

Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege durch TRAIL und anti-APO-1

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
genehmigte Abhandlung zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

vorgelegt von Frank Mühlenbeck

Hauptberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich
Mitberichter: PD Dr. Harald Wajant
Tag der mündlichen Prüfung: 27.4.2000

Institut für Zellbiologie und Immunologie
Universität Stuttgart
März 2000

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGEN	3
2	ZUSAMMENFASSUNG	6
3	EINLEITUNG	7
3.1	TRAIL UND FASL, ZWEI ZYTOKINE DER TNF FAMILIE	7
3.2	TRAIL-REZEPTOREN UND FAS/APO1 SIND MITGLIEDER DER TNF-REZEPTOR FAMILIE	9
3.3	TRAIL, FASL UND TNF-INDUZIERTER SIGNALWEGE	11
3.3.1	<i>Fas/Apo1-vermittelte Apoptose</i>	12
3.3.2	<i>NFκB- und JNK-Aktivierung durch TNF</i>	13
3.3.3	<i>TRAIL-induzierte Signalwege</i>	15
3.4	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
4	MATERIAL UND METHODEN	17
4.1	REAGENTIEN	17
4.1.1	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	17
4.1.2	<i>Lösungen und Puffer</i>	17
4.1.3	<i>Antikörper</i>	18
4.1.4	<i>Expressionsvektoren</i>	18
4.1.5	<i>Zelllinien</i>	19
4.2	EXPERIMENTALMETHODEN	19
4.2.1	<i>Kultivierung eukaryontischer Zellen</i>	19
4.2.2	<i>Stabile Transfektion eukaryontischer Zellen</i>	19
4.2.3	<i>Analyse und Anreicherung transfizierter Zellen mit Durchflusszytometrie</i>	20
4.2.4	<i>IL-6 Assay</i>	20
4.2.5	<i>Western-Blot (Towbin et al., 1979)</i>	21
4.2.5.1	<i>SDS-Page</i>	21
4.2.5.2	<i>Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose</i>	21
4.2.5.3	<i>Immunofärbung von Proteinen</i>	21
4.2.6	<i>Transienter Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB</i>	22
4.2.7	<i>JNK - Assay</i>	23
4.2.7.1	<i>Aufreinigung des GST-Jun-(1-87)-Fusionsproteins</i>	23
4.2.7.2	<i>Assay zum Nachweis der JNK-Aktivierung</i>	23
4.2.8	<i>Zytotoxizitäts-Assays</i>	24
4.2.8.1	<i>Kristallviolett-Zytotoxizitäts-Assay</i>	24
4.2.8.2	<i>MTT-Zytotoxizitäts-Assay</i>	24
5	ERGEBNISSE	25
5.1	TRAIL AKTIVIERT DIE JNK	25
5.2	TRAIL-INDUZIERTER JNK-AKTIVIERUNG KANN JE NACH ZELLTYP CASPASE-ABHÄNGIG ODER CASPASE-UNABHÄNGIG ERFOLGEN	27
5.3	DIE TRAIL- UND ANTI-APO-1-INDUZIERTER APOPTOSE UND DIE DAMIT VERBUNDENE AKTIVIERUNG APOPTOTISCHER CASPASEN, WIRD DURCH GFP- Δ FADD ÜBEREXPRESSION INHIBIERT, DIE CASPASE-ABHÄNGIGE JNK-AKTIVIERUNG WIRD JEDOCH NICHT BEEINFLUSST	29
5.4	TRAIL UND ANTI-APO-1 AKTIVIEREN DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF κ B	33
5.5	TRAF2(87-501) INHIBIERT DIE TRAIL- UND ANTI-APO-1-INDUZIERTER NF κ B AKTIVIERUNG	34
5.6	ÜBEREXPRESSION DER FADD TODESDOMÄNE AKTIVIERT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF κ B	35
5.7	FAS Δ VERHINDERT NF κ B AKTIVIERUNG	37
5.8	DIE JNK WIRD NUR VON VERNETZTEM TRAIL AKTIVIERT	39
5.9	STIMULATION DES TRAIL-R2 ABER NICHT DES TRAIL-R1 FÜHRT ZUR AKTIVIERUNG DER JNK	40
6	DISKUSSION	45
7	LITERATURVERZEICHNIS	51

1 Abkürzungen

AICD	activation-induced cell death
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASK-1	apoptosis signal regulating kinase 1
BSA	Rinderserum Albumin
Casper	caspase-eight-related protein (= I-FLICE, FLAME-1, cFLIP, MRIT, CASH, Clarp)
CHX	Cycloheximid
CrmA	cytokine response modifier A
DcR1	decoy receptor 1 (=TRAIL-R3, TRID)
DcR2	decoy receptor 2 (=TRAIL-R4)
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR3	death receptor 3 (=Apo3, TRAMP, WSL-1, LARD)
DR4	death receptor 4 (=TRAIL-R1)
DR5	death receptor 5 (=TRAIL-R2, TRICK2, KILLER)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas-associating protein with a death domain (=MORT)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE (=MACH, caspase-8)
GCK	germinal center kinase
GCKR	germinal center kinase-related protein kinase
GITR	glucocorticoid-induced TNFR family related member
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEBS	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
hi FCS	Hitze-inaktiviertes fötales Kälber-Serum
HRP	horseradish peroxidase
HVEM	Herpesvirus entry mediator (=ATAR, TR2)
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICAD	inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
ICE	interleukin-1 β -converting enzyme
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IKAP	IKK-complex-associated protein
IKK α , β ,	I κ B Kinase α , β , (=IKK-1, IKK-2)
IKK γ	I κ B Kinase γ (=NEMO)
I κ B	inhibitor of κ B
IL	Interleukin
I-TRAF	TRAF-interacting protein (=TANK)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (=SAPK, stress-activated protein kinase)
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LIGHT	homologous to lymphotoxins, inducible expression, binds to HVEM, a receptor on T-lymphocytes
LMP1	latent infection membrane protein 1
LT	Lymphotoxin
LT β R	Lymphotoxin- β Rezeptor
MADD	MAP kinase activator with a death domain
MEKK1	MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase1
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NF κ B	nuclear factor κ B
NIK	NF κ B-inducing kinase
NPP	p-Nitrophenylphosphat
OPG	osteoprotegerin
PBA	PBS mit BSA und Azid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain (=CRADD)
RANK	receptor activator of NF κ B
RANK-L	RANK ligand (=TRANCE)
RIP	receptor interacting protein
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SODD	silencer of death domain
SMase	Sphingomyelinase
TANK	TRAF family member associated NF κ B activator (=I-TRAF)
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R1 (-2)	TNF-Rezeptor-1 (-2)
TRADD	TNF-R1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (=Apo2L)
TRAIL-R1	TRAIL receptor 1 (=DR4)
TRAIL-R2	TRAIL receptor 2 (=DR5, TRICK2, KILLER)
TRAIL-R3	TRAIL receptor 3 (=DcR1, TRID)
TRAIL-R4	TRAIL receptor 4 (=DcR2)
TRAMP	TNF receptor-related apoptosis-mediating protein (=DR3, Apo3, WSL-1, LARD)
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine (=RANK-L)
TRID	TRAIL receptor without an intracellular domain (=TRAIL-R3, DcR1)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRIP	TRAF-interacting protein
TWEAK	TNF related, weak ability to induce apoptosis
U	Unit
ün	über Nacht
zVAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton

2 Zusammenfassung

Die Liganden FasL und TRAIL, zwei Mitglieder der TNF-Familie, wurden bisher vor allem auf ihre apoptotischen Eigenschaften hin untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die nicht-apoptotischen Eigenschaften dieser Liganden, wie die Aktivierung der JNK und des Transkriptionsfaktors NF κ B, näher zu untersuchen.

Es konnte in dieser Hinsicht gezeigt werden, dass sowohl TRAIL als auch anti-APO-1 in der Lage waren die JNK zu aktivieren (anti-APO-1 ist ein agonistischer Antikörper, der anstatt des FasL zur Stimulation des Fas-Moleküls verwendet wurde). Im Vergleich zur transienten und schnellen TNF-induzierten JNK-Aktivierung waren die Aktivierungskinetiken der TRAIL- und anti-APO-1-induzierten JNK-Aktivierung langsam und lang anhaltend. Die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung erwies sich dabei, je nach Zelltyp, als Caspase-abhängig oder -unabhängig. Dies zeigt, dass TRAIL zwei Signalwege zur Aktivierung der JNK induzieren kann. Da die untersuchten Zellen alle vier TRAIL-Rezeptoren exprimierten, ist es unwahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede auf die Stimulierung unterschiedlicher TRAIL-Rezeptoren zurückzuführen ist.

So zeigten auch Studien mit TRAIL-R1- und -2-spezifischen Seren, dass für die Aktivierung der JNK nur der TRAIL-R2 verantwortlich ist, wohingegen die Aktivierung von NF κ B durch beide TRAIL-Rezeptoren vermittelt werden kann.

In HeLa-Zellen induzieren TRAIL und anti-APO-1 in der Anwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors CHX Apoptose. Wurden HeLa-Zellen jedoch mit CHX und dem Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk behandelt, konnte in diesen Zellen sowohl mit TRAIL, als auch mit anti-APO-1 der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert werden. Dieser Befund läßt den Schluß zu, dass die Aktivierung von NF κ B kein Epiphenomen der Apoptose ist, da diese durch z-VAD-fmk verhindert wird. Da jedoch die NF κ B-Aktivierung nur bei gleichzeitiger Behandlung mit CHX zu beobachten war, liegt der Schluß nahe, dass die Konzentration eines intrazellulären Inhibitors der TRAIL- und anti-APO-1-induzierten NF κ B-Aktivierung durch den Proteinsyntheseinhibitor verringert wird, so dass die Aktivierung stattfinden kann.

3 Einleitung

3.1 TRAIL und FasL, zwei Zytokine der TNF Familie

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) und FasL sind zwei Zytokine der TNF-Ligandenfamilie, deren Mitglieder eine wichtige Rolle bei proinflammatorischen und immunregulatorischen Prozessen spielen. Eine Übersicht über die Moleküle der TNF-Ligandenfamilie und der dazugehörigen Rezeptoren findet sich in Abb. 1.

Die Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie besitzen einen ca. 145 AS umfassenden homologen C-Terminus, und werden mit Ausnahme von Lymphotoxin α zunächst als Typ II Membranproteine exprimiert. Durch Metalloproteasen-vermittelte Spaltung können jedoch auch lösliche Liganden aus diesen membranständigen Molekülen entstehen, wie es z.B. für TNF und FasL gezeigt wurde (Perez et al., 1990, Tanaka et al., 1998). Die Bioaktivität des membranständigen und des davon abgeleiteten löslichen Zytokins können dabei stark variieren. So bindet lösliches TNF bevorzugt an den TNF-R1, während membranständiges TNF beide TNF-Rezeptoren aktivieren kann (Grell et al., 1995; Grell et al., 1998). Die Aufklärung der Struktur von TNF (Jones et al., 1989), LT α (Eck and Sprang, 1989), CD40L (Bazan et al., 1993; Karpusas et al., 1995) und TRAIL (Cha et al., 1999, Hymowitz et al., 1999) lässt darauf schließen, dass diese Liganden als Homotrimere biologisch aktiv sind. TRAIL wurde in einer EST (expressed sequence tag)-Datenbank gefunden, die mit einer Sequenz aus der oben beschriebenen homologen Domäne der TNF-Liganden-Familie durchsucht wurde (Wiley et al., 1995). TRAIL weist die größte Homologie zu FasL (28 %) auf.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen der TNF-Ligandenfamilie, deren Expression reguliert ist und die zum Teil nur transient auf aktivierten Zellen exprimiert werden, konnte TRAIL-mRNA in vielen unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden (Wiley et al., 1995). Eine weitere Besonderheit von TRAIL ist, dass dieses Zytokin, nach vorliegenden ersten Daten, nur auf Tumorzellen und transformierten Geweben Apoptose induziert (Wiley et al., 1995), nicht aber auf normalen, gesunden Geweben.

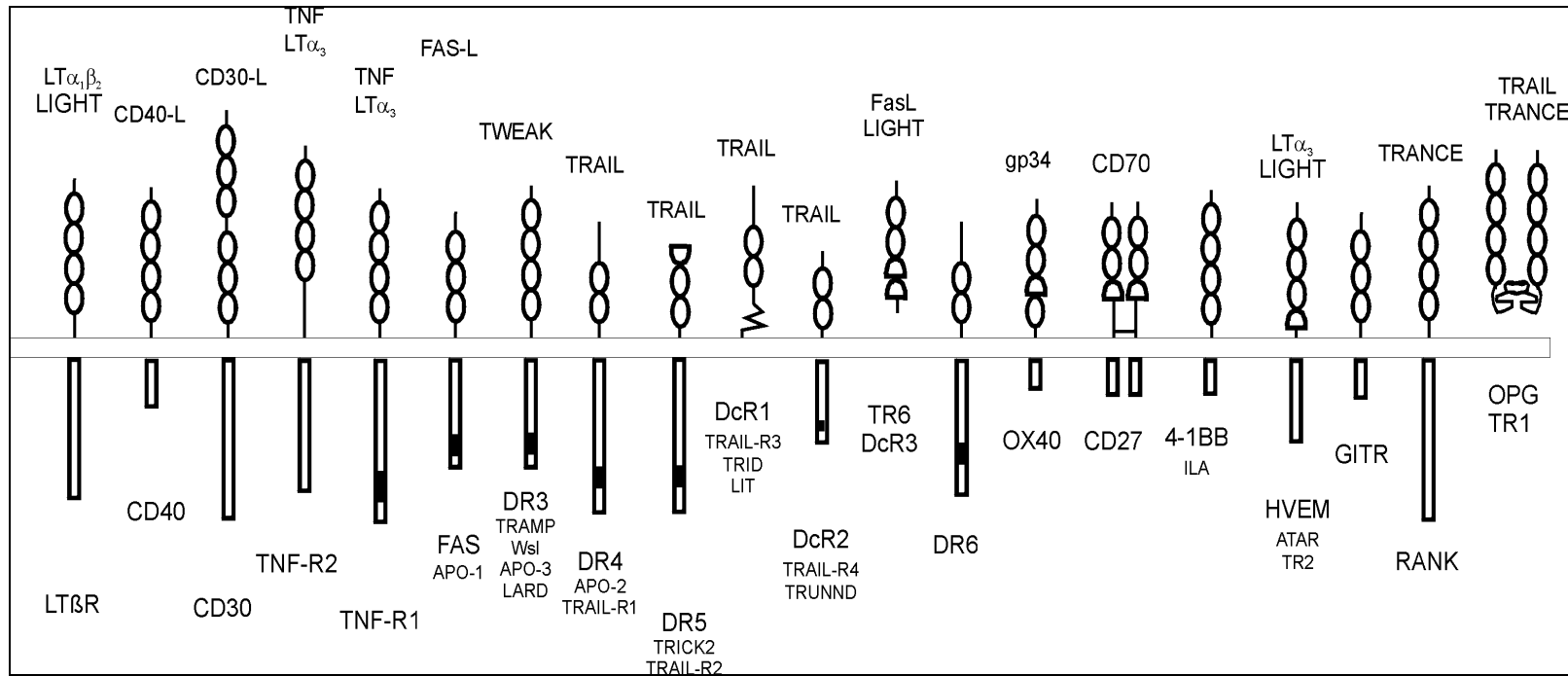


Abb. 1: Die Rezeptoren der TNF-Rezeptor -Familie und ihre Liganden.

Die cysteinreichen Subdomänen im extrazellulären Bereich sind in Form von Ellipsen dargestellt. Die Todesdomäne im intrazellulären Bereich der Todesdomäne-Rezeptoren ist schwarz dargestellt. Der weiße Balken symbolisiert die Zellmembran. Da einige Rezeptoren von verschiedenen Gruppen gleichzeitig identifiziert wurden, tragen sie mehrere Namen.

Der FasL wurde, wie TRAIL, als ein primär apoptotisches Molekül beschrieben und ist ein wichtiges Zytokin des Immunsystems. So vermittelt der FasL z.B. maßgeblich den „Aktivierungs-induzierten Zelltod“ (AICD) von T-Lymphozyten (Alderson et al., 1995; Dhein et al., 1995; Brunner et al., 1995; Ju et al., 1995). Des Weiteren trägt die Expression des FasL im Auge oder Testis zur Immunprivilegierung dieser Gewebe bei (Bellgrau et al., 1995; Griffith et al., 1995). Membranständiger FasL kann durch eine Metalloprotease zu löslichem FasL prozessiert werden. Löslicher FasL hat im Vergleich zu seiner membranständigen Form eine bis zu 1000-fach niedrigere Aktivität und kann als Antagonist für die membranständige Form wirken (Schneider et al., 1998).

3.2 TRAIL-Rezeptoren und Fas/Apo1 sind Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie

Die Zytokine der TNF-Ligandenfamilie vermitteln ihre Wirkung durch Binden an eine komplementäre Familie von Rezeptoren, den Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie (Abb. 1). Hierbei handelt es sich typischerweise um Typ I-Transmembranproteine, die im extrazellulären Bereich 2-6 Kopien einer cysteinreichen Subdomäne aufweisen, die aus ca. 40 AS mit 6 konservierten Cysteinen besteht (Smith et al., 1994). Weitere Sequenzhomologien, die sich in allen Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie finden, gibt es nicht. Einige dieser Rezeptoren besitzen jedoch ein intrazelluläres, ca. 80 AS umfassendes Sequenzmotiv, das als Todesdomäne bezeichnet wird. Wie der Name schon sagt, handelt es sich hier um ein Strukturmotiv, das essentiell für die Vermittlung von Apoptose sein kann. Identifiziert wurde es zuerst bei der Analyse von Deletionsmutanten des Fas/Apo1-Moleküls (Itoh and Nagata, 1993). Die Deletion dieses ca. 80 AS großen Bereiches, oder eine inaktivierende Punktmutation in dieser Domäne, wie sie sich in Fas-Molekülen von lpr-Mäusen findet (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Takahashi et al., 1994), verhindern die Fas-FasL-vermittelte Apoptose. Bis heute konnten durch Struktur und Sequenzanalysen sechs Todesdomäne-Rezeptoren identifiziert werden: TNF-R1, Fas/Apo1, DR3/TRAMP/Apo-3/LARD/Wsl (Chinnaiyan et al., 1996a; Bodmer et al., 1997; Sreaton et al., 1997a; Marsters et al., 1996a; Kitson et al., 1996), TRAIL-R1/Apo2/DR4 (Pan et al., 1997a; Schneider et al., 1997), TRAIL-R2/DR5/TRICK2 (Walczak et al., 1997; Sreaton et al., 1997b; Chaudhary et al., 1997; Schneider et al., 1997; MacFarlane et al., 1997) und DR6 (Pan et al., 1998a). Untersuchungen mittels des Two-Hybrid Systems und Analyse von Deletionsmutanten sowie chimären Rezeptoren zeigten, dass die Todesdomänen von Rezeptoren autoaggregieren können (Song et al., 1994; Boldin et al., 1995; Bazzoni et al., 1995). Die Autoaggregation ist ein zentraler Schritt bei der Induktion der Apoptose, *in vivo* findet diese aber erst nach Rezeptoroligomerisierung durch den Liganden oder einen agonistischen Antikörper statt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass im Falle des TNF-R1 und des DR3 ein Molekül

genannt SODD (silencer of death domain) die Autoaggregation der Todesdomäne in unstimulierten Zellen verhindert, indem es selbst an sie bindet (Jiang et al., 1999). Über homophile Wechselwirkungen binden nach Rezeptorstimulation intrazelluläre, ebenfalls eine Todesdomäne enthaltende Adaptormoleküle an die Todesdomäne-Rezeptoren. Diese Adaptormoleküle vermitteln dann die Rekrutierung weiterer Moleküle, die in den meisten Fällen zur proapoptotischen Caspase-Familie gehören. Die Funktion der Todesdomäne-Rezeptoren beschränkt sich aber nicht nur auf die Induktion der Apoptose. Zwar wurden die meisten Todesdomäne-Rezeptoren, insbesondere Fas, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, vor allem auf ihre apoptotischen Eigenschaften hin untersucht, aber zumindest für den TNF-R1 konnte auch eine Vielzahl nicht-apoptotischer Funktionen gezeigt werden (Ware et al., 1998).

