln und gibt, da sie wahrscheinlich keine Rekrutierung von Caspase 8 in den DISC bewirken kann, einen Hinweis auf die Notwendigkeit von Caspase 8 für die Aktivierung von NF- κ B. Zudem weisen weitere Untersuchungen in einer Caspase 8 defizienten Zelllinie und HEK 293T Zellen mit verminderter Caspase 8 Expression darauf hin, dass Caspase 8 an der Übermittlung des NF- κ B Signals beteiligt ist.

6.5. Ausblick auf weiterführende Untersuchungen des Signalweges

Um mit letzter Sicherheit Caspase 8 als Vermittler der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B zu identifizieren, sind Reexpressionsversuche mit Caspase 8 in den A3 C8 def. Zellen unter Verwendung einer anderen Technik für die Induktion der Caspase 8 notwendig.

Nachdem mit Caspase 8 aber wahrscheinlich bereits der nächste Schritt in der Signalkette identifiziert sein könnte, bietet das einen neuen Ansatzpunkt, um nach weiteren beteiligten Proteinen zu suchen.

Die Beobachtung, dass A3 C8 def. neben der Caspase 8 auch fast keine Caspase 10 besitzen, legt die Vermutung nahe, dass die fehlende NF- κ B Aktivierung in A3 C8 def. nicht allein durch das Fehlen von Caspase 8, sondern auch durch die nur minimale Expression der Caspase 10 verursacht wird. In Bezug auf die Apoptoseinduktion ist Caspase 10 wahrscheinlich in der Lage, die Funktion von Caspase 8 zu ersetzen (Kischkel et al., 2001). Damit wäre die Caspase 10 auch ein potentiell Signalprotein in der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B. Zudem ist auch die Aktivierung von NF- κ B durch Überexpression von bestimmten Isoformen der Caspase 10 beschrieben (Chaudhary et al., 2000).

Für diese Fragestellung würde sich auch die Expression von Caspase 10 in der Caspase 8 defizienten Zelllinie A3 C8 def. eignen, da sie nur sehr wenig endogene Caspase 10 besitzt und wie gezeigt wurde, keine Aktivierung von NF- κ B durch TRAIL induziert.

Wie für CD95 vermutet, könnte auch hier RIP eine wichtige Rolle spielen, zudem für Caspase 8 bekannt ist, dass RIP ein Substrat für die proteolytische Spaltung durch Caspase 8 ist und auch für Isoform g der Caspase 10 eine Interaktion mit RIP gezeigt werden konnte (Wang et al., 2007; Wang et al., 2001). Nach Stimulation von JURKAT-Zellen mit TRAIL wurde die Spaltung von RIP auch detektierbar (Daten nicht gezeigt). Für den TNF Signalweg wird die Spaltung von RIP allerdings für die Hemmung der Aktivierung von NF- κ B und Verstärkung der Apoptoseinduktion verantwortlich gemacht (Lewis et al., 2000). Da JURKAT-Zellen auch Apoptose auf TRAIL aktivieren, könnte es sich dabei um einen zeitversetzten Mechanismus handeln. Zudem wurde von Lin et al. eine Beteiligung von RIP an der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B postuliert, nachdem in RIP defizienten Zellen keine Aktivierung festgestellt werden konnte (Lin et al., 2000). Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von RIP bietet auch die Beobachtung, dass TRAIL-induzierte Proliferation in RIP defizienten Zellen nicht stattfindet (Ehrhardt et al., 2003). Auch hier könnte eine Reexpression Aufschluss über die Beteiligung von RIP am TRAIL-Signalweg geben.

Sollte sich RIP als essentiell bestätigen, wäre es interessant zu zeigen, ob es Überlappungen mit den für TNFR1 oder CD95 bekannten Mediatoren gibt. Lin et al. konnten für TRAF2 bereits zeigen, dass es nicht essentiell für die NF- κ B Aktivierung durch TRAIL ist, wie auch für den TNFR1 (Lee et al., 1997; Lin et al., 2000).