Die nicht-apoptotischen Signalwege der TNF-Rezeptor Familie werden vor allem durch die Bindung von Mitgliedern der TRAF (TNF Receptor Associated Factor) Familie aktiviert (Übersicht in: Wajant et al., 1999). Diese Moleküle können im Falle der Rezeptoren, die keine Todesdomäne besitzen, direkt binden, während sie bei Todesdomäne-Rezeptoren indirekt über die Assoziation an Todesdomäne-enthaltende Adaptormoleküle in den Rezeptorsignalkomplex rekrutiert werden. Gemeinsames Strukturmotiv der TRAF-Moleküle ist die TRAF-Domäne, die erstmals für die TNF-R2 bindenden Moleküle TRAF1 und 2 beschrieben wurde (Rothe et al., 1994). Mit Ausnahme des TRAF1 befindet sich im N-terminalen Bereich der TRAF-Moleküle ein RING-Finger Motiv, auf das ein bis sieben Zink-Finger folgen. TRAF1 besitzt hingegen nur einen einzelnen Zink-Finger im N-Terminus.

Neben den Todesdomäne-enthaltenden Adaptormolekülen und den TRAF's wurden noch weitere, an Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie bindende Moleküle beschrieben, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

Für TRAIL wurden bisher fünf Rezeptoren identifiziert, die alle zur TNF-Rezeptor Familie gehören. Der TRAIL-R1 besitzt eine Todesdomäne, die der im TNF-R1 und der im DR3 sehr ähnelt (Pan et al., 1997a). Kurz nach der Identifikation des TRAIL-R1 wurde der TRAIL-R2 isoliert, der zu 53 % homolog zum TRAIL-R1 ist und ebenfalls eine Todesdomäne besitzt (Pan et al., 1997b; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997; Screaton et al., 1997b; Chaudhary et al., 1997; Schneider et al., 1997; MacFarlane et al., 1997). Interessanterweise werden diese TRAIL-Rezeptoren in den gleichen Geweben wie TRAIL selbst exprimiert. Der TRAIL-R4 besitzt nur eine inkomplette, apoptotisch nicht funktionelle Todesdomäne (Degli-Esposti et al., 1997b; Pan et al., 1998b; Marsters et al., 1997b), während der TRAIL-R3 keine intrazelluläre Domäne besitzt und über einen Glykophosphatidylinositol-Rest in der Zellmembran verankert ist (Pan et al., 1997b; Sheridan et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997a). Der fünfte TRAIL-Rezeptor, OPG (Osteoprotegerin), wurde zuerst aufgrund seiner Eigenschaft RANK-L zu binden beschrieben, und ist an der Regulation der

Osteoklastendifferenzierung beteiligt (Simonet et al., 1997). TRAIL bindet aber nicht den RANK-Rezeptor, der von OPG verschieden ist (Emery et al., 1998). Für die TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 sowie für OPG wird eine Rolle als „Decoy“-Rezeptoren für die apoptotischen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 diskutiert (Schulze-Osthoff et al., 1998). So schützt die Überexpression des TRAIL-R4 MCF7-, 293- und HeLa-Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose. Allerdings korreliert die Expression dieser postulierten „Decoy“-Rezeptoren nicht immer mit der Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose.

Der Rezeptor für den FasL wurde bereits vor der Identifikation des Liganden mit einem Apoptose-induzierenden, monoklonalen Antikörper identifiziert (Nagata and Goldstein, 1995; Trauth et al., 1989). Auch er gehört zu den Todesdomäne-Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie. Neben Fas/Apo1 kann auch ein löslicher, als DcR3 bezeichneter „Decoy“-Rezeptor an den FasL binden, und so die Wirkung der Fas/Apo1–FasL Wechselwirkung antagonisieren (Pitti et al., 1998).

3.3 TRAIL, FasL und TNF-induzierte Signalwege

Die Mechanismen über die zytoplasmatische Todesdomäne-Adaptormoleküle oder Mitglieder der TRAF-Familie nach Rekrutierung in den Rezeptorsignalkomplex zur Aktivierung der intrazellulären Signalwege, wie Induktion der Apoptose oder Geninduktion, beitragen, ist am Besten für die Fas/Apo1-induzierte Apoptose und die TNF-R1-vermittelte NF κ B-Aktivierung aufgeklärt worden.

Ein gemeinsames Merkmal aller Todesdomäne-Rezeptoren ist, dass sie nach Stimulation Caspasen aktivieren können. Dies konnte durch spezifische Caspase-Inhibitoren wie zum Beispiel CrmA (Cowpox viral protein Cytokine response modifier A) oder inhibitorische Peptide wie z-VAD-fmk gezeigt werden (Miura et al., 1995; Tewari and Dixit, 1995; Marsters et al., 1996b; Bodmer et al., 1997; Chinaiyan et al., 1996; Pan et al., 1997a; Walczak et al., 1997; Pan et al., 1998a). Caspasen sind Cystein-Proteasen, denen eine Schlüsselrolle bei der Induktion der Apoptose beigemessen wird (Henkart, 1996). Caspasen werden als inaktive Procaspasen synthetisiert. Nach Rezeptoroligomerisierung werden sogenannte Initiator-Caspasen in den Rezeptorsignalkomplex rekrutiert. Dort werden diese durch autoproteolytische Spaltung aktiviert. Aktive Initiator-Caspasen spalten nun ihrerseits weitere Procaspasen, die sogenannten Effektor-Caspasen. Die Namen Initiator- und Effektor-Caspasen deuten auf die Substrate dieser Moleküle hin: Während die Initiator-Caspasen eine Caspase-Kaskade durch Spaltung weiterer Caspasen initiieren, spalten Effektor-Caspasen Moleküle wie Poly (ADP)-Ribose-Polymerase, Gelsolin, ICAD (Inhibitor of caspase-activated desoxyribonuclease) oder Lamine, die dann direkt für die Ausbildung der

apoptotischen Merkmale verantwortlich sind (Übersicht in: Li and Yuan, 1999, Schulze-Osthoff et al., 1998).

3.3.1 Fas/Apo1-vermittelte Apoptose

Wie bereits beschrieben, ist der FasL als membranständiges Molekül aktiv. Die lösliche Form des Liganden, genauso wie der „Decoy“-Rezeptor DcR3 antagonisieren die Wirkung des membranständigen FasL (Schneider et al., 1998; Pitti et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich oligomerisierte Fas/Apo1-Moleküle in der Lage sind den als „death inducing signalling complex“ (DISC) bezeichneten Rezeptorsignalkomplex zu bilden, der zur Induktion der Apoptose führt (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997). In diesem Komplex finden sich das Todesdomäne-Adaptormolekül FADD, Caspase-8 und FLASH (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997; Imai et al., 1999). Die Bindung des Adaptormoleküls FADD an Fas/Apo1 erfolgt über homophile Wechselwirkungen der Todesdomänen. Die Initiator-Caspase-8 wird als Procaspase über den N-terminalen Bereich des FADD-Moleküls und einem dazu homologen Bereich im N-terminalen Bereich der Caspase-8 sekundär in den DISC rekrutiert. Eine FADD-Mutante, der dieser zur Caspase-8 homologe Teil fehlt, wirkt daher dominant-negativ auf die Fas/Apo1-induzierte Apoptose, weswegen man diese Domäne auch als „death effector domain“ (DED) bezeichnet (Wajant et al., 1998). Im DISC wird die Proform der Caspase-8 autokatalytisch gespalten, und aus den Untereinheiten formieren sich die aktiven Heterotetramere der Caspase-8. Wie bereits erwähnt, spaltet diese nun weitere proapoptotische Caspasen, so dass die Caspase-Kaskade aktiviert wird. In einigen Zelllinien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fas/Apo1-induzierte Aktivierung der Caspase-8 nicht direkt zur Aktivierung der apoptotischen Caspase-Kaskade führt. In diesen Zellen führt die Caspase-8-Aktivierung durch Spaltung von BID, einem Molekül der Bcl-Familie, zur Depolarisierung der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Cytochrom C (Li et al., 1998; Scaffidi et al., 1998). Cytochrom C bindet im Zytoplasma an das proapoptotische Molekül Apaf-1 und an ATP (Liu et al., 1997; Zou et al., 1997). Der entstehende Komplex ist dann in der Lage Caspase-9 zu binden und durch proteolytische Spaltung zu aktivieren (Li et al., 1997). Die aktive Caspase-9 spaltet nun weitere Caspasen, insbesondere Caspase-3, eine zentrale Effektor-Caspase des apoptotischen Programms (Zou et al., 1997; Li et al., 1997).

Bcl_{xl} und Bcl2 sind zwei weitere Mitglieder der Bcl-Familie. Im Gegensatz zu BID verhindern diese mitochondrialen Proteine aber den zuletzt beschriebenen Signalweg zur Induktion der Apoptose über das Mitochondrium (wie ist noch nicht bekannt). Durch Überexpression von Bcl_{xl} oder Bcl2 kann man also die beiden durch FAS/Apo1-induzierten, apoptotischen Signalwege unterscheiden. Verhindert die Überexpression dieser Proteine die direkte

Apoptose durch die Caspase-8 induzierte Caspase-Kaskade, wird in der Zelle vor allem über die Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Aktivierung der Caspase-9 die Apoptose induziert. Sterben die Zellen trotz der Überexpression von Bcl_{xl} oder Bcl2 nach Stimulation von Fas/Apo1, wird die Apoptose durch direkte Aktivierung der Caspase-Kaskade induziert (Scaffidi et al., 1998).

3.3.2 NFκB- und JNK-Aktivierung durch TNF

Der TNF-R1 ist neben der Induktion der Apoptose auch intensiv auf seine geninduktiven Eigenschaften hin untersucht worden, und so sind die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und der Stress-induzierten c-jun-Kinase (JNK) durch TNF molekular gut verstanden. Die Aktivierung der JNK und des Transkriptionsfaktors NFκB werden über das Todesdomäne-Adaptormolekül TRADD vermittelt, das nach Oligomerisierung des TNF-R1 in den Rezeptorkomplex rekrutiert wird. TRAF2 kann über seine TRAF-Domäne an den N-terminalen Teil von TRADD binden. Die gleichzeitige Wechselwirkung von TRADD mit RIP, einem weiteren Todesdomäne-Adaptormolekül, über die homophile Interaktion zwischen den Todesdomänen (Hsu et al., 1996b; Liu et al., 1996) und die zusätzliche Interaktion von RIP mit TRAF2 führt zur Rekrutierung der Kinasen NIK und ASK-1 an TRAF2 und zu deren Aktivierung. Für die Bindung von NIK sind dabei nicht nur die TRAF-Domäne des TRAF2 Moleküls, sondern auch weitere N-terminale Regionen notwendig. Die beiden Kinasen stellen den Scheideweg zwischen NFκB- und JNK-Aktivierung dar: NIK ist für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB verantwortlich, ASK-1 induziert die JNK.

Die Rolle von RIP und TRAF2 bei der Induktion dieser beiden Signalwege wirft aber noch Fragen auf. Mutationsanalysen des TRAF2-Moleküls haben gezeigt, dass für die Induktion des Transkriptionsfaktors NFκB der RING-Finger am N-Terminus und die beiden ersten Zn-Finger des Moleküls essentiell sind (Takeuchi et al., 1996). Die Überexpression einer Deletionsmutante von TRAF2, der die RING-Finger-Struktur fehlt, wirkt sich daher dominant-negativ auf die TNF-induzierte NFκB-Aktivierung aus. In Zellen aus TRAF2^{-/-} Mäusen oder Mäusen, die die oben beschriebene dominant-negative TRAF2-Mutante exprimieren, kann TNF aber noch immer die Aktivierung des Transkriptionsfaktors induzieren. In Zellen aus RIP^{-/-} Mäusen hingegen ist die TNF-induzierte NFκB-Aktivierung blockiert, was zeigt, dass für die Induktion von NFκB *in vivo* RIP essentiell ist (Yeh et al., 1997; Lee et al., 1997; Kelliher et al., 1998). Bei der Aktivierung der JNK verhält es sich dagegen genau umgekehrt. In den TRAF2^{-/-} Mäusen findet man keine Aktivierung der JNK mehr, während die RIP^{-/-} Mäuse in dieser Hinsicht nicht defizient sind (Yeh et al., 1997; Lee et al., 1997; Kelliher et al., 1998).

NIK, dessen Überexpression die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B induziert, ist eine Serin-Threonin-Kinase, die Homologien zu MAPKK-Kinasen aufweist. Die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von NIK kann die durch Überexpression des TNF-R1, TRADD oder TRAF2 induzierte NF κ B-Aktivierung verhindern. Es ist noch nicht geklärt, wie die Interaktion von NIK mit TRAF2 nach Rezeptoroligomerisierung zur Aktivierung der Kinase führt. NIK bindet und phosphoryliert zwei weitere Kinasen, IKK α und β , die zusammen mit NIK und einigen anderen Struktur-Proteinen wie NEMO (NF κ B essential modulator = IKK γ , Yamaoka et al., 1998; Rothwarf et al., 1998) und IKAP (IKK-complex-associated protein, Cohen et al., 1998) einen 900 kDa großen, IKK-Komplex genannten Kinase-Komplex bilden (Regnier et al., 1997; DiDonnato et al., 1997; Woronicz et al., 1997). Wird dieser IKK-Komplex durch die Phosphorylierung von IKK α und β aktiviert, phosphorylieren die beiden IKK-Kinasen anschließend Inhibitor-Proteine, die durch Binden an den Transkriptionsfaktor NF κ B dessen Aktivierung verhindern. Diese Inhibitoren, I κ B α und β genannt, werden nach ihrer Phosphorylierung ubiquitinyliert und in Proteasomen degradiert. Der „freigesetzte“ Transkriptionsfaktor NF κ B kann im Zellkern an die DNA binden, und NF κ B-abhängige Gene aktivieren (Malinin et al., 1997; Maniatis, 1997; Stancovski and Baltimore, 1997). Bisher wurde die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B so verstanden, dass die Inhibitoren I κ B α und β die Translokation von NF κ B in den Zellkern verhindern und dass der Abbau der Inhibitoren es NF κ B über seine nun zugängliche NLS (nuclear location sequence) ermöglicht in den Zellkern zu gelangen. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass sowohl die Inhibitoren I κ B α und β als auch I κ B α -NF κ B-Komplexe kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und her-translozieren, und dass I κ B α -NF κ B-Komplexe nach TNF-Stimulation im Zellkern aktiviert werden können (Johnson et al., 1999). Dies ergibt ein Bild eines dynamischen „Shuttle“-Mechanismus zwischen Zytoplasma und Zellkern sowohl für I κ B α als auch I κ B α -NF κ B-Komplexe. Über den oben beschriebenen Signalweg hinaus wurden in letzter Zeit alternative TNF-R1-vermittelte NF κ B-Aktivierungswege beschrieben. So kann zum Beispiel die atypische Proteinkinase ζ (PKC ζ) über ein Adaptorprotein p62, welches wiederum an das schon beschriebene Protein RIP binden kann, in den TNF-R1-Rezeptorkomplex rekrutiert werden. PKC ζ phosphoryliert anschließend IKK β , was zur Aktivierung von NF κ B über den aktiven IKK-Komplex in der schon beschriebenen Weise führt (Sanz et al., 1999, Lallena et al., 1999). Ein weiterer für die TNF-induzierte Aktivierung von NF κ B essentieller Signalweg scheint die Aktivierung der Akt-Kinase zu sein. Diese Kinase ist ein Substrat für die PI(3)-Kinase, die nach TNF-Stimulation aktiviert wird (Ozes et al., 1999). Nach diesem Modell sind zwei Phosphorylierungsschritte für die Aktivierung des IKK-Komplexes nötig: zum einen die schon beschriebene

Phosphorylierung von IKK β durch NIK, die durch den TRADD-TRAF2-RIP-Komplex aktiviert wird, und zum anderen die Phosphorylierung von IKK α durch Akt, die über die PI(3)-Kinase aktiviert wird.

NF κ B besteht vorwiegend aus p50/p65 Heterodimeren, die Mitglieder der Rel-Familie sind (Beg et al., 1993; Beg and Baldwin, 1994). Neben der Bindung von NF κ B an die DNA ist die Phosphorylierung der p65 Untereinheit für den Start der Transkription essentiell (Beyaert et al., 1996; Vanden Berghe et al., 1998; Bergmann et al., 1998). Durch einen spezifischen Inhibitor für die p38-Kinase konnte gezeigt werden, dass der p38-MAP-Kinase-Signalweg für dieses zweite, für den Transkriptionsstart essentielle Signal verantwortlich ist (Vanden Berghe et al., 1998). Unter anderem wurde die ASK-1-Kinase als Aktivator des p38-Signalweges beschrieben. Da ASK-1 über TRAF2 aktiviert wird, könnte so der TNF-R1 diesen Signalweg aktivieren.

Die Aktivierung der JNK durch den TNF-R1 erfolgt, wie schon beschrieben, über das Adaptorprotein TRADD und die Moleküle TRAF2 und RIP. Dieser Signal-Komplex ist in der Lage die Kinase ASK-1 zu binden, die durch Induktion weiterer Kinasen die JNK aktiviert (Nishitoh et al., 1998). Wie ASK-1 durch Bindung an TRAF2 aktiviert wird, ist noch unklar. Kinase-inaktive Mutanten der Kinasen GCKR (germinal center kinase related, Shi and Kehrl, 1997; Yuasa et al., 1998) und MEKK1 (MAPK/extracellular signal regulated kinase kinase 1, Song et al., 1997; Baud et al., 1999) konnten die durch Überexpression von TRAF2 induzierte JNK-Aktivierung hemmen, was für eine Rolle dieser Kinasen bei der TNF-induzierten JNK-Aktivierung spricht. Für MEKK1 konnte zudem, wie für ASK-1, eine Bindung an TRAF2 nachgewiesen werden (Baud et al., 1999).

3.3.3 TRAIL-induzierte Signalwege

Wie schon beschrieben ist TRAIL in der Lage auf Tumorzellen oder transformierten Zellen Apoptose zu induzieren (Pitti et al., 1996), wohingegen normale, nicht-transformierte Gewebe gegenüber den toxischen Eigenschaften von TRAIL resistent sind. Des weiteren induziert TRAIL in Tierexperimenten auch keine inflammatorischen Zellaktivierungen (Walczack et al., 1999; Ashkenazi et al., 1999), die eine wesentliche Ursache von Nebenwirkungen bei TNF-Applikationen darstellen. Die TRAIL-R1- und TRAIL-R2-induzierte Apoptose wird, wie schon für Fas/Apo1 beschrieben, ebenfalls durch die Spaltung der Caspase-8 und der anschließenden Induktion der Effektor-Caspasen aktiviert (Griffith et al., 1998a). Welche Moleküle aber im Rezeptorsignalkomplex dieser Rezeptoren lokalisiert sind und wie die Caspase-8 aktiviert wird, ist noch unklar. Transiente Überexpression des TRAIL-R1 führt in FADD -/- Fibroblasten zur Induktion des apoptotischen Prozesses. Dies lässt vermuten, dass das Molekül FADD, das schon als ein essentielles Adaptorprotein für die

Fas/Apo1-induzierte Apoptose beschrieben wurde, bei der TRAIL-R1-vermittelten Apoptose keine Rolle spielt (Yeh et al., 1998, Zhang et al., 1998). Auf der anderen Seite kann die Überexpression einer dominant-negativen Mutante von FADD die TRAIL-induzierte Apoptose verhindern (Walczak et al., 1997; Chaudhary et al., 1997; Schneider et al., 1997; Wajant et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass zumindest der TRAIL-R2 über FADD signalisiert, oder dass ein FADD-verwandtes Molekül an der TRAIL-induzierten Apoptose beteiligt ist.