Insgesamt gelang es in der vorliegenden Arbeit, den rezeptornahen Signalweg der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B näher zu charakterisieren: Das Adaptorprotein FADD bindet an den C-Terminus mit der Todesdomäne von trimerisiertem TRAIL-Rezeptor 1 oder 2. Die Todeseffektordomäne mit dem konservierten Motiv RXDLL vermittelt anschließend die Multimerisierung der FADD-Moleküle. Es wurden zudem deutliche Hinweise darauf gezeigt, dass wahrscheinlich Caspase 8 das Signal dann weiter vermittelt.

Die Feststellung, dass FADD und möglicherweise Caspase 8 die Mediatoren der TRAIL-induzierten Aktivierung von NF- κ B sind, ermöglicht noch keine Unterscheidung vom Apoptosesignalweg. Daher müssen zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden, um den Signalweg weiter zu entschlüsseln. Vielleicht wird es so möglich, Proteine zu identifizieren, die es erlauben, TRAIL-induzierte NF- κ B Aktivierung gezielt auszuschalten, um unerwünschte Effekte bei einem potentiellen Einsatz von TRAIL in der Tumorthherapie zu reduzieren.

7. Literaturverzeichnis

- Arenzana-Seisdedos, F., Fernandez, B., Dominguez, I., Jacque, J. M., Thomas, D., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J. and Virelizier, J. L. (1993). "Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes." J Virol **67**(11): 6596-6604.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z. and Schwall, R. H. (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." J Clin Invest **104**(2): 155-162.
- Baader, E., Toloczko, A., Fuchs, U., Schmid, I., Beltinger, C., Ehrhardt, H., Debatin, K. M. and Jeremias, I. (2005). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated proliferation of tumor cells with receptor-proximal apoptosis defects." Cancer Res **65**(17): 7888-7895.
- Bellail, A. C., Tse, M. C., Song, J. H., Phuphanich, S., Olson, J. J., Sun, S. Y. and Hao, C. (2010). "DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas." J Cell Mol Med **14**(6A): 1303-1317.
- Berghe, T. V., van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., Brouckaert, G., Kalai, M., Declercq, W. and Vandenabeele, P. (2004). "Differential Signaling to Apoptotic and Necrotic Cell Death by Fas-associated Death Domain Protein FADD." J Biol Chem **279**(9): 7925-7933.
- Bin, L., Li, X., Xu, L. G. and Shu, H. B. (2002). "The short splice form of Casper/c-FLIP is a major cellular inhibitor of TRAIL-induced apoptosis." FEBS Lett **510**(1-2): 37-40.
- Bodmer, J.-L., Schneider, P. and Tschopp, J. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Bodmer, J. L., Meier, P., Tschopp, J. and Schneider, P. (2000). "Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **275**(27): 20632-20637.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H. and Wallach, D. (1995). "A Novel Protein That Interacts with the Death Domain of Fas/APO1 Contains a Sequence Motif Related to the Death Domain." J Biol Chem **270**(14): 7795-7798.
- Cha, S. S. (2000). "Crystal Structure of TRAIL-DR5 Complex Identifies a Critical Role of the Unique Frame Insertion in Conferring Recognition Specificity." J Biol Chem **275**(40): 31171-31177.
- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E. and Yang, X. (2002). "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis." EMBO J **21**(14): 3704-3714.
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J. and Hood, L. (1997). "Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway." Immunity **7**(6): 821-830.

- Chaudhary, P. M., Eby, M. T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L. and Hood, L. (2000). "Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs." Oncogene **19**(39): 4451-4460.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V. M. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-512.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. and Bhat, G. (2006). "Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited." Cell Mol Biol Lett **11**(4): 506-525.
- Chu, B. W., Banaszynski, L. A., Chen, L. C. and Wandless, T. J. (2008). "Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains." Bioorg Med Chem Lett **18**(22): 5941-5944.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J. and Chan, F. K. (2005). "Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18099-18104.
- Costanzo, A., Guet, C. and Vito, P. (1999). "c-E10 is a caspase-recruiting domain-containing protein that interacts with components of death receptors signaling pathway and activates nuclear factor-kappaB." J Biol Chem **274**(29): 20127-20132.
- Daniels, R. A., Turley, H., Kimberley, F. C., Liu, X. S., Mongkolsapaya, J., Ch'En, P., Xu, X. N., Jin, B. Q., Pezzella, F. and Screaton, G. R. (2005). "Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues." Cell Res **15**(6): 430-438.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A. and Goodwin, R. G. (1997). "The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF-kB and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain." Immunity **7**(6): 813-820.
- Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K. M. and Jeremias, I. (2003). "TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB." Oncogene **22**(25): 3842-3852.
- Falschlehner, C., Schaefer, U. and Walczak, H. (2009). "Following TRAIL's path in the immune system." Immunology **127**(2): 145-154.
- Fanslow, W. C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M. G., Spriggs, M. K. and Armitage, R. J. (1994). "Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function." Semin Immunol **6**(5): 267-278.
- Feldmann, M. and Maini, R. N. (2010). "Anti-TNF Therapy, from Rationale to Standard of Care: What Lessons Has It Taught Us?" J Immunol **185**(2): 791-794.
- Floettmann, J. E. and Rowe, M. (1997). "Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation." Oncogene **15**(15): 1851-1858.
- Ganten, T. M. (2006). "Preclinical Differentiation between Apparently Safe and Potentially Hepatotoxic Applications of TRAIL Either Alone or in Combination with Chemotherapeutic Drugs." Clin Cancer Res **12**(8): 2640-2646.
- Gasparian, M. E., Ostapchenko, V. G., Yagolovich, A. V., Tsygannik, I. N., Chernyak, B. V., Dolgikh, D. A. and Kirpichnikov, M. P. (2007). "Overexpression and refolding of

- thioredoxin/TRAIL fusion from inclusion bodies and further purification of TRAIL after cleavage by enteropeptidase." Biotechnol Lett **29**(10): 1567-1573.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (1997). "Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule." EMBO J **16**(20): 6131-6140.
- Gonzalvez, F. and Ashkenazi, A. (2010). "New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL." Oncogene **29**(34): 4752-4765.
- Gottschalk, K. (2010). "Deciphering the receptor-proximal signaling pathway of TRAIL-induced activation of NF- κ B." Masterarbeit.
- Harbury, P. B., Kim, P. S. and Alber, T. (1994). "Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer." Nature **371**(6492): 80-83.
- Havell, E. A., Fiers, W. and North, R. J. (1988). "The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity." J Exp Med **167**(3): 1067-1085.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2008). "Shared Principles in NF- κ B Signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. and Goeddel, D. V. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D. V. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Hu, W. H., Johnson, H. and Shu, H. B. (2000). "Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8." J Biol Chem **275**(15): 10838-10844.
- Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G. and Wu, H. (2003). "Requirement of Both the Second and Third BIR Domains for the Relief of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)-mediated Caspase Inhibition by Smac." J Biol Chem **278**(49): 49517-49522.
- Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., Ashkenazi, A. and de Vos, A. M. (1999). "Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5." Mol Cell **4**(4): 563-571.
- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M. and Kelley, R. F. (2000). "A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL." Biochemistry **39**(4): 633-640.
- Jeremias, I. and Debatin, K. M. (1998). "TRAIL induces apoptosis and activation of NFkappaB." Eur Cytokine Netw **9**(4): 687-688.
- Jeremias, I., Kupatt, C., Baumann, B., Herr, I., Wirth, T. and Debatin, K. M. (1998). "Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells." Blood **91**(12): 4624-4631.

- Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J. and Blenis, J. (1998). "Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade." Curr Biol **8**(18): 1001-1008.
- Juo, P., Woo, M. S., Kuo, C. J., Signorelli, P., Biemann, H. P., Hannun, Y. A. and Blenis, J. (1999). "FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas." Cell Growth Differ **10**(12): 797-804.
- Kandasamy, K., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., Bryant, J. L. and Srivastava, R. K. (2003). "Involvement of Proapoptotic Molecules Bax and Bak in Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Mitochondrial Disruption and Apoptosis." Cancer Res **63**(7): 1712-1721.
- Kang, H., Sun, A. Y., Shen, Y. L. and Wei, D. Z. (2007). "Refolding and structural characteristic of TRAIL/Apo2L inclusion bodies from different specific growth rates of recombinant Escherichia coli." Biotechnol Prog **23**(1): 286-292.
- Kataoka, T. and Tschopp, J. (2004). "N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway." Mol Cell Biol **24**(7): 2627-2636.
- Kavurma, M. M., Schoppet, M., Bobryshev, Y. V., Khachigian, L. M. and Bennett, M. R. (2008). "TRAIL Stimulates Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells via Activation of NF-kB and Induction of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor." J Biol Chem **283**(12): 7754-7762.
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Okumura, K. and Yagita, H. (1999). "Expression and Function of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand on Murine Activated NK Cells." J Immunol **163**(4): 1906-1913.
- Keane, M. M., Rubinstein, Y., Cuello, M., Ettenberg, S. A., Banerjee, P., Nau, M. M. and Lipkowitz, S. (2000). "Inhibition of NF-kB Activity Enhances TRAIL Mediated Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines." Breast Cancer Res Treat **64**(2): 211-219.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kirschning, C. J., Wesche, H., Merrill Ayres, T. and Rothe, M. (1998). "Human Toll-like Receptor 2 Confers Responsiveness to Bacterial Lipopolysaccharide." J Exp Med **188**(11): 2091-2097.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnett, D. and Ashkenazi, A. (2001). "Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8." J Biol Chem **276**(49): 46639-46646.
- Kreuz, S. (2004). "NF-kB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." J Cell Biol **166**(3): 369-380.
- Kurbanov, B. M., Fecker, L. F., Geilen, C. C., Sterry, W. and Eberle, J. (2007). "Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-kB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4." Oncogene **26**(23): 3364-3377.

- Lafont, E., Milhas, D., Teissié, J., Therville, N., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Benoist, H. and Ségui, B. (2010). "Caspase-10-Dependent Cell Death in Fas/CD95 Signalling Is Not Abrogated by Caspase Inhibitor zVAD-fmk." PLoS One **5**(10): e13638.
- Lahm, A., Paradisi, A., Green, D. R. and Melino, G. (2003). "Death fold domain interaction in apoptosis." Cell Death Differ **10**(1): 10-12.
- Lee, S. Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K. A., Nussenzweig, M. C. and Choi, Y. (1997). "TRAF2 Is Essential for JNK but Not NF-kappaB Activation and Regulates Lymphocyte Proliferation and Survival." Immunity **7**(5): 703-713.
- Legler, D. F., Micheau, O., Doucey, M.-A., Tschopp, J. and Bron, C. (2003). "Recruitment of TNF Receptor 1 to Lipid Rafts Is Essential for TNFalpha-Mediated NF-kappaB Activation." Immunity **18**(5): 655-664.
- Lewis, J., Devin, A., Miller, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Neckers, L. and Liu, Z. G. (2000). "Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation." J Biol Chem **275**(14): 10519-10526.
- Li, Z., Zhang, J., Chen, D. and Shu, H. B. (2003). "Casper/c-FLIP is physically and functionally associated with NF-kappaB1 p105." Biochem Biophys Res Commun **309**(4): 980-985.
- Lin, Y., Devin, A., Cook, A., Keane, M. M., Kelliher, M., Lipkowitz, S. and Liu, Z. G. (2000). "The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase." Mol Cell Biol **20**(18): 6638-6645.
- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J. (2001). "The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology." Cell **104**(4): 487-501.
- MacFarlane, M. and Williams, A. C. (2004). "Apoptosis and disease: a life or death decision." EMBO Rep **5**(7): 674-678.
- Marsters, S. A., Pitti, R. M., Donahue, C. J., Ruppert, S., Bauer, K. D. and Ashkenazi, A. (1996). "Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA." Curr Biol **6**(6): 750-752.
- Medvedev, A. E., Piao, W., Shoenfelt, J., Rhee, S. H., Chen, H., Basu, S., Wahl, L. M., Fenton, M. J. and Vogel, S. N. (2007). "Role of TLR4 Tyrosine Phosphorylation in Signal Transduction and Endotoxin Tolerance." J Biol Chem **282**(22): 16042-16053.
- Milhas, D., Cuvillier, O., Therville, N., Clavé, P., Thomsen, M., Levade, T., Benoist, H. and Ségui, B. (2005). "Caspase-10 Triggers Bid Cleavage and Caspase Cascade Activation in FasL-induced Apoptosis." J Biol Chem **280**(20): 19836-19842.
- Muppidi, J. R., Lobito, A. A., Ramaswamy, M., Yang, J. K., Wang, L., Wu, H. and Siegel, R. M. (2006). "Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis." Cell Death Differ **13**(10): 1641-1650.
- Oberst, A., Dillon, C. P., Weinlich, R., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G. S. and Green, D. R. (2011). "Catalytic activity of the caspase-8-FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis." Nature **471**(7338): 363-367.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-6866.