3.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie schon beschrieben, wurden bisher vor allem die apoptotischen Eigenschaften der Liganden FasL und TRAIL untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die nicht-apoptotischen Eigenschaften dieser Liganden, wie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B oder der JNK näher zu untersuchen. Da TRAIL als ein potentiell Tumorthapeutikum gehandelt wird, ist es z.B. zur Abschätzung von möglichen Nebenwirkungen von Vorteil, möglichst viel über die von diesem Liganden induzierten Signalwege zu wissen.

4 Material und Methoden

4.1 Reagentien

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Zellkulturplatten und -flaschen	Greiner, Frickenhausen
RPMI 1640	Seromed, Berlin
Click RPMI	"
DMEM	GIBCO BRL, Gaithburg, MD, USA
hi FCS	Seromed, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	"
EDTA-Lösung	"
HBSS	"
HBSS ohne Phenolrot	"
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
TEMED	"
IL-6-ELISA-Testkit	PharMingen, San Diego, USA
(γ ³² P) ATP (10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Blotting-Papier Whatman 3 MM Chr	Whatman International, England
Nitrozellulose	Schleicher und Schuell,
Protein-G-Sepharose	Pharmacia LKB, Freiburg
Protein A Sepharose	BIO-RAD Laboratories, Richmond, USA
Gluthation Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Protease-Inhibitoren (PMSF, NaF, Na-orthovanadat, Leupeptin)	Boehringer, Mannheim
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg
NBT	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
BCIP	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
G418	Boehringer, Mannheim
MTT	Sigma, Deisenhofen

Rekombinantes TRAIL mit N-terminalem "Flag-tag" wurde von Dr. Pascal Schneider, Institut für Biochemie, Universität von Lausanne, Epalinges, Schweiz zur Verfügung gestellt.

TRAIL-LZ wurde von C. A. Smith, Immunex, Seattle, USA, zur Verfügung gestellt.

Alle anderen Reagenzien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

4.1.2 Lösungen und Puffer

Phosphat gepufferte Saline (PBS)	20 mM Na-Phosphat, 0,7 % NaCl, pH 7,2
PBS-T	1x PBS, 0,05 % (v/v) Tween-20
MTPBS	150 mM NaCl, 16 mM Na ₂ HPO ₄ , 4 mM NH ₂ PO ₄ , pH 7,3
TBE (10x)	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 25 mM Na ₂ EDTA, pH 8,3
TBS (10x)	0,2 M Tris, 8 % NaCl, pH 7,6
TBS-T	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20
2x Probenpuffer (SDS-PAGE)	0,02 M Tris, 0,002 M EDTA, 0,07 M SDS, 0,04 M DTT, 2,2 M Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8
Sammelgellösung (SDS-PAGE)	6 % Polyacrylamid in 125 mM Tris, 3,75 mM SDS, pH 6,8
Trenngellösung (SDS-PAGE)	12 % Polyacrylamid in 375 mM Tris, 3,75 mM SDS, pH 8,8
Ammoniumpersulfatlösung	10 % (w/v) APS
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,004 M SDS, pH 8,3

Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3
Puffer A (JNK-Zellaufschluss)	200 mM TRIS pH 7,4, 5 mM MgCl ₂ , 1 % Triton X100, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 mM Na-orthovanadat, 1 mM NaF, 10 pg/ml Leupeptin
JNK-Phosphorylierungspuffer	20 mM Mops pH 7,2, 2 mM EGTA, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0,1 % TritonX100
AP-Färbepuffer	100 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg RNAse A / ml, pH 8,0
MTT-Lysispuffer	10 % (w/v) SDS, 20 mM HCl, pH 4,5
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue 2 mg/ml, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol

4.1.3 Antikörper

anti-muriner Fas Ak (Hamster-IgG)	PharMingen, San Diego, USA
FITC-konjugierter anti-muriner Fas Ak (Hamster-IgG)	PharMingen, San Diego, USA
Maus anti-humaner TRAIL-R1 (IgG2a)	Geschenk Immunex, Seattle, USA
Maus anti-humaner TRAIL-R2 (IgG1)	Geschenk Immunex, Seattle, USA
Maus anti-humaner TRAIL-R3 (IgG1)	Geschenk Immunex, Seattle, USA
Maus anti-humaner TRAIL-R4 mAK (IgG1)	Geschenk Immunex, Seattle, USA
Kaninchen anti-humaner JNK1 polyklonaler Ak	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Maus anti-humaner Caspase-3 mAK (IgG2a)	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Maus anti-humaner Caspase-8 mAK (IgG2a)	Geschenk Prof. Dr. Schulze-Osthoff, Institut für Innere Medizin, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
Ratte anti-humaner IL-6 mAK (IgG1)	PharMingen, San Diego, USA
Biotinylierter Ratte anti-humaner IL-6 mAK (IgG2a)	PharMingen, San Diego, USA
Kaninchen anti-Maus IgG-AP	Sigma, Deisenhofen
FITC-konjugierter Ziege anti-Maus-Ig Ak (IgG und IgM)	Dianova, Hamburg
Maus Kontrollantikörper (IgG1)	Sigma, Deisenhofen
Maus Kontrollantikörper (IgG2a)	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen anti-GFP polyklonaler Ak	Böhringer, Mannheim
Maus anti-GFP mAK	Böhringer, Mannheim

4.1.4 Expressionsvektoren

Das NFκB-Reporterplasmid wurde freundlicherweise von Dr. Bernd Baumann, Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ), Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Das β-Galactosidase Reporterplasmid pCH110 (Amersham Pharmacia Biotech) enthält das LacZ Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40-Promotors. Dieses Konstrukt wurde als interner Standard und als Kontrolle der Transfektionseffizienz bei den transienten Reportergenassays zur Bestimmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB verwendet.

Das Plasmid für das GST-Jun-(1-87)-Fusionsprotein, pGex-c-Jun (1-87), wurde von I. Berberich, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Das TRAF2(87-501) Konstrukt wurde bereits beschrieben (Rothe et al., 1995).

Auch die FADD(80-208) und GFP- FADD(80-208) Konstrukte wurden bereits veröffentlicht (Wajant et al., 1998).

4.1.5 Zelllinien

HeLa- (humane Epithelzelllinie), 293- (humane Nierenzelllinie), Kym-1- (Rhabdomyosarcom-Zelllinie), Jurkat-, HepG2- (humane Leberzelllinie) und HT1080-Zellen wurden von der „American Type Culture Collection“ (ATCC), Manassas, VA, USA, bezogen. KB-Zellen wurden von Dr. Michael Kracht, Institut für Molekulare Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover zur Verfügung gestellt.

4.2 Experimentalmethoden

4.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

HeLa- und 293-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 5 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (hi FCS) kultiviert, Jurkat- und HepG2-Zellen benötigten RPMI 1640-Medium mit 10 % hi FCS und Kym-1 Zellen wurden in Click RPMI 1640-Medium mit 10 % hi FCS kultiviert. Die gesamten Zellen wurden bei 37 °C und 96 % Luftfeuchtigkeit unter 5 % CO₂ Begasung kultiviert. KB-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % hi FCS, und HT1080-Zellen in DMEM + F12 mit 10 % hi FCS bei 37 °C unter 96 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO₂ Begasung kultiviert.

Zum Ernten der adhären wachsenden HeLa-, Kym-1-, HepG2-, HT1080-, KB- und 293-Zellen wurden die Zellen durch Inkubation bei 37 °C mit Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) für 5 min abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl sowie eine Vitalitätskontrolle erfolgten mittels Eosinfärbung (0,4 % Eosin, 10 % FCS, 0,9 % NaCl, 0,05 % NaN₃) in einer Neubauer-Zählkammer.

4.2.2 Stabile Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur Transfektion wurde Superfect (Quiagen, Niederlande) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Polykation, das mit DNA komplexiert. Diese positiv geladenen Komplexe sind in der Lage über negativ geladene Oberflächenrezeptoren internalisiert zu werden. 2×10^6 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden 10 µg DNA mit 50 µl Superfect in 300 µl serumfreien RPMI für 10 min bei RT zur Ausbildung der positiv geladenen Komplexe inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml serumhaltigem RPMI wurde diese Lösung zu den Zellen gegeben, die zuvor einmal mit PBS gewaschen worden waren. Nach Inkubation für 3 h im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch serumhaltiges Zellkulturmedium ersetzt. 24 h nach der Transfektion wurde das Antibiotikum G418 (500 µg/ml) zugegeben. Die folgenden Tage wurde das Medium regelmäßig gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Nach 14 Tagen wurden die herangewachsenen Einzelklone vereinigt und Zellen, die das GFP-Fusionsprotein exprimieren, wurden durch „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) angereichert.

4.2.3 Analyse und Anreicherung transfizierter Zellen mit Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Rezeptorexpression wurden je 2×10^5 Zellen nach dem Ernten mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,02 % in PBS) in 100 μ l PBA (0,025 % BSA, 0,02 % NaN_3 in PBS) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem jeweiligen Antikörper (10 μ g/ml in 100 μ l PBA) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBA wurden die Zellen mit einem FITC-gekoppelten sekundären Ak (Ziege anti-Maus-Ig-Ak, 1:200 in PBA) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBA wurden die Zellen in PBA + 0,2 % Formaldehyd fixiert und in einem FACStar^{Plus} (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) durchflußzytometrisch analysiert. Im Falle der murinen Fas-Konstrukte war der erste Antikörper bereits FITC-gekoppelt, so dass bei der Analyse und Anreicherung dieser Zellen die Behandlung mit dem zweiten Antikörper entfiel. Zellen, die mit GFP-gekoppelten Proteinen transfiziert waren, mußten gar nicht mit Antikörpern markiert werden. Zur Anreicherung transfizierter Zellen wurden 5×10^6 Zellen in 500 μ l Volumen unter sterilen Bedingungen wie oben beschrieben markiert. Allerdings wurden die Zellen nicht fixiert, sondern in 3 ml HBSS ohne Phenolrot aufgenommen. Die Anreicherung stark exprimierender Zellen erfolgte mit Hilfe der Sortiereinrichtung des FACStar^{Plus} in Fraktionen mit jeweils 1×10^4 Zellen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium + 5 % hi FCS aufgenommen und in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät.

4.2.4 IL-6 Assay

Jeweils $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden in beschichteten 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Mediumswechsel (damit schon produziertes IL-6 die Messung nicht stört) wurden die Zellen für 6-8 h stimuliert. Pro Well wurden 100 μ l des Überstandes anschließend auf eine mit einem anti-IL-6 mAk (100 ng/Well) beschichtete ELISA-Platte überführt die zuvor mit PBS + 10 % hi FCS geblockt worden war. Als Nullwert wurde Medium in ein beschichtetes Well gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Platte viermal mit PBS + 0,05 % Tween-20 (PBS/T) gewaschen. Als zweiter Ak wurde ein biotinylierter anti-IL-6 mAk (100 ng/Well) jeweils in PBS + 10 % hi FCS zugegeben, für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Platte sechsmal mit PBS/Tween gewaschen. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur mit Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (1 U/ml, PharMingen) und anschließendem achtmaligen Waschen mit PBS/T erfolgte die Zugabe von NPP (p-Nitrophenylphosphat, 10 mg/ml) in Substratpuffer (0,1 M Glycin, 1 mM ZnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 10,4). Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte im ELISA-Reader (R5000, Dynatech, Guernsey, GB) bei 405 nm.

4.2.5 Western-Blot (Towbin et al., 1979)

4.2.5.1 SDS-Page

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einem diskontinuierlichen Gel in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Phase, Lübeck). Zur Herstellung des Trenngels wurde eine 12 %-ige Trenngellösung mit APS (End-Konzentration 0,1 %) gemischt und die Polymerisierungsreaktion durch Zugabe von TEMED (Endkonz. 0,1 %) gestartet. Das Trenngel wurde mit Isopropanol zur Ausbildung einer gleichmäßigen Oberfläche überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel (3 %) überschichtet. Die Polymerisierungsreaktion der Sammelgellösung wurde wiederum mit APS (1 % Endkonz.) und TEMED (0,1 % Endkonz.) gestartet.

Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer verstetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz zentrifugiert und dann auf Eis abgekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für 1,5 h bei 40 mA. Als Molekulargewichtsstandard wurde eine Mischung von vorgefärbten Referenzproteinen (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

4.2.5.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell, Dassel) erfolgte in einer horizontalen Blotkammer (Phase, Lübeck). Die Nitrozellulose wurde in Blotpuffer getränkt und folgendermassen mit dem Gel verpackt: Kathode / Whatman-Papier / Gel / Nitrozellulose / Whatman-Papier / Anode. Geblottet wurde für 1 h 15 Minuten bei RT mit einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm² Gel.

4.2.5.3 Immunofärbung von Proteinen

Durch Blocken mit Blockpuffer (3 % Milchpulver in PBS-T, 1 h bei RT) wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran abgesättigt. Danach wurde die Membran drei mal mit PBS-T für 5 Minuten bei leichtem Schwenken gewaschen. Alle folgenden Schritte erfolgten bei leichtem horizontalem Schwenken bei RT. Die Membran wurde nun für 1-2 h mit der ersten Antikörperlösung inkubiert (der Ak gegen das zu untersuchende Antigen wurde 1:1000 eingesetzt und in 0,3 % BSA/PBS-T verdünnt). Nach nochmaligem Waschen der Membran (drei mal mit PBS-T für 5 Minuten), wurde sie für 1 h mit dem AP-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert, der 1:5000 in 0,3 % BSA/PBS-T verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T und einmaligem Waschen in AP-Färbepuffer wurde die Membran zur Entwicklung der Banden mit der Substratlösung für die AP (0,162 mg/ml BCIP

und 0,324 mg/ml NBT in AP-Färbepuffer) inkubiert, bis die Banden gut sichtbar waren (1 Minute – 1 h). Die Reaktion wurde durch Waschen des Blots mit Wasser abgestoppt.

4.2.6 Transienter Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B

$1,8 \times 10^4$ HeLa- bzw. 293-Zellen wurden in beschichteten 96-Well-Flachbodenplatten μ N bei 37 °C kultiviert. Die Transfektion erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben mit Superfect. Dabei wurden pro Well 0,25 μ g DNA verwendet, die sich aus folgenden Konstrukten zusammensetzte: 0,15 μ g zu untersuchende DNA, 0,06 μ g NF κ B-Reporter-DNA und 0,04 μ g β -Galaktosidase-DNA. Die DNA's wurden in 15 μ l/Well serumfreiem Medium gemischt und 1 μ l Superfect pro Well hinzupipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden 75 μ l/Well RPMI + 5 % hi FCS hinzupipettiert. Nach Mischen wurde der DNA-Superfect-Mix für 2-4 h auf die Zellen gegeben, bei denen zuvor das Medium abgesaugt worden war. Nach einem Mediumswechsel wurden die Zellen μ N bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 8 h stimuliert (3-fach-Werte), und die Zellen anschließend durch Zugabe von 50 μ l Lysispuffer (Galactolight-Kit, Tropix, Bedford, USA) pro Well und 10 minütigem Schütteln bei RT lysiert. Je 25 μ l wurden anschließend für die Messung der NF κ B-abhängigen Firefly-Luciferase und der konstitutiv exprimierten β -Galaktosidase verwendet. Die Messung der Aktivität der NF κ B-abhängigen Luciferase erfolgte luminometrisch durch automatisierte Zugabe von 50 μ l verdünntem Substrat (1:5 mit Wasser) direkt im Luminometer (Firefly Luciferase Assay System, Promega GmbH, Mannheim; Luminometer lucy2, anthos Microsysteme GmbH). Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität zur Normierung der Messung erfolgte durch Zugabe von 25 μ l „Reaction buffer“ (Galactolight-Kit, Tropix, Bedford, USA). Nach 30-60 Minuten Inkubation bei RT wurden automatisch durch das Luminometer 100 μ l 1:1 mit Wasser verdünnter „Accelerator“ (Galactolight-Kit, Tropix, Bedford, USA) hinzupipettiert und das entstehende Licht gemessen.

Aus den erhaltenen Messwerten ließ sich der Quotient $\frac{\text{NF}\kappa\text{B} - \text{Luciferase} - \text{Wert}}{\beta - \text{Galactosidase} - \text{Wert}}$ für jedes

Well ermitteln. Dieser Quotient stellt den normierten Wert für die NF κ B-Aktivierung in diesem Well dar.

4.2.7 JNK - Assay

4.2.7.1 Aufreinigung des GST-Jun-(1-87)-Fusionsproteins

Zur Aufreinigung des Fusionsproteins wurden mit pGex-c-Jun-(1-87) transformierte E.coli-Bakterien üN bei 37 °C in LB-Medium mit 0,1 µg/ml Ampicillin kultiviert, und am nächsten Tag nach einer 1:10 – Verdünnung in 2 l Medium bei 30 °C weiterkultiviert. Nach 1 h wurde IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) zugegeben und die Produktion des Fusionsproteins für 8 h induziert. Nach Abzentrifugation bei 13000 rpm für 5 Minuten wurde das Pelett in 20 ml MTPBS resuspendiert und die Bakterien durch Ultraschall (70 Pulse) aufgeschlossen (Sonoplus HD200, Bandelin, Berlin). Nach nochmaliger Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm) konnte durch Zugabe von 2 ml Glutathion Sepharose 4B aus dem Überstand das Fusionsprotein präzipitiert werden. Hierzu wurde der Überstand mit der Glutathion Sepharose 4B 1 h bei 4 °C gerollert und nach Zentrifugation die Glutathion Sepharose 4B, an die das Fusionsprotein gebunden hatte, zwei mal mit MTPBS gewaschen. Von der Glutathion Sepharose 4B wurde das Fusionsprotein durch Rollern der Sepharose in 2 ml 50 mM Tris pH 8 + 10 mM Glutathion (15-30 Minuten bei 4 °C) eluiert. Dieser Schritt konnte mit der Glutathion Sepharose 4B 2-4 mal durchgeführt werden, da mit einer Glutathion-Elution nicht das gesamte Fusionsprotein von den Glutathion Sepharose 4B getrennt wurde. Kontrolliert wurde die Aufreinigung des Fusionsproteins anschließend durch Auftragen auf ein 12 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel zusammen mit einem BSA-Standard. Nach elektrophoretischer Trennung (siehe Kapitel SDS-Page) wurde das Gesamtprotein angefärbt (Coomassie-Färbung: 30 Minuten Färben des Gels in Coomassie-Färbelösung, anschließendes Entfärben in Wasser in der Mikrowelle bis die Banden sichtbar waren) und die Konzentration des Fusionsproteins abgeschätzt. Das fertige Eluat wurde für den JNK-Kinase-Assay eingesetzt.