- Pan, G. (1997a). "An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor for TRAIL." Science **277**(5327): 815-818.
- Pan, G. (1997b). "The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL." Science **276**(5309): 111-113.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. and Ashkenazi, A. (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." J Biol Chem **271**(22): 12687-12690.
- Prabhakar, B. S., Mulherkar, N. and Prasad, K. V. (2008). "Role of IG20 splice variants in TRAIL resistance." Clin Cancer Res **14**(2): 347-351.
- Pratt, M. R., Schwartz, E. C. and Muir, T. W. (2007). "Small-molecule-mediated rescue of protein function by an inducible proteolytic shunt." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11209-11214.
- Ramaswamy, M., Efimova, E. V., Martinez, O., Mulherkar, N. U., Singh, S. P. and Prabhakar, B. S. (2004). "IG20 (MADD splice variant-5), a proapoptotic protein, interacts with DR4/DR5 and enhances TRAIL-induced apoptosis by increasing recruitment of FADD and caspase-8 to the DISC." Oncogene **23**(36): 6083-6094.
- Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1997). "FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b." J Biol Chem **272**(43): 26953-26958.
- Schneider, F. and Kieser, A. (2004). "A novel assay to quantify cell death after transient expression of apoptotic genes in B- and T-lymphocytes." J Immunol Methods **292**(1-2): 165-174.
- Schneider, F., Neugebauer, J., Griese, J., Liefold, N., Kutz, H., Briseno, C. and Kieser, A. (2008). "The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity." PLoS Biol **6**(1): e8.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J. L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N. and Tschopp, J. (1997). "TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB." Immunity **7**(6): 831-836.
- Seal, S., Hockenbery, D. M., Spaulding, E. Y., Kiem, H.-P., Abbassi, N. and Deeg, H. J. (2008). "Differential responses of FLIPLong and FLIPShort-overexpressing human myeloid leukemia cells to TNF- α and TRAIL-initiated apoptotic signals." Exp Hematol **36**(12): 1660-1672.
- Secchiero, P. (2003). "Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF- promote the NF- κ B-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells." J Leukoc Biol **74**(2): 223-232.
- Secchiero, P., Gonelli, A., Corallini, F., Ceconi, C., Ferrari, R. and Zauli, G. (2010). "Metalloproteinase 2 cleaves in vitro recombinant TRAIL: Potential implications for the decreased serum levels of TRAIL after acute myocardial infarction." Atherosclerosis **211**(1): 333-336.
- Secchiero, P., Melloni, E., Heikinheimo, M., Mannisto, S., Di Pietro, R., Iacone, A. and Zauli, G. (2004). "TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway." Blood **103**(2): 517-522.

- Sedger, L. M., Shows, D. M., Blanton, R. A., Peschon, J. J., Goodwin, R. G., Cosman, D. and Wiley, S. R. (1999). "IFN- γ Mediates a Novel Antiviral Activity Through Dynamic Modulation of TRAIL and TRAIL Receptor Expression." J Immunol **163**(2): 920-926.
- Seol, D. W. and Billiar, T. R. (2000). "Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activity." Cancer Res **60**(12): 3152-3154.
- Sheridan, J. P. (1997). "Control of TRAIL-Induced Apoptosis by a Family of Signaling and Decoy Receptors." Science **277**(5327): 818-821.
- Shkoda, A., Town, J. A., Griesse, J., Sarioglu, H., Knöfel, T., Giehler, F. and Kieser, A. (Manuskript in Präparation). "The germinal center kinase TNIK is required for JNK and canonical NF-kappaB signaling by the viral LMP1 oncoprotein and CD40."
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. and Boyle, W. J. (1997). "Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density." Cell **89**(2): 309-319.
- Song, J. H., Tse, M. C. L., Bellail, A., Phuphanich, S., Khuri, F., Kneteman, N. M. and Hao, C. (2007). "Lipid Rafts and Nonrafts Mediate Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand Induced Apoptotic and Nonapoptotic Signals in Non Small Cell Lung Carcinoma Cells." Cancer Res **67**(14): 6946-6955.
- Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A. and Walczak, H. (2002). "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." EMBO J **21**(17): 4520-4530.
- Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H. and Walczak, H. (2000). "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." Immunity **12**(6): 599-609.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R. and Srivastava, R. K. (2001). "Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways." Oncogene **20**(17): 2122-2133.
- Sun, B. K., Kim, J. H., Nguyen, H. N., Oh, S., Kim, S. Y., Choi, S., Choi, H. J., Lee, Y. J. and Song, J. J. (2011). "MEKK1/MEKK4 are responsible for TRAIL-induced JNK/p38 phosphorylation." Oncol Rep **25**(2): 537-544.
- Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res **21**(1): 71-85.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H. and Okumura, K. (2001a). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells." Nat Med **7**(1): 94-100.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H. and Okumura, K. (2001b). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth." Cell Immunol **214**(2): 194-200.