4.2.7.2 Assay zum Nachweis der JNK-Aktivierung

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden üN in 6 cm Petrie-Schalen bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Stimulation auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml kaltem Puffer A mit einem Gummischaber abgeerntet, in 14 ml Röhrchen überführt und mit Ultraschall aufgeschlossen (15 Pulse, Sonoplus HD200, Bandelin, Berlin). Nach Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und zur Immunpräzipitation der JNK 1 µg polyklonales Kaninchen anti-JNK-1 IgG hinzupipettiert und dieser Ansatz 1 h bei 4 °C gerollt. Nach Zugabe von 25 µl Protein G und einer weiteren 30-minütigen Inkubation bei 4 °C, bei der der Ansatz wieder gerollt wurde, konnten die JNK-Antikörper

Komplexe, die an die Protein G-Sepharose gebunden hatten durch kurze Zentrifugation vom Überstand getrennt und drei mal gewaschen werden ($2 \times$ Puffer A und $1 \times$ mit JNK-Phosphorylierungspuffer). Anstatt Protein G konnte auch Protein A verwendet werden. Die Protein G-Sepharose mit den gebundenen JNK-Antikörper-Komplexen wurde dann in $40 \mu\text{l}$ JNK-Phosphorylierungspuffer resuspendiert. Die Kinase-reaktion wurde durch Zugabe von $7 \mu\text{l}$ GST-Jun-(1-87)-Fusionsprotein (ca. 500 ng) als Substrat für die JNK und $0,2 \mu\text{l}$ ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP (10 mCi/ml) gestartet. Nach 20-minütiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Reaktion durch Zugabe von $10 \mu\text{l}$ $2\times$ Probenpuffer gestoppt, und die Proben nach 3 minütiger Denaturierung bei $97 \text{ }^\circ\text{C}$ auf ein 12% -iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung (siehe Kapitel SDS-Page) wurde das Gel auf Whatman-Papier getrocknet (1 h bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ und Vakuum im Gelrockner) und dann am Phosphoimager (STORM, Molecular Dynamics, Krefeld) ausgewertet.

4.2.8 Zytotoxizitäts-Assays

4.2.8.1 Kristallviolett–Zytotoxizitäts-Assay

Jeweils $1,5 \times 10^4$ HeLa- Zellen wurden in beschichteten 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach 20 h Stimulation der Zellen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erfolgte die Quantifizierung der Anzahl der lebenden Zellen durch Färbung mit Kristallviolett. Dazu wurde der Überstand verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach 15 min Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur mit $100 \mu\text{l}$ Kristallviolettlösung ($0,5 \%$ Kristallviolett, 20% Methanol) wurde die Färbelösung mit H_2O abgespült und die Platten an der Luft getrocknet. Zur Messung wurde das Kristallviolett mit $150 \mu\text{l}$ Methanol bei Raumtemperatur gelöst und die Mikrotiterplatten im ELISA-Reader (R5000, Dynatech, Guernsey, GB) bei 550 nm analysiert.

4.2.8.2 MTT–Zytotoxizitäts-Assay

Das Aussähen und die Stimulation der Kym-1 Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Die Quantifizierung lebender Zellen nach der Stimulation wurde wie folgt durchgeführt: $10 \mu\text{l}$ einer 10 mg/ml MTT Lösung wurden pro Well hinzupipettiert, und die Zellen weitere zwei Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von $90 \mu\text{l}$ MTT-Lysispuffer pro Well und 12 h Schütteln bei RT lysiert. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend im ELISA-Reader (R5000, Dynatech, Guernsey, GB) bei 550 nm analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 TRAIL aktiviert die JNK

Eine Stimulation von Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie, die keine Todesdomäne enthalten, wie z.B. CD40, führt zur JNK-Aktivierung (Berberich et al., 1996). Aber auch die Stimulierung des TNF-R1 oder des Apo1, die eine Todesdomäne enthalten, kann zur Aktivierung dieser Kinase führen (Sluss et al., 1994; Cahill et al., 1996; Lenczowski et al., 1997; Yang et al. 1997). Um nun herauszufinden ob TRAIL auch die JNK aktivieren kann, wurden HeLa- und Kym-1-Zellen analysiert. Da in diesen Zelllinien TRAIL Apoptose induziert, müssen diese Zellen mindestens einen der beiden TRAIL-Rezeptoren exprimieren, die eine Todesdomäne enthalten. Zur qualitativen Analyse der Expression der TRAIL-Rezeptoren wurde eine RT-PCR mit TRAIL-Rezeptor spezifischen Primern durchgeführt. Als Template diente aus HeLa- und Kym-1-Zellen isolierte cDNA. In beiden Zelllinien konnte so die mRNA aller vier TRAIL-Rezeptoren nachgewiesen werden (Abb. 2).

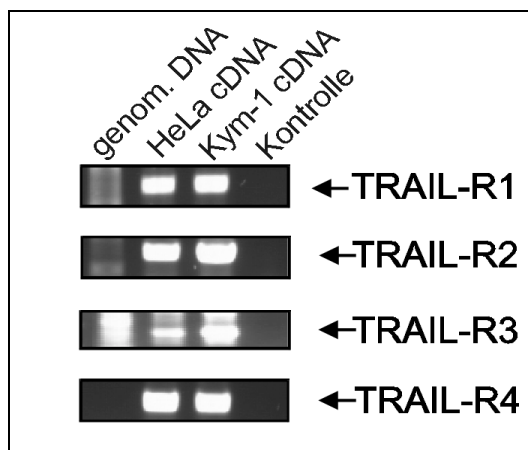


Abb. 2: **Nachweis von TRAIL-Rezeptor mRNAs mittels RT-PCR**

1 μ l oligo(dT) gepimter cDNA wurde mit Primern, die für die TRAIL-Rezeptoren 1-4 spezifisch sind, amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Als Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion ohne Zugabe von Template durchgeführt. Eine weitere Kontrolle mit genomischer DNA als Template zeigt, dass genomische Rest-DNA in den Ansätzen den Nachweis der spezifischen TRAIL-Rezeptor-mRNAs nicht stört.

Zur Analyse der JNK-Aktivierung wurden HeLa- und Kym-1-Zellen für 0-5 h mit einem TRAIL-Flag-M2 Komplex oder TNF stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex-Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen. Eine geringe JNK-Aktivierung konnte bereits in unbehandelten Zellen nachgewiesen werden, die aber durch Stimulation mit TRAIL-Flag-M2 oder TNF signifikant erhöht wurde (Abb. 3). Die TRAIL- und TNF-induzierte JNK-Aktivierung wies dabei unterschiedliche Aktivierungskinetiken auf. So aktivierte TNF die JNK schnell und transient

für 10 bis 30 Minuten, während die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung erst nach 2 h detektierbar war und nach 3-4 h ein Plateau erreichte (Abb. 3).

Im Folgenden wurde die JNK-Aktivierung eines weiteren Todesdomäne-Rezeptors, Apo1, in HeLa-Zellen untersucht. Da HeLa-Zellen nur geringe Mengen Apo1 exprimieren (Daten nicht gezeigt), wurden HeLa-Transfektanten untersucht, die Apo1 stabil überexprimieren. Das Vernetzen von Apo1 auf diesen Zellen mit Hilfe des agonistischen monoklonalen Antikörpers anti-APO-1 aktivierte die JNK mit einer Kinetik, die mit der Aktivierung durch TRAIL vergleichbar war (Abb. 3).

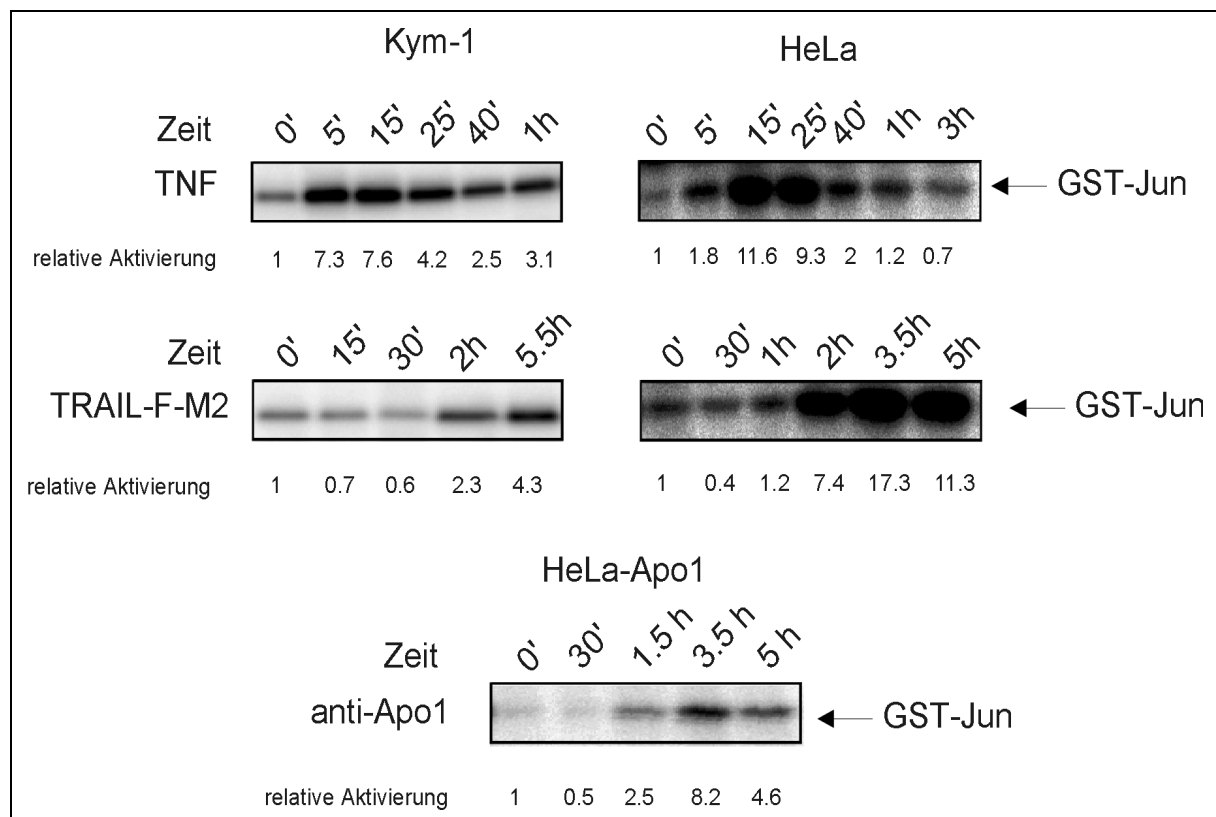


Abb. 3: **TRAIL aktiviert die JNK in HeLa- und Kym-1-Zellen**

Analyse der JNK-Aktivierung durch Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie. HeLa-, Kym-1- und HeLa-Apo1 Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) für die angegebenen Zeiten mit TNF (5 ng/ml), TRAIL-Flag-M2 (200 ng/ml) und anti-APO-1 (50 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

Die Zugabe von TRAIL-Flag-M2 Komplexen induzierte in Kym-1- aber nicht in HeLa-Zellen Apoptose. Behandelt man HeLa-Zellen jedoch mit dem Proteinsyntheseinhibitor CHX, kann auch in diesen Zellen Apoptose mit TRAIL-Flag-M2 induziert werden (Abb. 4). Der Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk konnte die TRAIL-induzierte Apoptose wie erwartet in beiden Zelllinien inhibieren (Abb. 4). Die Aktivierung der JNK war aber in beiden Zellen CHX unabhängig. Die Behandlung der Zellen mit CHX beeinflusste dabei die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung nur geringfügig (die basale Aktivität der JNK erhöhte sich ein wenig (Daten nicht gezeigt)). Dies

zeigt, dass zumindest in HeLa-Zellen die Aktivierung der JNK für die Induktion der Apoptose nicht hinreichend ist.

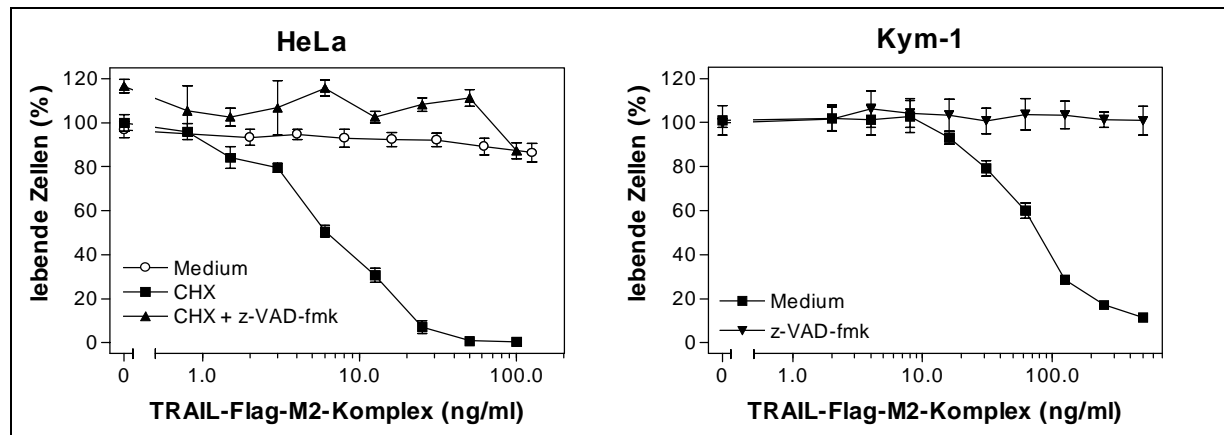


Abb. 4: Die TRAIL-induzierte Apoptose ist z-VAD-fmk sensitiv und benötigt in HeLa-Zellen CHX.

HeLa- und Kym-1-Zellen wurden in 96-Well Platten üN bei 37 °C inkubiert (HeLa, $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well, Kym-1, 1×10^4 Zellen/Well). Am nächsten Tag wurden die Zellen für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen an TRAIL-Flag-M2 in der An- oder Abwesenheit des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk (20 μ M) stimuliert. HeLa-Zellen wurden zusätzlich mit 2,5 μ g/ml Cycloheximid behandelt. Anschließend wurden lebende HeLa-Zellen mittels Kristall-Violett-Färbung und Kym-1-Zellen mittels des MTT-Nachweises quantifiziert.

5.2 TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung kann je nach Zelltyp Caspase-abhängig oder Caspase-unabhängig erfolgen

Ein essentieller Schritt bei der Induktion der Apoptose durch Todesdomäne-Rezeptoren ist die proteolytische Aktivierung von Mitgliedern der Caspase-Familie (Li and Yuan, 1999). Durch Zugabe von Caspase-Inhibitoren, wie zum Beispiel CrmA (Cowpox viral protein Zytokine response modifier A) oder eines inhibitorischen Peptids wie z-VAD-fmk (Abb. 4), lässt sich daher die Induktion der Apoptose inhibieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass Caspasen bei der Aktivierung der JNK und der p38-Kinase durch Apo1 eine Rolle spielen können (Cahill et al., 1996; Lenczowski et al., 1997; Juo et al., 1997). Es wurde daher als nächstes analysiert, inwieweit die Inhibition von Caspasen in den hier untersuchten Systemen mit der JNK-Aktivierung interferiert. In HeLa-Zellen verhinderte die Zugabe von z-VAD-fmk die Aktivierung der JNK durch TRAIL und anti-APO-1, nicht aber die TNF-vermittelte JNK-Aktivierung (Abb. 5).

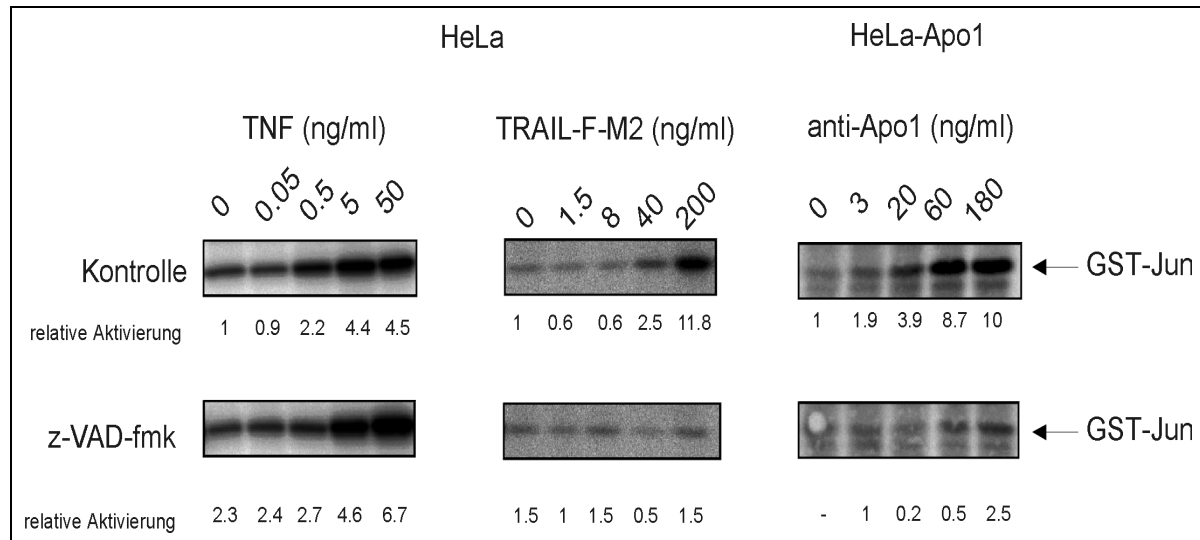


Abb. 5: Die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung in HeLa-Zellen kann je nach Stimulus caspase-abhängig oder Caspase-unabhängig erfolgen.

HeLa- und HeLa-Apo1-Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) für 20 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen TNF, bzw. für 4 h mit den angegebenen Konzentrationen TRAIL-Flag-M2 in An- oder Abwesenheit des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk (20 μ M) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

Dagegen hatte die Zugabe von z-VAD-fmk in Kym-1-Zellen keinen inhibitorischen Effekt auf die JNK-Aktivierung durch TRAIL, anti-APO-1 und TNF (Abb. 6). Dies zeigt, dass Apo1 und die TRAIL-Rezeptoren auf der einen Seite und der TNF-R1 auf der anderen Seite unterschiedliche Signaltransduktionswege für die Aktivierung der JNK benutzen. Ausserdem kann TRAIL die JNK Zelltyp-spezifisch mittels zweier unterschiedlicher Signaltransduktionswege aktivieren, einem Caspase-abhängigen und einem Caspase-unabhängigen (Abb. 7).

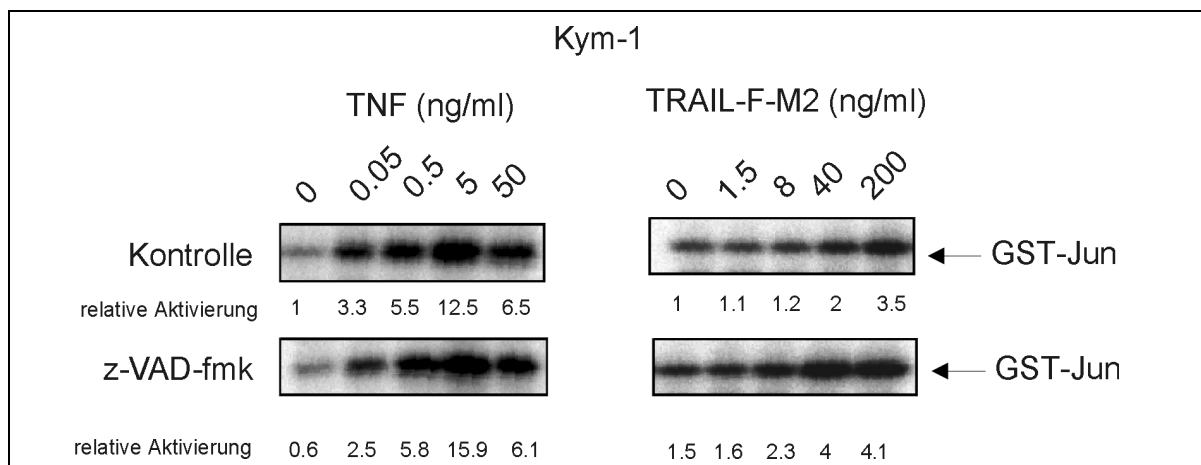


Abb. 6: Die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung in Kym-1-Zellen ist Caspase-unabhängig.