- Tanaka, H., Hoshikawa, Y., Oh-hara, T., Koike, S., Naito, M., Noda, T., Arai, H., Tsuruo, T. and Fujita, N. (2009). "PRMT5, a novel TRAIL receptor-binding protein, inhibits TRAIL-induced apoptosis via nuclear factor-kappaB activation." Mol Cancer Res **7**(4): 557-569.
- Tang, W., Wang, W., Zhang, Y., Liu, S., Liu, Y. and Zheng, D. (2009). "TRAIL receptor mediates inflammatory cytokine release in an NF- κ B-dependent manner." Cell Res **19**(6): 758-767.
- Tekkesin, M., Mutlu, S. and Olgac, V. (2011). "The Role of RANK/RANKL/OPG Signalling Pathways in Osteoclastogenesis in Odontogenic Keratocysts, Radicular Cysts, and Ameloblastomas." Head Neck Pathol: 1-6.
- Thomas, L. R., Bender, L. M., Morgan, M. J. and Thorburn, A. (2006). "Extensive regions of the FADD death domain are required for binding to the TRAIL receptor DR5." Cell Death Differ **13**(1): 160-162.
- Trabzuni, D., Famulski, K. S. and Ahmad, M. (2000). "Functional analysis of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine." Biochem J **350 Pt 2**: 505-510.
- Tracey, K., Beutler, B., Lowry, S., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I., Hariri, R., Fahey, T., Zentella, A., Albert, J. and et, a. (1986). "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin." Science **234**(4775): 470-474.
- Vaccarezza, M., Delbello, G. and Zauli, G. (2007). "A role of the TRAIL-TRAIL receptor system in the pathogenesis of diabetes." Acta Biomed **78 Suppl 1**: 262-267.
- van Geelen, C. M., Pennarun, B., Le, P. T., de Vries, E. G. and de Jong, S. (2011). "Modulation of TRAIL resistance in colon carcinoma cells: different contributions of DR4 and DR5." BMC Cancer **11**: 39.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D. and Ashkenazi, A. (2005). "Molecular Determinants of Kinase Pathway Activation by Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand." J Biol Chem **280**(49): 40599-40608.
- Vidalain, P. O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C. and Servet-Delprat, C. (2000). "Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells." J Virol **74**(1): 556-559.
- Wachter, T., Sprick, M., Hausmann, D., Kerstan, A., McPherson, K., Stassi, G., Brocker, E. B., Walczak, H. and Leverkus, M. (2004). "cFLIPL Inhibits Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-mediated NF- κ B Activation at the Death-inducing Signaling Complex in Human Keratinocytes." J Biol Chem **279**(51): 52824-52834.
- Wajant, H. (2000). "Inhibition of Death Receptor-mediated Gene Induction by a Cycloheximide-sensitive Factor Occurs at the Level of or Upstream of Fas-associated Death Domain Protein (FADD)." J Biol Chem **275**(32): 24357-24366.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G. and Rauch, C. T. (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." EMBO J **16**(17): 5386-5397.

- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C. L. and Lynch, D. H. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." Nat Med **5**(2): 157-163.
- Wang, H., Wang, P., Sun, X., Luo, Y., Wang, X., Ma, D. and Wu, J. (2007). "Cloning and characterization of a novel caspase-10 isoform that activates NF- κ B activity." Biochim Biophys Acta **1770**(11): 1528-1537.
- Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M. and Lenardo, M. J. (2001). "Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13884-13888.
- Wassenaar, T. A., Quax, W. J. and Mark, A. E. (2008). "The conformation of the extracellular binding domain of Death Receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL: A molecular dynamics study." Proteins **70**(2): 333-343.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. and et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-682.
- Wissink, E. H., Verbrugge, I., Vink, S. R., Schader, M. B., Schaefer, U., Walczak, H., Borst, J. and Verheij, M. (2006). "TRAIL enhances efficacy of radiotherapy in a p53 mutant, Bcl-2 overexpressing lymphoid malignancy." Radiother Oncol **80**(2): 214-222.
- Wong, K.-F., Luk, J. M., Cheng, R. H., Klickstein, L. B. and Fan, S.-T. (2007). "Characterization of two novel LPS-binding sites in leukocyte integrin β A domain." FASEB J **21**(12): 3231-3239.
- Xiao, C., Yang, B. F., Asadi, N., Beguinot, F. and Hao, C. (2002). "Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Death-inducing Signaling Complex and Its Modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in Glioma Cells." J Biol Chem **277**(28): 25020-25025.
- Xu, J., Zhou, J.-Y., Wei, W.-Z. and Wu, G. S. (2010). "Activation of the Akt Survival Pathway Contributes to TRAIL Resistance in Cancer Cells." PLoS One **5**(4): e10226.
- Zhang, X. D., Nguyen, T., Thomas, W. D., Sanders, J. E. and Hersey, P. (2000). "Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types." FEBS Lett **482**(3): 193-199.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

Abkürzungen werden in der Regel in den entsprechenden Kapiteln bei erster Nennung erläutert, einige Abkürzungen sind zudem in der folgenden Liste aufgeführt.

Die verwendeten Bezeichnungen für physikalische Größen entsprechen dem System der SI-Einheiten.