Kym-1-Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) für 20 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen TNF, bzw. für 4 h mit den angegebenen Konzentrationen TRAIL-Flag-M2 in An- oder Abwesenheit des Caspase Inhibitors z-VAD-fmk (20 μ M) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

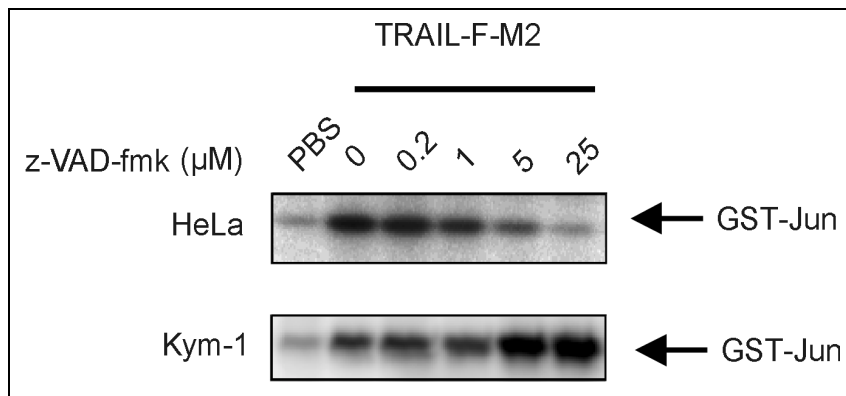


Abb. 7: Die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung erfolgt je nach Zelltyp Caspase-abhängig oder Caspase-unabhängig

HeLa- und Kym-1-Zellen wurden zunächst für 3 h mit den angegebenen Konzentrationen des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk inkubiert und anschliessend mit der angegebenen Konzentration TRAIL-Flag-M2 (200 ng/ml) für weitere 4 h stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunkomplex-Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

5.3 Die TRAIL- und anti-APO-1-induzierte Apoptose und die damit verbundene Aktivierung apoptotischer Caspasen, wird durch GFP- Δ FADD Überexpression inhibiert, die Caspase-abhängige JNK-Aktivierung wird jedoch nicht beeinflusst.

Aus den bisher beschriebenen Daten geht nicht hervor, ob die Caspase-abhängige TRAIL- oder anti-APO-1-induzierte JNK-Aktivierung auf Caspasen beruht, die auch bei der Induktion der Apoptose aktiviert werden, oder ob andere, nicht-apoptotische Caspasen hierfür genutzt werden. Um diese Frage zu beantworten, wurden HeLa-Transfektanten analysiert, die eine GFP-markierte, dominant-negative Mutante (Δ FADD) des Moleküls FADD überexprimieren. Der in diesen Zellen überexprimierten FADD-Mutante fehlt die DED und so verhindert sie die Rekrutierung der Caspase-8 in Rezeptor-Signalkomplexe, und die nachfolgende autokatalytische Aktivierung dieser Caspase. Diese FADD-Mutante inhibiert daher die Induktion der Apoptose durch Todesdomäne-Rezeptoren (Hsu et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996; Chaudhary et al., 1997; Schneider et al., 1997; Walczak et al., 1997; Wajant et al., 1998). So sind diese HeLa- Δ FADD Transfektanten (Abb. 8) insbesondere auch gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose resistent (Wajant et al., 1998; Abb. 9). Die JNK konnte in diesen Zellen aber mit TRAIL immer noch Caspase-abhängig aktiviert werden (Abb. 10). Da GFP- Δ FADD die TRAIL-induzierte Aktivierung der apoptotischen Caspasen 3 und 8 inhibierte (Abb. 11) zeigen diese Daten, dass die Caspase-abhängige, TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung unabhängig von der Aktivierung des apoptotischen Programms erfolgt.

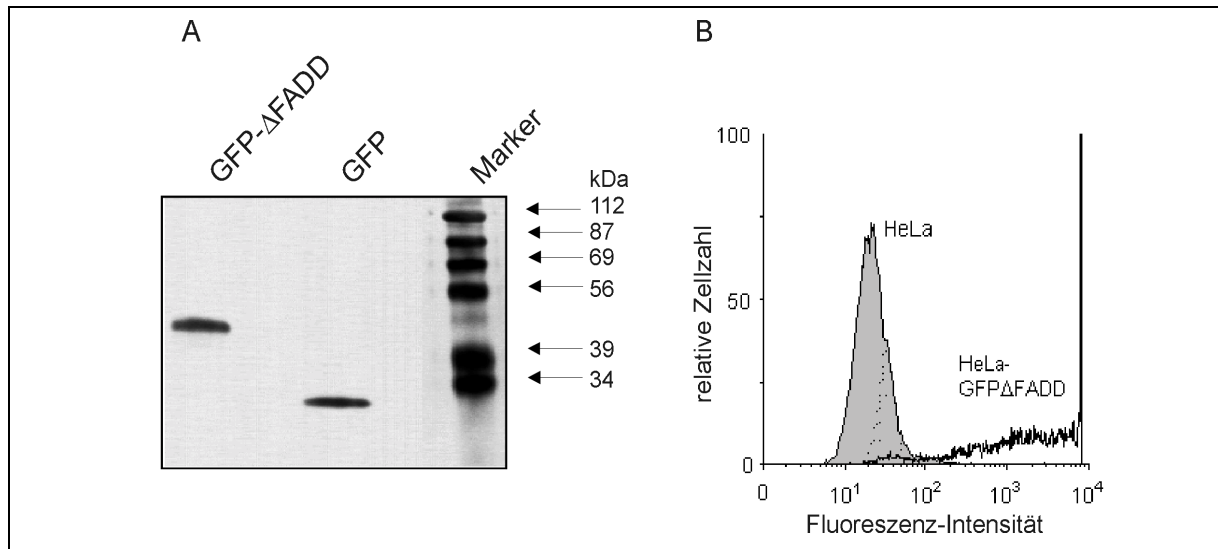


Abb. 8: **Analyse der HeLa-GFP- Δ FADD-Zellen**

Die Expression von GFP und GFP- Δ FADD wurde in stabil transfizierten HeLa-Zellen mittels Western-Blot (A) und FACS-Analyse (B) kontrolliert. Die FACS-Analyse wurde ohne weitere Behandlung der Zellen durchgeführt. Zur Analyse der Zellen im Western-Blot wurde GFP bzw. GFP- Δ FADD mittels einer GFP-spezifischen polyklonalen Kaninchen-IgG Fraktion aus zytosolischen Zellextrakten von $1,5 \times 10^6$ Zellen immunopräzipitiert. Nach Überführen auf eine Nitrozellulosemembran wurde GFP bzw. GFP- Δ FADD mit einem GFP-spezifischen monoklonalen Antikörper und einem Alkalische-Phosphatase gekoppelten sekundär-Antikörper nachgewiesen.

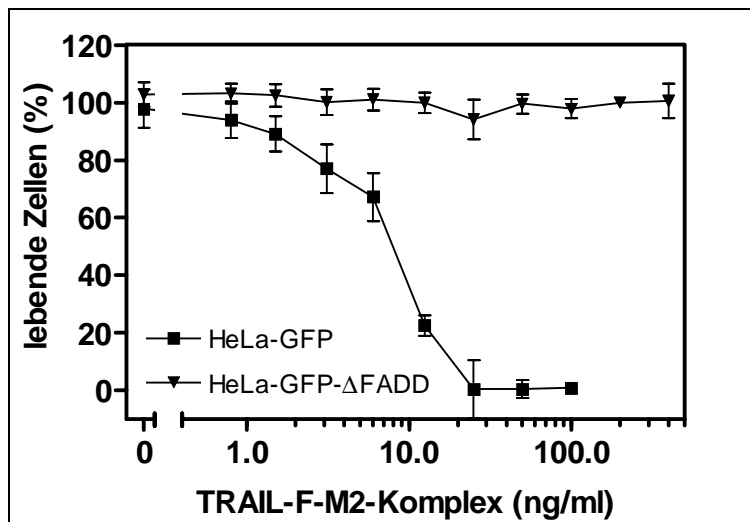


Abb. 9: **HeLa-GFP- Δ FADD-Zellen sind gegenüber TRAIL insensitiv**

$1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well wurden in einer 96-Well Platte bei 37 °C kultiviert. Anschliessend wurden sie für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen an TRAIL-Flag-M2 in der Anwesenheit von 2,5 μ g/ml Cycloheximid stimuliert. Lebende Zellen wurden mittels Kristall-Violett-Färbung quantifiziert.

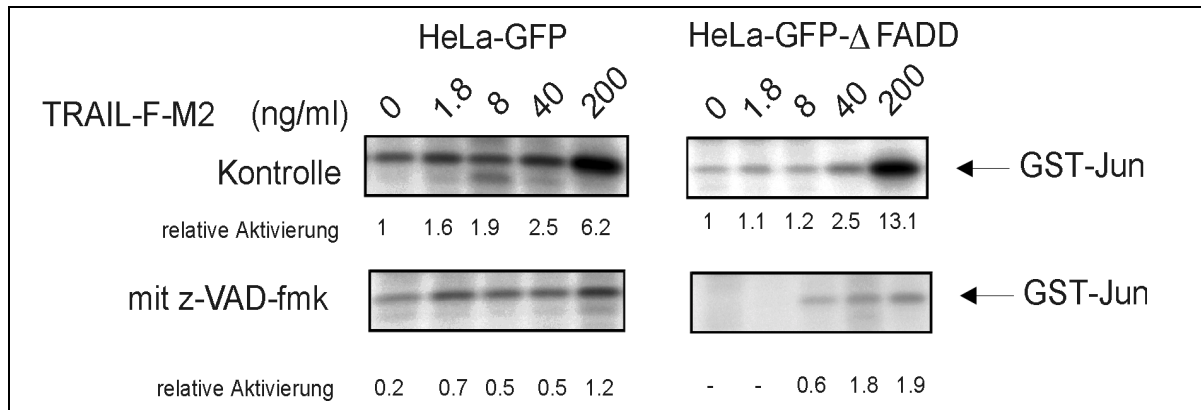


Abb. 10: In HeLa-GFP-ΔFADD-Zellen ist die JNK immer noch Caspase-abhängig durch TRAIL aktivierbar

HeLa-GFP-ΔFADD Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) 4 h mit den angegebenen Konzentrationen an TRAIL-Flag-M2 in der An- oder Abwesenheit von z-VAD-fmk (20 μ M) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

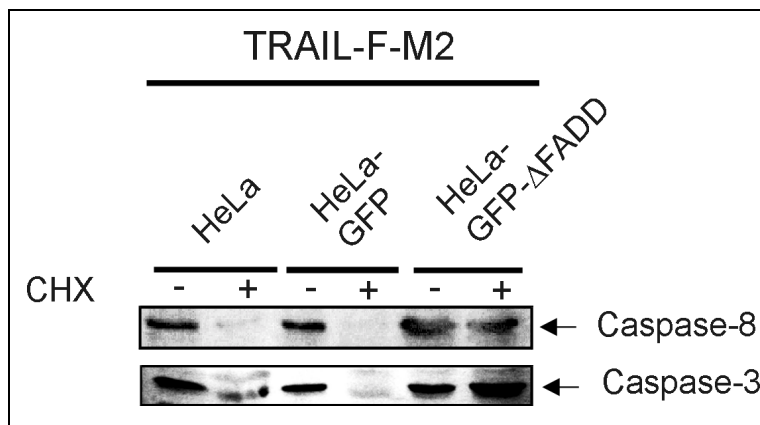


Abb. 11: GFP-ΔFADD verhindert die Aktivierung der proapoptotischen Caspasen-8 und -3

2×10^6 HeLa-, HeLa-GFP- und HeLa-GFP-ΔFADD Zellen wurden für 5 h mit TRAIL-Flag-M2 (200 ng/ml) in der An- oder Abwesenheit von Cycloheximid (1 μ g/ml) stimuliert. Mit den Zellysaten wurde ein Western-Blot mit Caspase-8- und -3-spezifischen Antikörpern und einem Alkalische-Phosphatase gekoppelten sekundär-Antikörper durchgeführt.

HeLa-Apo1 Transfektanden, die stabil GFP-ΔFADD überexprimieren (HeLa-Apo1-GFP-ΔFADD-Zellen; Abb. 12), zeigten sich gegen anti-APO-1-induzierte Apoptose geschützt (Abb. 13). Trotzdem konnte die JNK in diesen Zellen mit anti-APO-1 immer noch Caspase-abhängig aktiviert werden (Abb. 14). Dies zeigt, dass auch die Apo1-vermittelte, Caspasen-abhängige JNK-Aktivierung von der Induktion von Apoptose unabhängig ist.

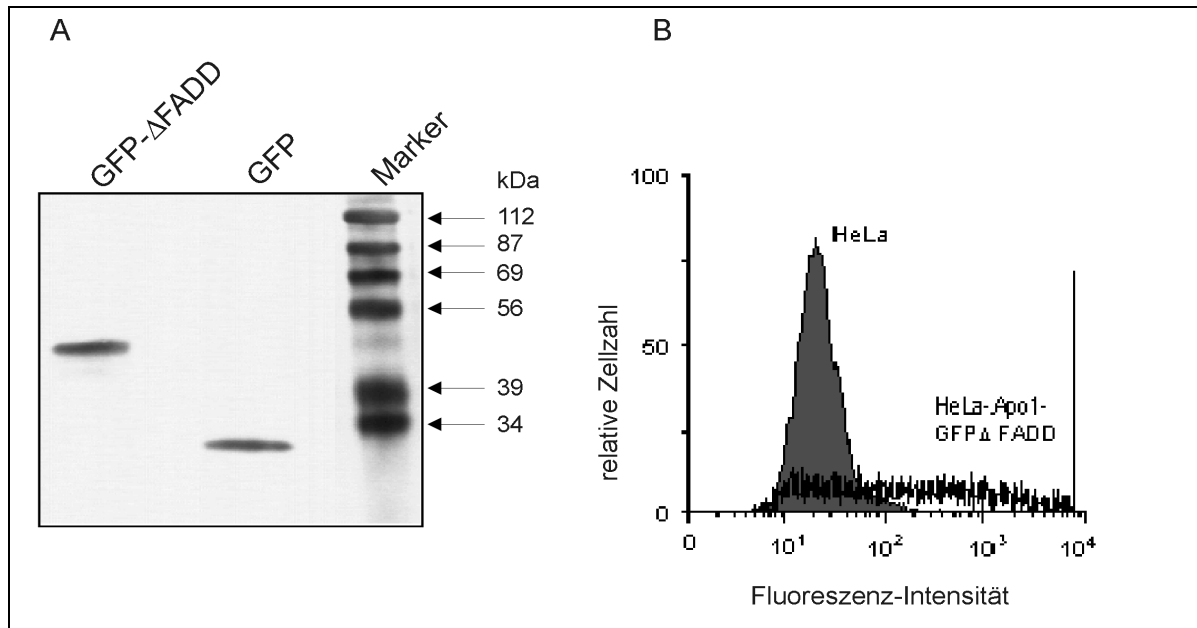


Abb. 12: **Analyse der HeLa-Apo1-GFP-ΔFADD-Zellen**

Die Expression von GFP und GFP-ΔFADD wurde in stabil transfizierten HeLa-Apo1-Zellen mittels Western-Blot (A) und FACS-Analyse (B) kontrolliert. Die FACS-Analyse wurde ohne weitere Behandlung der Zellen durchgeführt. Zur Analyse der Zellen im Western-Blot wurde GFP bzw. GFP-ΔFADD mittels einer GFP-spezifischen polyklonalen Kaninchen-IgG Fraktion aus cytosolischen Zellextrakten von $1,5 \times 10^6$ Zellen immunopräzipitiert. Nach Überführen auf eine Nitrozellulosemembran wurde GFP bzw. GFP-ΔFADD mit einem GFP-spezifischen monoklonalen Antikörper und einem Alkalische-Phosphatase gekoppelten sekundär-Antikörper nachgewiesen.

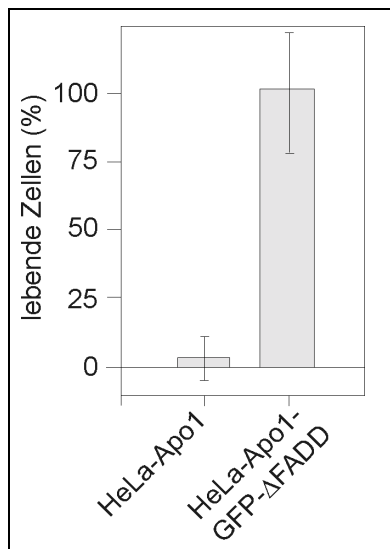


Abb. 13: **HeLa-Apo1-GFP-ΔFADD Zellen sind gegen anti-APO-1 induzierte Apoptose geschützt**

HeLa-Apo1- und HeLa-Apo1-GFP-ΔFADD-Zellen wurden in 96-Well Platten üN bei 37 °C inkubiert ($1,5 \times 10^4$ Zellen/Well). Am nächsten Tag wurden die Zellen für 16 h mit 100 ng/ml anti-APO-1 in der Anwesenheit von 2,5 µg/ml Cycloheximid stimuliert. Lebende Zellen wurden mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

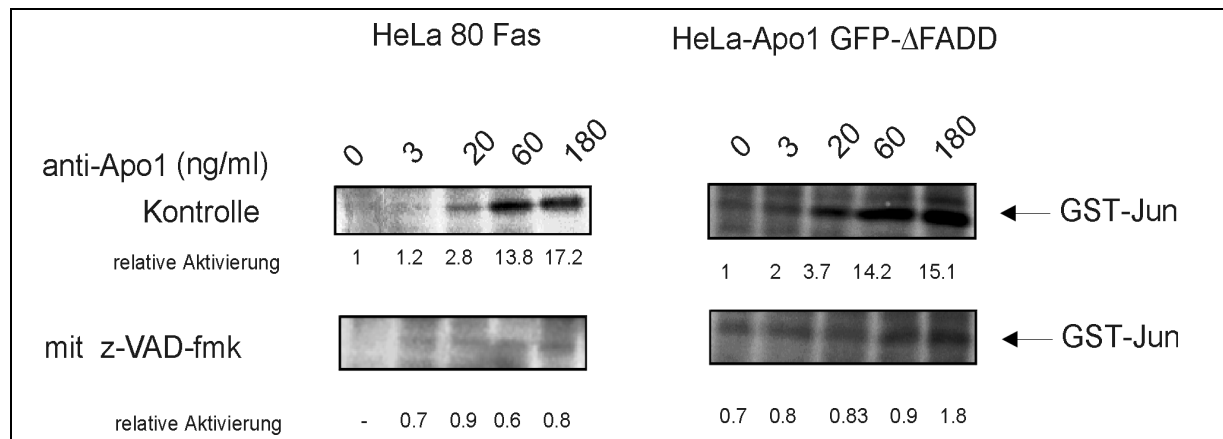


Abb. 14: In HeLa-Apo1-GFP-ΔFADD-Zellen ist die JNK immer noch Caspase-abhängig durch anti-APO-1 aktivierbar

HeLa-GFP-ΔFADD-Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) 4 h mit den angegebenen Konzentrationen anti-APO-1 in der An- oder Abwesenheit von z-VAD-fmk (20 μ M) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

5.4 TRAIL und anti-APO-1 aktivieren den Transkriptionsfaktor NF κ B

Als nächstes wurde untersucht, ob TRAIL und anti-APO-1 NF κ B aktivieren können. In EMSA-Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass in Kym-1-Zellen nach Stimulation mit TRAIL-LZ NF κ B aktiviert wird. Im Vergleich zur TNF-induzierten NF κ B-Aktivierung erfolgte die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung deutlich verzögert. Behandelte man die Zellen mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk und verhinderte so die Induktion der Apoptose, so erreichte man sogar eine Verstärkung des NF κ B-Signals (H. Wajant, mündliche Mitteilung). Ein anders Bild ergab sich bei der Analyse von HeLa-Zellen. Hier konnte nur TNF, nicht aber TRAIL den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren. Beide Liganden induzieren auf HeLa-Zellen aber Apoptose, wenn die Zellen zusätzlich mit dem Proteinsyntheseinhibitor CHX behandelt werden. Aus diesem Grunde wurde untersucht, welchen Effekt die gleichzeitige Zugabe von CHX und TRAIL auf die NF κ B-Aktivierung hat. Behandelte man HeLa-Zellen mit CHX und z-VAD-fmk, konnte man mit TRAIL die Produktion einer NF κ B-regulierten Luciferase induzieren (Abb. 15). Die Zugabe von z-VAD-fmk war in diesem Fall notwendig, da die Zellen sonst starben bevor eine Messung des NF κ B-abhängigen Signals möglich wurde. Interessanterweise gilt für die anti-APO-1-induzierte NF κ B-Aktivierung das Gleiche. Auch anti-APO-1 induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors in HeLa-Apo1-Transfektanten, wenn die Zellen zuvor mit CHX und z-VAD-fmk behandelt wurden (Abb. 15).

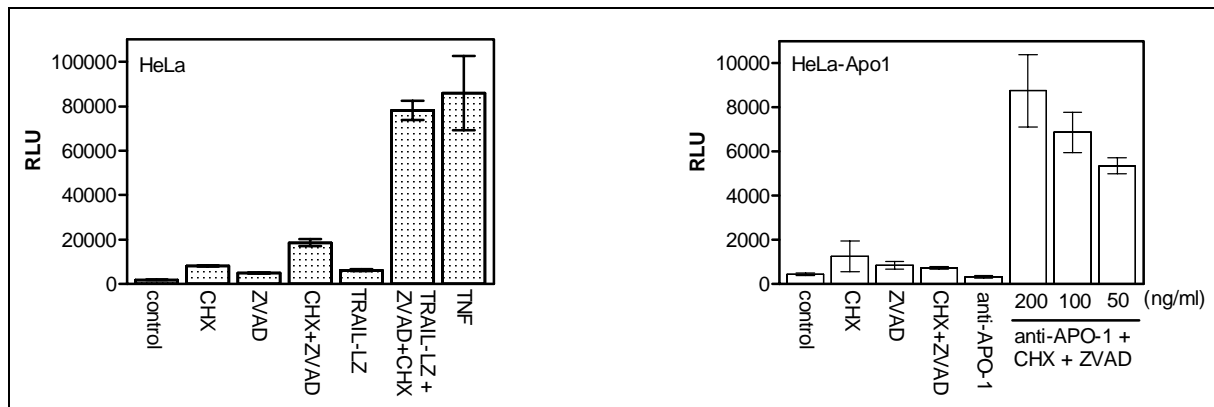


Abb. 15: Die TRAIL-induzierte NF κ B-Aktivierung ist kein Epiphenomen der Apoptose und benötigt in HeLa-Zellen Cycloheximid

HeLa- und HeLa-Apo1-Zellen wurden mit einem 3 \times NF κ B Luciferase Reporter-Plasmid und einem β -Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Nach 12 h wurden die Zellen wie angegeben stimuliert mit TRAIL-LZ (200 ng/ml), TNF (5 ng/ml), anti-APO-1 (50 ng/ml), Cycloheximid (2 μ g/ml) und z-VAD-fmk (20 μ M). Nach Lyse der Zellen wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben bestimmt.

5.5 TRAF2(87-501) inhibiert die TRAIL- und anti-APO-1-induzierte NF κ B Aktivierung

Die bisher gezeigten Daten lassen den Schluß zu, dass der TNF-R1, Apo1 und TRAIL-R1 und/oder TRAIL-R2 einen gemeinsamen Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und NF κ B-abhängiger Antworten induzieren. Die Kopplung dieses Signalweges an die einzelnen Rezeptoren muß aber für den TNF-R1 auf der einen Seite und TRAIL-R1/2 und Apo1 auf der anderen Seite unterschiedlich sein, da die TRAIL- und anti-APO-1-induzierte NF κ B-Aktivierung, nicht aber die TNF-induzierte NF κ B-Aktivierung CHX benötigt. Für die TNF-R1-induzierte NF κ B-Aktivierung konnte gezeigt werden, dass sie durch eine TRAF2-Mutante, in der die aminoterminalen RING-Finger-Struktur deletiert wurde (TRAF2(87-501)), inhibiert werden kann (Rothe et al., 1995). Im Folgenden wurde untersucht, ob diese TRAF2-Mutante auch die NF κ B-Aktivierung durch TRAIL und anti-APO-1 beeinflusst. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, inhibierte die Überexpression von TRAF2(87-501) neben der TNF- sowohl die TRAIL- als auch die anti-APO-1-induzierte NF κ B-Aktivierung. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass TNF-R1, TRAIL-R1/2 und Apo1 den gleichen Signaltransduktionsweg zur NF κ B-Aktivierung nutzen.

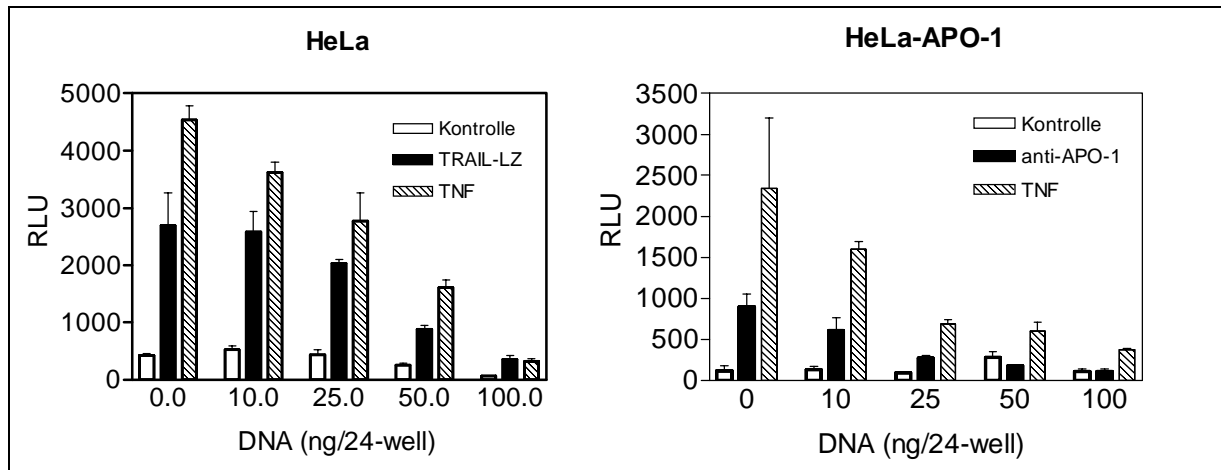


Abb. 16: TRAF2 (87-501) inhibiert die TRAIL- und anti-APO-1-induzierte NF κ B-Aktivierung

HeLa- und HeLa-Apo1-Zellen (1×10^5 Zellen pro 24 Well) wurden transient mit steigenden DNA-Mengen eines Expressionsvektors für TRAF2(87-501) oder leerem Vektor und einem $3 \times \text{NF}\kappa\text{B}$ Luciferase Reporter-Plasmid sowie einem β -Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Nach 12 h wurden die Zellen wie angegeben mit TRAIL-LZ (200 ng/ml), TNF (5 ng/ml) oder anti-APO-1 (50 ng/ml) stimuliert. Die mit TRAIL und anti-APO-1 stimulierten Gruppen wurden zudem mit Cycloheximid (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und z-VAD-fmk (20 μM) behandelt (diese Agentien wurden 1 h vor der Stimulation zugegeben).

5.6 Überexpression der FADD Todesdomäne aktiviert den Transkriptionsfaktor NF κ B

FADD ist ein für die Induktion der Apoptose durch TNF-R1, TRAIL-R1/2 und Apo1 essentielles Molekül. Die bereits erwähnte, dominant-negative FADD-Mutante, der die DED fehlt (FADD(80-208)), inhibiert in HeLa-Zellen die TNF-, TRAIL- und Apo1- induzierte Apoptose, nicht aber die Aktivierung der JNK (Abb. 10). Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob die Überexpression dieser FADD-Mutante oder von „Wildtyp“ FADD die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B induzieren kann. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, führte die Überexpression des Wildtyp-FADD wie auch von FADD(80-208) in HeLa- und 293-Zellen zur Aktivierung eines NF κ B-abhängigen Reporterkonstruktes, nicht aber die Überexpression der Todesdomäne von RAIDD (Duan and Dixit, 1997). Eine transiente Überexpression der Todesdomäne von FADD führt also zur NF κ B-Aktivierung, die durch die Behandlung der Zellen mit CHX signifikant erhöht werden konnte (Abb. 17).

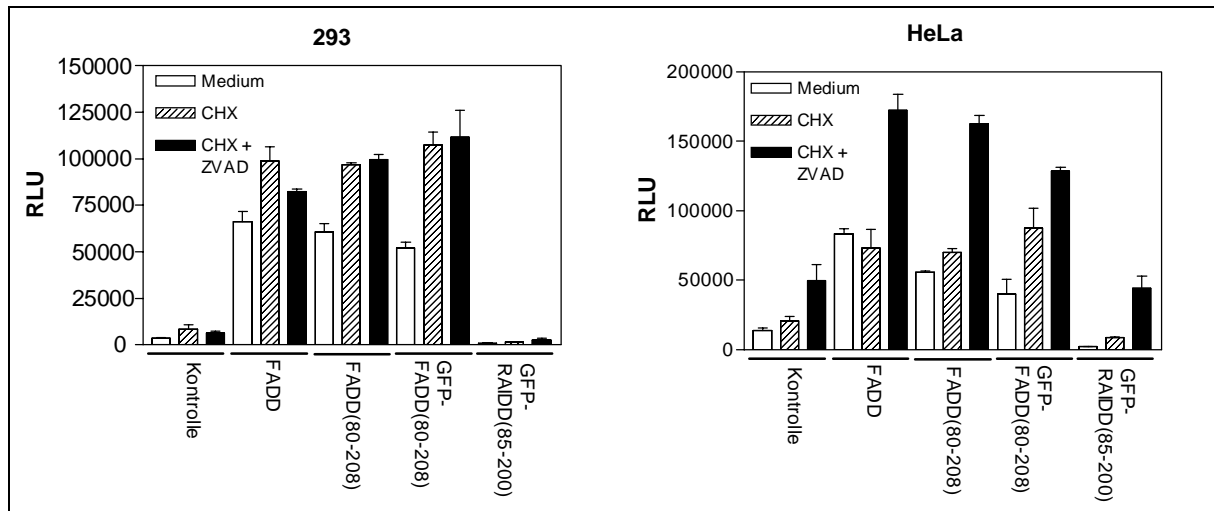


Abb. 17: **Überexpression einer FADD-Mutante, der die DED fehlt, führt zur Aktivierung von NFκB**

HeLa- und 293-Zellen wurden transient mit Expressions-Vektoren für FADD, FADD(80-208), GFP-FADD(80-208), GFP-RAIDD, einem 3×NFκB Luciferase Reporter-Plasmid und einem β-Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 8 h mit Cycloheximid (2 µg/ml), z-VAD-fmk (20 µM), Cycloheximid (2 µg/ml) und z-VAD-fmk (20 µM) oder gar nicht behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben bestimmt.

Des Weiteren induzierte die Zugabe von CHX zu HeLa-Zellen, die stabil GFP-FADD(80-208) überexprimieren, gleichfalls die Aktivierung von NFκB und die Produktion des NFκB-abhängigen Zytokins IL-6 (Abb. 18). In HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Transfektanten, die stabil RAIDD(80-200) überexprimieren, konnte die CHX-Behandlung diese Antworten hingegen nicht induzieren (Abb. 18).

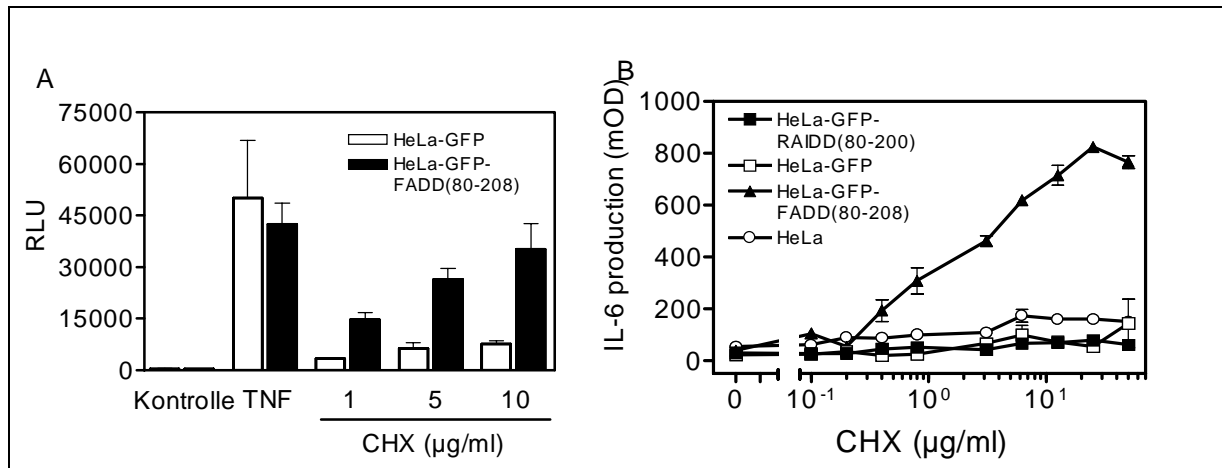


Abb. 18: **In stabil GFP-FADD(80-208) überexprimierenden Zellen kann NFκB-Aktivierung und IL-6 Produktion durch CHX –Behandlung induziert werden**

A: Stabil GFP-FADD(80-208) überexprimierende HeLa-Zellen und HeLa-GFP-Kontrollzellen wurden mit einem 3×NFκB Luciferase Reporter-Plasmid und einem β-Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 8 h mit den angegebenen Konzentrationen Cycloheximid, TNF (5 ng/ml) oder gar nicht behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben bestimmt. B: $1,5 \times 10^4$ HeLa-Zellen und HeLa-Transfektanten, die GFP, GFP-FADD(80-208) oder GFP-RAIDD(85-200) überexprimieren wurden in 96-Well Platten kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 18 h mit den angegebenen Konzentrationen Cycloheximid behandelt, und anschliessend die IL-6 Produktion in den Überständen mittels ELISA (siehe Kapitel Material und Methoden) bestimmt.

5.7 FasΔ verhindert NFκB Aktivierung

Die bisher gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass FADD möglicherweise eine Rolle bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB durch anti-APO-1 und TRAIL zukommt. Um diese Möglichkeit zumindest für die Apo1-induzierte NFκB-Aktivierung weiter zu untermauern, wurde eine Mutante des murinen Fas, FasΔ, untersucht, der die Aminosäuren 191-201 fehlen. Diese Mutante kann FADD nicht mehr binden, aber die JNK über das Adaptormolekül DAXX immer noch aktivieren (Chang et al., 1999). Überexpression des murinen Fas, nicht aber der Deletionsmutante FasΔ in 293 Zellen, aktivierte ein NFκB-abhängiges Reporterkonstrukt (Abb. 19). Da FasΔ das Molekül FADD nicht mehr binden kann, deutet auch dieser Befund auf ein Rolle von FADD bei der NFκB-Aktivierung durch Apo1 hin. Das prinzipiell gleiche Resultat erhielt man in HeLa-Zellen, die stabil murines Fas oder FasΔ überexprimierten. Stimulation der HeLa-Fas Zellen mit einem agonistischen Antikörper Jo2 führte zur Aktivierung von NFκB. Die gleiche Behandlung der HeLa-FasΔ-Zellen aktivierte den Transkriptionsfaktor jedoch nicht. TNF aber konnte in beiden HeLa-Transfektanten ein NFκB-abhängiges Reporterkonstrukt aktivieren (Abb. 19). Interessanterweise war es bei diesen Experimenten nicht nötig, zur Aktivierung von NFκB

durch den agonistischen anti-Fas-Antikörper Jo2 die HeLa-Zellen zuvor mit CHX und z-VAD-fmk zu behandeln. Eine mögliche Erklärung für diesen unerwarteten Befund ist die Möglichkeit, dass die Überexpression des Fas-Konstruktes in den Zellen höher war als die Expression des postulierten CHX-sensitiven Faktors. Eine spezie-spezifische Eigenschaft von Fas kann als weitere Erklärungsmöglichkeit aber nicht ausgeschlossen werden.

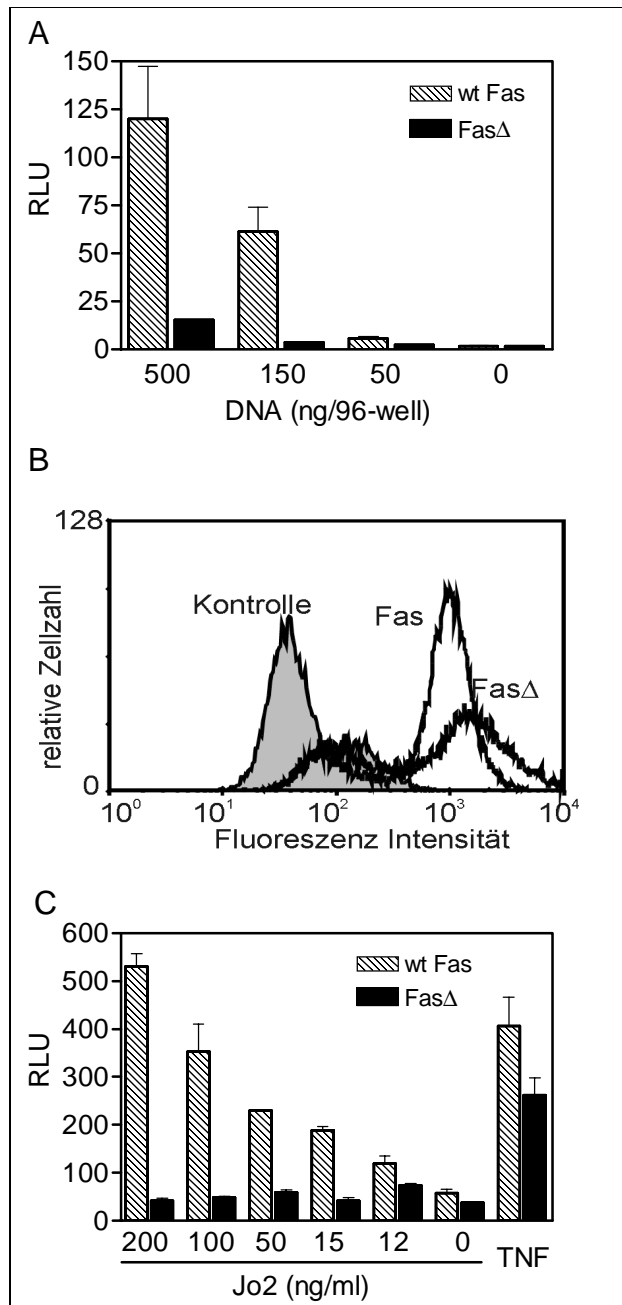


Abb. 19: **Fas Δ kann kein NF κ B aktivieren**

A: 293-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für murines wt-Fas und Fas Δ sowie einem 3 \times NF κ B Luciferase Reporter-Plasmid und einem β -Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz in einer 96-Well Platte ($1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well) transformiert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben bestimmt. Zuvor wurde mittels FACS-Analyse kontrolliert, dass von beiden Konstrukten gleiche Mengen auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt).