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BBMM	BugBuster Master Mix
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
C8	Caspase 8
Caspase	„cysteiny-l-aspartate specific protease“
Cys	Cystein
DD	Destabilisierungsdomäne (im Englischen auch als Abkürzung für Todesdomäne gebräuchlich, hier aber nicht verwendet)
DISC	„death inducing signaling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LMP1	„latent membrane protein 1“
Min.	Minuten
NF-κB	„nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
PCR	„polymerase chain reaction“
PI	Propidiumiodid
S	Serin
Std.	Stunden
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TR1	TRAIL-Rezeptor 1 / „death receptor 4“
TR2	TRAIL-Rezeptor 2 / „death receptor 5“
TR3	TRAIL-Rezeptor 3 / „decoy receptor 1“
TR4	TRAIL-Rezeptor 4 / „decoy receptor 2“
TRAIL	„TNF-related apoptosis inducing ligand“

8.2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. Irmela Jeremias bedanken, die es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Sie war die vergangenen Jahre eine große Unterstützung und stets offen für (nicht nur) wissenschaftliche Diskussionen.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie die Betreuung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie übernommen hat und auch das Fortschreiten der Arbeit mit Interesse begleitet hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Arnd Kieser, der mit vielen Ideen, wissenschaftlichen Diskussionen und nicht zuletzt auch technischer Unterstützung, viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein großer Dank geht vor allem auch an Kathleen Gottschalk, deren Betreuung ich während ihrer Masterarbeit übernehmen durfte. Sie war mit ihrer Arbeit mit den stabilen Zelllinien, eine große Hilfe und immer sehr interessiert und motiviert, weshalb es mir viel Spaß gemacht hat, mit ihr zu arbeiten.

Ein Danke geht auch an meine Kollegen Catarina Alves, Ulrike Borgmeier, Harald Ehrhardt, Volker Groß, Sibylle Gündisch, Ines Höfig, Naschla Kohistani, Lisa Kroll, Liliana Mura, Lina Pannert, Katja Schneider, Sebastian Tiedt, Nadia Terziyska und Franziska Wachter für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima, wie auch die lustigen Ausflüge drum herum.

Besonders bei Ulrike, Franzi und Kathleen, sowie Tina, Steffi, Diana, Sandra, Andrea und Margherita möchte ich mich an dieser Stelle für ihre Unterstützung, das Zuhören und die eine oder andere Ablenkung fernab des Labors bedanken.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Meine Eltern Heidi und Peter, meine Schwestern Andrea und Johanna und mein Freund Tobias waren immer für mich da. Sie sind mein Rückhalt und unterstützen mich in allen Lebenslagen.

8.3. Publikationen

Michaela Grunert, Kathleen Gottschalk, Julia Kapahnke, Sybille Gündisch, Arnd Kieser, Irmela Jeremias, Manuskript in Präparation

„The adaptor protein FADD and initiator Caspase-8 mediate activation of NF- κ B by TRAIL”

Castro Alves C, Terziyska N, **Grunert M**, Gündisch S, Graubner U, Quintanilla-Martinez L, Jeremias I (2012) Blood 119, 4224-4227

“Leukemia-initiating cells of patient-derived acute lymphoblastic leukemia xenografts are sensitive toward TRAIL.”

Michaela Grunert, Arnd Kieser, Irmela Jeremias

Posterpräsentation im Rahmen des Kongresses TNF 2009

„Generation of HA-LMP1-li-TEV-TR1/2 fusion proteins and of recombinant TRAIL”

Lasi M, Pauly B, Schmidt N, Cikala M, Stiening B, Käsbauer T, Zenner G, Popp T, Wagner A, Knapp RT, Huber AH, **Grunert M**, Söding J, David CN, Böttger A. (2010) Cell Research **20**, 812-825

„The molecular cell death machinery in the simple cnidarian Hydra includes an expanded caspase family and pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins.”

8.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde. Dabei habe ich mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, im Juni 2011

Michaela Grunert