B: FACS-Analyse von stabil mit murinem wt-Fas und Fas Δ transformierten HeLa-Zellen mit einem FITC markiertem Jo2 Antikörper.

C: HeLa-Zellen, die stabil wt-Fas bzw. Fas Δ überexprimieren, wurden mit einem 3 \times NF κ B Luciferase Reporter-Plasmid und einem β -Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz in einer 96-Well Platte ($1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well) transformiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen Jo2 und TNF (5 ng/ml) stimuliert. Nach 8 h wurden die Zellen lysiert und die Fas und TNF-Rezeptor1 induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B bestimmt.

5.8 Die JNK wird nur von vernetztem TRAIL aktiviert

Löslicher FasL hat fast keine zytotoxische Aktivität, während eine durch anti-Flag Antikörper vernetzte Form von Flag-markiertem, löslichem FasL eine bis zu 1000-fach höhere Toxizität aufweist und der apoptotischen Wirkung von membranständigem Fas entspricht (Schneider et al., 1998). Ebenso kann die Aktivierung TNF-R2-spezifischer Signalwege durch Flag-markiertes TNF durch Vernetzen des Liganden mit einem Flag-spezifischen Antikörper drastisch erhöht werden (Schneider et al., 1998). Damit ist der Befund vereinbar, dass membranständiges TNF im Vergleich zu löslichem TNF ein deutlich besserer Aktivator TNF-R2-spezifischer Signalwege ist (Grell et al., 1995). Um herauszufinden, ob auch vernetztes und lösliches TRAIL unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, wurde zunächst untersucht, ob vernetztes und lösliches TRAIL unterschiedliche zelluläre Antworten induzieren können. Wie in Abb. 20 zu sehen ist, kann die JNK in HeLa- und Kym-1-Zellen nur durch zuvor mit einem Flag-spezifischen Antikörper (M2) vernetzen TRAIL-Flag-M2-Komplex aktiviert werden. Stimulation der Zellen mit löslichem TRAIL-Flag aktiviert die Kinase jedoch nicht. Bei der Analyse der NFκB-Aktivierung mit löslichem und vernetztem TRAIL ergab sich ein anderes Bild. Hier aktivierten beide Formen des Liganden ein NFκB-abhängiges Reporterkonstrukt in HeLa-Zellen (Abb. 21).

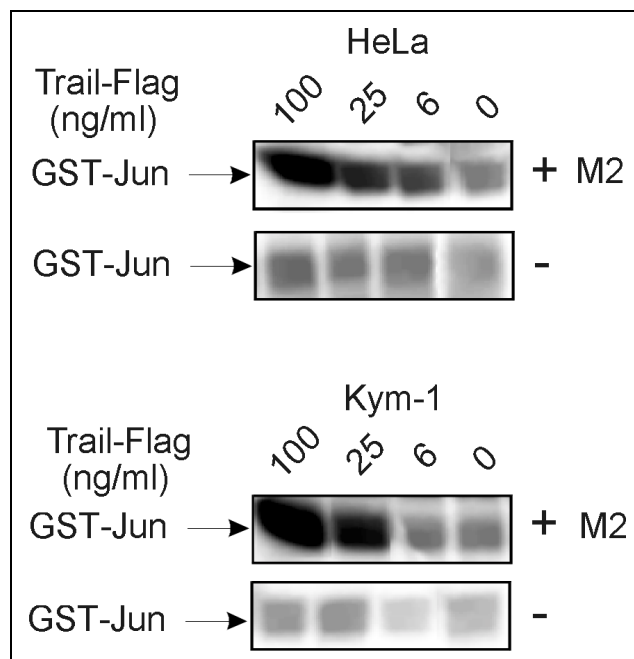


Abb. 20: **JNK-Aktivierung erfolgt nur mit vernetztem TRAIL-Flag**

HeLa- und Kym-1-Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) für 4 h mit den angegebenen Konzentrationen vernetztem (+M2) und nicht-vernetztem (-M2) TRAIL-Flag stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunkomplex-Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

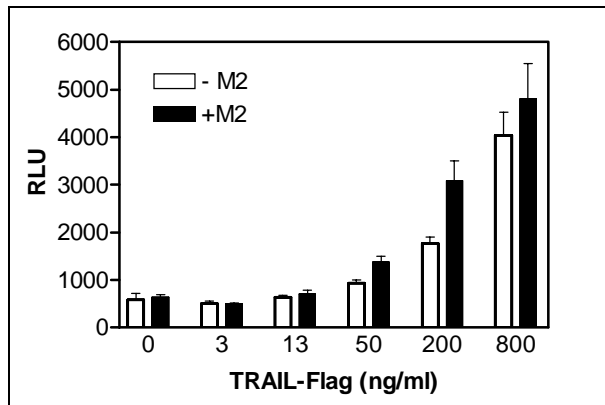


Abb. 21: TRAIL-Flag induzierte NFκB-Aktivierung benötigt in HeLa-Zellen keine sekundäre Vernetzung des Liganden

HeLa-Zellen wurden mit einem 3×NFκB Luciferase Reporter-Plasmid und einem β-Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz in einer 96-Well Platte ($1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well) transformiert. Nach 12 h wurden die Zellen für 8 h mit den angegebenen Konzentrationen von vernetztem (+M2) oder löslichem (-M2) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben bestimmt.

5.9 Stimulation des TRAIL-R2 aber nicht des TRAIL-R1 führt zur Aktivierung der JNK

Aufgrund der unterschiedlichen Antwortmuster, die man für vernetztes und nicht-vernetztes TRAIL bei der Analyse der Aktivierung der JNK und von NFκB erhalten hatte, konnte man vermuten, dass unterschiedliche TRAIL-Rezeptoren unterschiedliche Anforderungen an den Aggregationsgrad von TRAIL haben. Aus diesem Grunde wurde die Aktivierung der JNK und von NFκB zusätzlich durch agonistische Seren untersucht, die für TRAIL Rezeptor 1 und 2 spezifisch waren. Um zunächst einen Überblick über den Expressionsstatus der einzelnen TRAIL-Rezeptoren auf den verschiedenen untersuchten Zelllinien zu bekommen, wurde eine FACS-Analyse mit TRAIL Rezeptor 1–4 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 konnten dabei, mit Ausnahme der Jurkat-Zelllinie, auf allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Auf Jurkat-Zellen konnte nur der TRAIL-R2 nachgewiesen werden, nicht aber der TRAIL-R1.

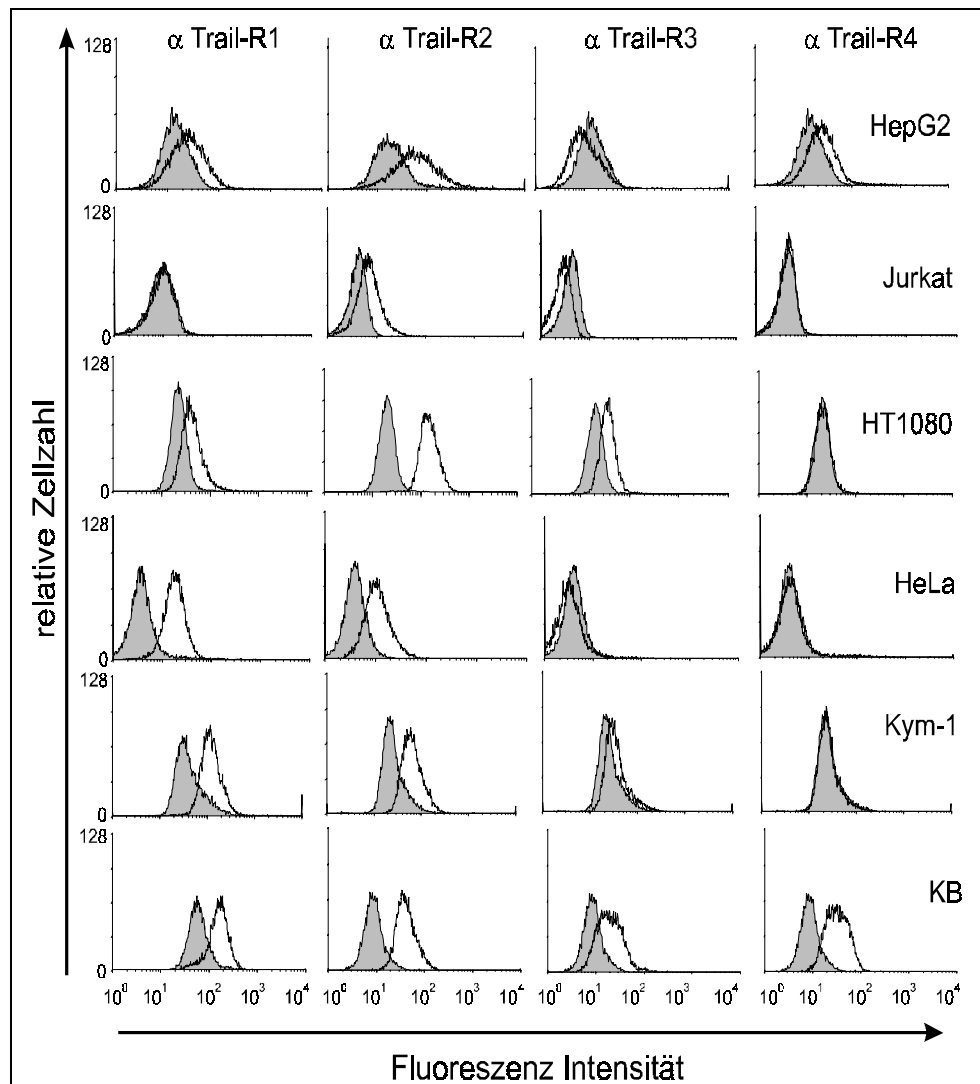


Abb. 22: Kontrolle der Expression der TRAIL-Rezeptoren 1-4 mittels FACS-Analyse auf verschiedenen Zelllinien

Zur Detektion der einzelnen TRAIL-Rezeptoren mittels FACS-Analyse wurden Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ an spezifischen Antikörpern für die TRAIL-Rezeptoren 1 – 4 (hTRAIL R1-M273; hTRAIL R2-M413; hTRAIL R3-M430; hTRAIL R4-M445 Firma Immunex) 1 h bei 4 °C inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden nach Waschen der Zellen mit FITC gekoppelten Sekundärantikörpern mittels FACS-Analyse nachgewiesen.

Die Analyse der JNK-Aktivierung mit den TRAIL-R1- und 2-spezifischen Seren zeigte, dass in allen untersuchten Fällen nur der TRAIL-R2 in der Lage war, diese Kinase nach Stimulation zu aktivieren (Abb. 23). Im Falle der Jurkat-Zelllinie ist dies einfach zu erklären, da bei diesen Zellen nur der TRAIL-R2 exprimiert wird. Da die anderen untersuchten Zelllinien den TRAIL-R1 aber exprimieren, muss die Aktivierung der JNK über den TRAIL-R1 in diesen Zellen reprimiert sein, oder aber der TRAIL-R1 ist nicht in der Lage diesen Signalweg zu aktivieren. Bei der Untersuchung der NF κ B-Aktivierung stellte sich heraus, dass hier die Stimulation des TRAIL-R1 und des TRAIL-R2 zur Induktion des Transkriptionsfaktors führte (Abb. 24). Wie aufgrund der Analysen zur TRAIL-induzierten NF κ B-Aktivierung zu erwarten

war, benötigte die NF κ B-Aktivierung durch die TRAIL-R1- und -2-spezifischen Seren die Behandlung der Zellen mit CHX und z-VAD-fmk.

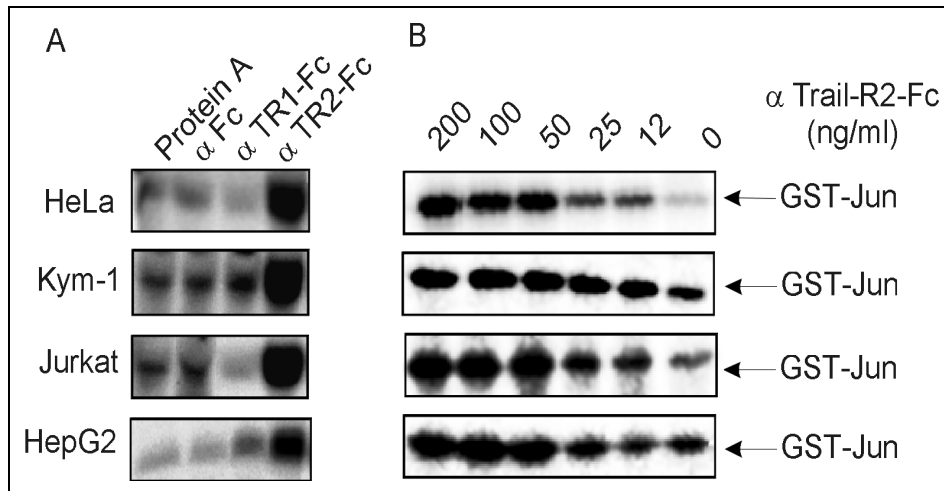


Abb. 23: Die JNK-Aktivierung erfolgt über den TRAIL-Rezeptor 2, nicht aber durch den TRAIL-Rezeptor-1

A: HeLa-, Kym-1-, Jurkat- und HepG2-Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) für 4 h mit Protein A vernetztem TRAIL-Rezeptor 1 IgG (α TR1-FC) oder Protein A vernetztem TRAIL-Rezeptor 2 IgG (α TR2-FC) stimuliert. Zur Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit Protein A und einem irrelevanten Kontroll-IgG stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

B: Dosis-Wirkung des TRAIL-Rezeptor 2 IgG (α TR2-FC). HeLa-, Kym-1-, Jurkat- und HepG2-Zellen wurden in 60 mm Schalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale) für 4 h mit den angegebenen Konzentrationen von Protein A vernetztem TRAIL-Rezeptor 2 IgG (α TR2-FC) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

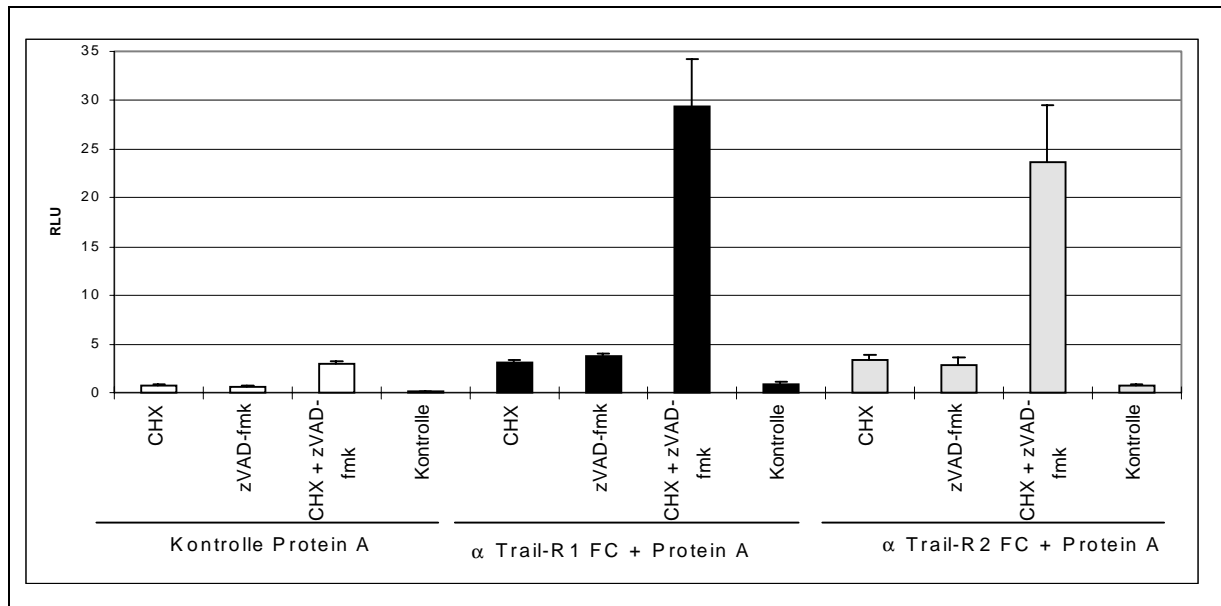


Abb. 24: Aktivierung von NFκB durch die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 benötigt CHX und z-VAD-fmk

HeLa-Zellen wurden mit einem 3×NFκB Luciferase Reporter-Plasmid und einem β-Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz in einer 96-Well Platte ($1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well).

Überexpressionsstudien mit den beiden Todesdomäne-enthaltenden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 zeigten, dass beide Rezeptoren prinzipiell in der Lage sind, die JNK zu aktivieren (Abb. 25). Das heisst also, dass in den zuvor mit den TRAIL-R1- und 2-spezifischen Seren untersuchten Zelllinien die Aktivierung der JNK über den TRAIL-R1 wohl nur inhibiert ist. Bei der NFκB-Aktivierung ergaben die Überexpressionsstudien ein gleiches Bild wie bei der Verwendung der TRAIL-R1- und -2-spezifischen Antiseren: beide Rezeptoren sind in der Lage den Transkriptionsfaktor in HeLa und 293 Zellen zu aktivieren. Eine Behandlung der Zellen mit CHX ist in diesem Fall nicht nötig, vermutlich weil die Expression der TRAIL-Rezeptoren die Expression des postulierten CHX-sensitiven Faktors übertrifft und diesen somit wegtitriert (Abb. 26).

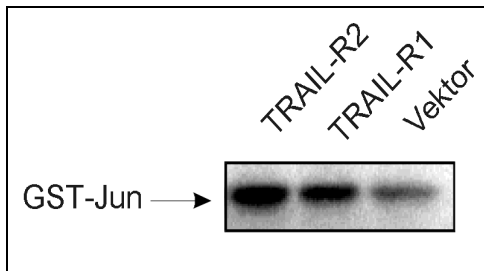


Abb. 25: **Überexpression der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 aktiviert die JNK**

293-Zellen wurden in 60 mm Schalen ($0,7 \times 10^6$ Zellen pro Well) kultiviert. Am nächsten Tag wurden sie transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen lysiert und mittels eines Immunokomplex – Assays mit GST-c-Jun(1-79) als Substrat die Aktivität der JNK nachgewiesen.

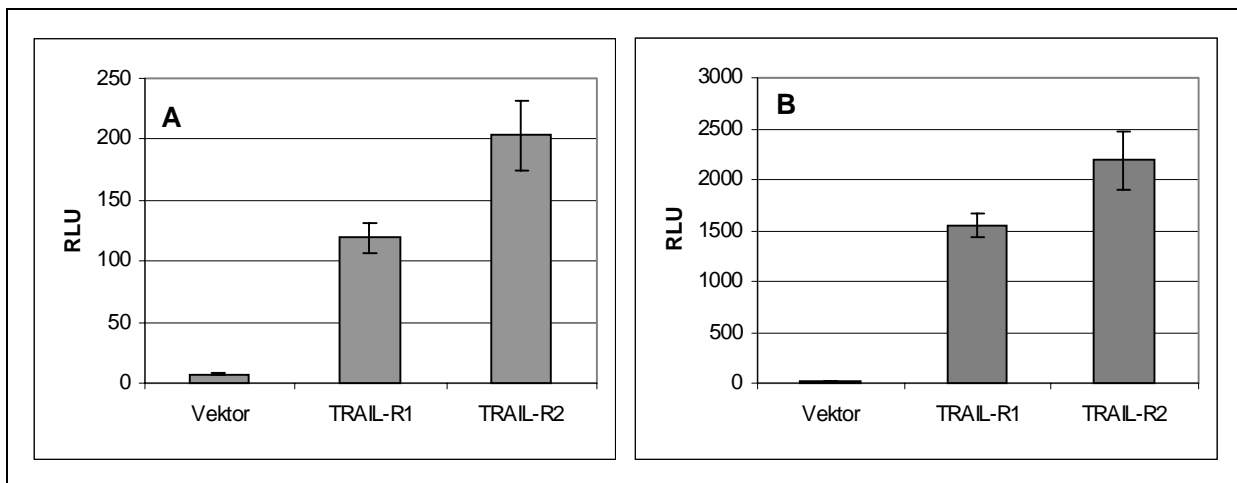


Abb. 26: **Überexpression des TRAIL-Rezeptor 1 und 2 führt zur NFκB-Aktivierung**

HeLa-(A) und 293-Zellen (B) wurden mit Expressionsvektoren für TRAIL-Rezeptor 1 (TRAIL-R1) und TRAIL-Rezeptor 2 (TRAIL-R2) und mit einem $3 \times \text{NF}\kappa\text{B}$ Luciferase Reporter-Plasmid und einem β -Galactosidase Expressionsplasmid mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Nach 12 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben bestimmt.

6 Diskussion

Die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 sowie Apo1/Fas gehören einer Gruppe von Rezeptoren innerhalb der TNF-Rezeptor Familie an, die eine für die Induktion von Apoptose essentielle, intrazelluläre Domäne gemeinsam haben, die Todesdomäne genannt wird. Während der TNF-R1, der ebenfalls eine Todesdomäne besitzt, neben der Induktion der Apoptose auch viele geninduktive Eigenschaften aufweist, sind die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 sowie Apo1/Fas vor allem auf ihre apoptotischen Eigenschaften hin untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 sowie Apo1/Fas neben der Induktion der Apoptose auch geninduktive Eigenschaften, wie die Aktivierung der JNK oder des Transkriptionsfaktors NF κ B, besitzen.

Stimulation von Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie wie TNF-R1 (Sluss et al., 1994), CD40 (Berberich et al., 1996), HVEM/ATAR (Marsters et al., 1997a), Apo1/Fas (Cahill et al., 1996; Lenczowski et al., 1997; Yang et al., 1997), RANK (Wong et al., 1997) und des IL-1-Rezeptors führt zur Aktivierung der JNK. Transiente Überexpressionsstudien mit Mitgliedern der TRAF-Familie und Versuche mit dominant-negativen Mutanten dieser Moleküle, sowie Studien an transgenen Mäusen (Lee et al., 1997; Yeh et al., 1997) haben gezeigt, dass TRAF-Moleküle für die Induktion der JNK durch die oben erwähnten Rezeptoren essentiell sind. Nur Apo1/Fas interagiert nicht mit TRAF-Molekülen und kann trotzdem die JNK aktivieren (Cahill et al., 1996; Lenczowski et al., 1997; Yang et al., 1997; Latinis et al., 1996; Goillot et al., 1997; Toyoshima et al., 1997). TRAIL bindet zwei weitere Mitglieder der Todesdomäne-Rezeptoren-Gruppe, TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Ob diese Rezeptoren ebenfalls in der Lage sind, die JNK zu aktivieren, und wenn ja, ob diese Aktivierung eher der Apo1/Fas-, oder der TNF-R1-induzierten JNK-Aktivierung gleicht, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Mit einem TRAIL-Flag-M2-Komplex konnte in Kym-1- und HeLa-Zellen, die alle vier TRAIL-Rezeptoren exprimierten (Abb. 2), effizient Apoptose induziert werden (Abb. 4). Mit dem TRAIL-Flag-M2-Komplex konnte in diesen Zellen ebenfalls die JNK aktiviert werden (Abb. 3). Im Vergleich zur schnellen und transienten TNF-induzierten JNK-Aktivierung war die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung langsam und anhaltend und glich somit der Apo1/Fas-induzierten JNK-Aktivierungskinetik (Abb. 3). Die Apo1/Fas-induzierte p38- und JNK-Aktivierung kann in manchen Zelllinien durch Behandlung mit dem Cystein-Protease-Inhibitor z-VAD-fmk oder durch die Überexpression des Protease-Inhibitors CrmA inhibiert werden (Cahill et al., 1996; Lenczowski et al., 1997; Juo et al., 1997; Toyoshima et al., 1997). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob z-VAD-fmk die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung ebenfalls hemmen kann. Wie in Abb. 5 zu sehen ist, kann in HeLa-Zellen die TRAIL- und anti-APO-1-induzierte JNK-Aktivierung, nicht aber die TNF-induzierte JNK-Aktivierung durch Behandlung der Zellen mit z-VAD-fmk gehemmt werden. Dies zeigt, dass

die JNK-Aktivierung durch TRAIL und anti-APO-1 in HeLa-Zellen Caspase-abhängig ist. Im Gegensatz hierzu hatte die Behandlung von Kym-1-Zellen mit z-VAD-fmk einen stimulierenden Effekt auf die JNK-Aktivierung durch TRAIL (Abb. 6). Die Aktivierung der JNK in Kym-1-Zellen benötigt also, im Gegensatz zu HeLa-Zellen, keine Caspasen. Die Verstärkung der JNK-Aktivierung durch z-VAD-fmk in Kym-1-Zellen kann durch den Schutz des Protease-Inhibitors vor den apoptotischen Eigenschaften von TRAIL erklärt werden. Die Behandlung mit z-VAD-fmk schützt die Kym-1-Zellen vor der TRAIL-induzierten Apoptose, so dass es zu einer Verstärkung des JNK-Signals kommt. Diese unterschiedliche, caspase-abhängige bzw. -unabhängige JNK-Aktivierung durch TRAIL in verschiedenen Zelllinien korreliert mit publizierten Befunden, nach denen in Jurkat-Zellen die Apo1/Fas-induzierte JNK-Aktivierung Caspase-abhängig ist (Cahill et al., 1996), wohingegen in einem transienten Assay mit 293-Zellen eine Caspase-unabhängige JNK-Aktivierung festgestellt wurde (Yang et al., 1997).

Die Signalwege zur Induktion der Apoptose und der TRAF2-abhängigen Aktivierung der JNK durch den TNF-R1 trennen sich auf der Ebene des Adaptormoleküls TRADD (Liu et al., 1996). Die JNK-Aktivierung ist also in diesem Fall für die Induktion der Apoptose nicht nötig. Für andere Stimuli wurde aber eine Rolle der JNK-Aktivierung bei der Induktion der Apoptose beschrieben (Xia et al., 1995; Johnson et al., 1996; Verheij et al., 1996). Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob die JNK-Aktivierung durch TRAIL bei der Induktion der Apoptose durch diesen Liganden eine Rolle spielt. Murine FADD^{-/-} Fibroblasten sind gegen TNF-R1-, Apo1/Fas- und DR3-induzierte Apoptose geschützt, die TRAIL-R1-induzierte Apoptose findet aber noch statt. Dies spricht für eine FADD-unabhängige TRAIL-R1-induzierte Apoptose. Die Rolle des Adaptorproteins FADD bei der TRAIL-induzierten Apoptose ist aber noch unklar: Es gibt Hinweise darauf, dass FADD bei der TRAIL-R2-induzierten Apoptose eine Rolle spielt, und des weiteren konnte gezeigt werden, dass HeLa-Zellen, die ein dominant-negatives GFP- Δ FADD-Fusionsprotein überexprimieren, gegen TNF-, anti-APO-1- und TRAIL-induzierte Apoptose geschützt sind (Wajant et al., 1998). Dieser FADD-Mutante fehlt die für die Induktion der Apoptose essentielle DED-Domäne. Die TRAIL-induzierte Prozessierung der apoptotischen Caspasen 8 und 3 wird durch die Überexpression von GFP- Δ FADD in HeLa-Zellen ebenfalls verhindert (Abb. 11), was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass FADD bei der TRAIL-induzierten Apoptose eine Rolle spielt. Dass aber in diesen GFP- Δ FADD überexprimierenden HeLa-Zellen die JNK-Aktivierung durch TRAIL noch möglich-, und immer noch durch z-VAD-fmk hemmbar ist, zeigt, dass die Cystein-Proteasen, die hierfür verantwortlich sind, nicht die apoptotischen Caspasen 8 und 3 sind. Ein weiterer Unterscheid zwischen TRAIL-induzierter Apoptose- und JNK-Aktivierung ist, dass die Induktion der Apoptose in HeLa-Zellen immer Cycloheximid benötigt, die Aktivierung der JNK aber ohne weitere Behandlung der Zellen möglich ist. Diese Daten

lassen den Schluß zu, dass TRAIL zwei Signalwege aktiviert, die Caspasen induzieren. Ein Signalweg führt über FADD zur Aktivierung apoptotischer Caspasen, wie Caspase-8- und -3, die für die Aktivierung der JNK nicht benötigt werden. Ein zweiter, TRAIL-induzierter Signalweg aktiviert unabhängig von der DED-Domäne des FADD-Moleküls eine oder mehrere Caspasen, die für die Induktion der JNK benötigt werden aber für die Induktion des apoptotischen Programms nicht hinreichend sind. HeLa- und Kym-1-Zellen exprimieren alle vier TRAIL-Rezeptoren. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede bei der zelltyp-spezifischen Caspase-abhängigen- bzw. unabhängigen JNK-Aktivierung auf die Stimulation unterschiedlicher TRAIL-Rezeptoren zurückzuführen sind. Hierfür sprechen auch die Untersuchungen am Apo1/Fas-Rezeptor. Auch hier finden sich die oben diskutierten Hinweise auf einen zelltyp-spezifischen Caspase-abhängigen- und einen Caspase-unabhängigen Weg zur JNK-Aktivierung. Wie diese Signalwege molekular an den Rezeptorsignalkomplex gekoppelt sind, ist aber noch unklar.

Die Caspase-abhängige, und deswegen mit z-VAD-fmk hemmbare JNK-Aktivierung ist auch in GFP- Δ FADD-überexprimierenden HeLa-Zellen zu beobachten. Da in diesen Zellen die proapoptotischen Caspasen 8 und 3 nicht mehr aktiviert werden und die Zellen gegen die TRAIL- und anti-APO-1-induzierte Apoptose geschützt sind, zeigt dies deutlich, dass die Caspase-abhängige JNK-Aktivierung in HeLa-Zellen kein Epiphenomen der Apoptose ist.

Da der TNF-R1 neben der Aktivierung der JNK vor allem ein guter Aktivator des Transkriptionsfaktors NF κ B ist, wurde ebenfalls untersucht, ob TRAIL und anti-APO-1 NF κ B aktivieren können. In Kym-1-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass TRAIL NF κ B aktivieren kann. In diesen Zellen führt die Stimulation mit TRAIL ohne weitere Behandlung der Zellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors sowie zur Induktion der Apoptose (H. Wajant, mündliche Mitteilung). In HeLa-Zellen hingegen konnte die Stimulation mit TRAIL oder anti-APO-1 NF κ B nicht aktivieren, wohingegen TNF dazu in der Lage ist (Abb. 15). Behandelte man die Zellen aber zusätzlich mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid, waren alle drei Rezeptorsysteme in der Lage NF κ B, und parallel dazu Apoptose zu induzieren (Abb. 15). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ist dabei kein Epiphenomen der Apoptose, da die NF κ B-Aktivierung bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk nicht geschwächt, sondern verstärkt wird. Gleichzeitig inhibiert aber z-VAD-fmk die Induktion der Apoptose. Die Verstärkung der NF κ B-Aktivierung durch Behandlung der Zellen mit z-VAD-fmk steht mit neueren Befunden im Einklang, die zeigen, dass Komponenten des NF κ B-Signalweges Caspase-abhängig gespalten werden. So wirken Fragmente der Moleküle I κ B, p65, TRAF1 und RIP, die durch Spaltung mittels Caspasen entstanden sind, proapoptotisch (Barkett et al., 1997; Levkau et al., 1999; Lin et al., 1999; Schwenzler et al., 2000).

Die Signalwege, die zur TNF-R1-induzierten Apoptose bzw. TNF-R1-induzierten NF κ B-Aktivierung führen, trennen sich auf der Ebene des Adaptorproteins TRADD (Liu et al., 1996). Da nur die TNF-R1-vermittelte Apoptose, nicht aber die NF κ B-Aktivierung eine Behandlung mit CHX benötigt, muss dieser postulierte CHX-sensitive Faktor die Apoptose unterhalb von TRADD inhibieren. Dagegen benötigen in HeLa-Zellen die TRAIL- und anti-APO-1-vermittelte Apoptose, als auch die Aktivierung von NF κ B Cycloheximid. Dies lässt zwei Erklärungsmöglichkeiten zu: Entweder inhibiert ein erster CHX-sensitiver Faktor in HeLa-Zellen die Induktion der Apoptose durch Todesdomäne-Rezeptoren, während ein zweiter, ebenfalls CHX-sensitiver Faktor die NF κ B-Aktivierung durch TRAIL und anti-APO-1 inhibiert, oder aber die Todesdomäne-Rezeptor-vermittelte Apoptose wie auch die TRAIL- und anti-APO-1-induzierte NF κ B-Aktivierung werden durch einen gemeinsamen Cycloheximid-sensitiven Faktor inhibiert. Wenn man nur einen inhibitorischen Faktor für die Induktion der Apoptose und die NF κ B-Aktivierung postuliert, muss dieser oberhalb des Punktes wirken, an dem sich die beiden Signalwege nach Stimulation der TRAIL-Rezeptoren oder Fas trennen. FADD ist einerseits essentiell für die anti-APO-1- und TRAIL-induzierte Apoptose. Andererseits führt die Überexpression der Todesdomäne von FADD aber zur NF κ B-Aktivierung, wenn man die Zellen, wie bei der TRAIL- und anti-APO-1-induzierten NF κ B-Aktivierung, mit CHX behandelt (siehe unten). So muss die Trennung von TRAIL- oder anti-APO-1-induzierter Apoptose und NF κ B-Aktivierung auf der Ebene dieses Adaptorproteins oder darüber stattfinden.

TRAIL und anti-APO-1 induzierten auch die Produktion des NF κ B-abhängigen Zytokins IL-6 und die Induktion der NF κ B-abhängigen Gene TRAF1 und cIAP2, wenn die Zellen zuvor mit CHX und z-VAD-fmk behandelt wurden. TNF wiederum war in der Lage diese Antworten ohne weitere Behandlung der Zellen zu induzieren (mündliche Mitteilung H. Wajant). Eine dominant-negative Mutante des Moleküls TRAF2, welches in der Lage ist die TNF-induzierte NF κ B-Aktivierung zu hemmen (Rothe et al., 1995), inhibiert ebenfalls die NF κ B-Aktivierung durch TRAIL und anti-APO-1 (Abb. 16). Wie in der Einleitung näher erläutert, ist der genaue Mechanismus dieser Hemmung noch nicht charakterisiert. Zusammen mit dem Befund, dass der p38-Inhibitor SB203580 ebenfalls die NF κ B-Aktivierung durch TNF, TRAIL und anti-APO-1 hemmt (mündliche Mitteilung H. Wajant), deuten diese Daten Rezeptor-distal auf einen gemeinsamen geninduktiven Signalweg für diese Liganden hin.

FADD ist ein zytoplasmatisches Todesdomäne-enthaltendes Protein welches als Adaptormolekül zwischen Todesdomäne-Rezeptoren und apoptotischen Caspasen fungiert. So inhibiert die Überexpression der schon beschriebenen Mutante von FADD, der die „DED“ fehlt, die TNF-, TRAIL- und anti-APO-1-vermittelte Apoptose. Neben dieser apoptotischen Eigenschaft muss FADD aber noch weitere, nicht-apoptotische Aufgaben wahrnehmen, da in FADD $^{-/-}$ Mäusen neben der Apoptose auch die Aktivierungs-induzierte Proliferation von T-

Zellen (Zhang et al., 1998), als auch die Entwicklung des Ventriculären Myocardiums (Yeh et al., 1998) gestört ist. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in Zellen, die GFP- Δ FADD stabil überexprimieren, die Behandlung mit geringen Dosen an CHX NF κ B aktiviert. Es scheint daher so zu sein, dass nach der Reduktion eines CHX-sensitiven Faktors in diesen Zellen die Überexpression der FADD-Todesdomäne ausreicht, um den Transkriptionsfaktor NF κ B zu aktivieren (Abb. 18). Transiente Transfektionsstudien führten dabei zu analogen Ergebnissen. Die Rolle von FADD bei geninduktiven Prozessen konnte zumindest für Apo1/Fas noch weiter untermauert werden. So kann eine murine Mutante des Rezeptors, die nicht mehr FADD binden kann (Chang et al., 1999), NF κ B nicht mehr aktivieren (Abb. 19). So scheint in diesem untersuchten System FADD essentiell an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch Apo1/Fas beteiligt zu sein.

Unterschiedliche Antwortmuster von vernetztem und löslichem Liganden weisen auf unterschiedliche Bioaktivitäten des löslichen bzw. membrangebundenen Liganden hin (Grell et al., 1995; Schneider et al., 1998; Grell et al., 1998). Die Unterschiede sind dabei oftmals auf die Stimulation unterschiedlicher Rezeptoren zurückzuführen. So konnten auch in der vorliegenden Arbeit für TRAIL Unterschiede von vernetztem- und löslichem Liganden bei der Aktivierung der JNK und von NF κ B mit der Stimulation unterschiedlicher TRAIL-Rezeptoren korreliert werden: Nur vernetztes TRAIL bzw. ein TRAIL-R2-spezifisches Antiserum können die JNK aktivieren, während NF κ B von löslichem- und vernetztem TRAIL sowie auch von TRAIL-R1- und TRAIL-R2-spezifischen Antiseren induziert werden kann (Abb. 20, Abb. 21). Dies deutet darauf hin, dass der TRAIL-R1 von vernetztem und löslichem TRAIL aktiviert werden kann, während TRAIL-R2 vermittelte Antworten nur durch vernetztes TRAIL induziert werden. Dies kann aber bisher nur durch die oben beschriebenen Korrelationsstudien gezeigt werden, der letztendliche Beweis kann nur durch Experimente mit noch nicht verfügbaren, antagonistischen Antikörpern gegen den TRAIL-R1 und TRAIL-R2 erbracht werden. Überexpressionsstudien ergaben für die NF κ B-Aktivierung das gleiche Bild: Sowohl der TRAIL-R1 als auch der TRAIL-R2 konnten durch Überexpression in HeLa- und 293-Zellen den Transkriptionsfaktor aktivieren (Abb. 26). Die JNK konnte aber, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Befunden, nicht nur durch die Überexpression des TRAIL-R2, sondern auch durch den TRAIL-R1 aktiviert werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, dass der TRAIL-R1 prinzipiell in der Lage ist die JNK zu aktivieren, dies aber in den von uns untersuchten Zelllinien durch einen intrazellulären Inhibitor verhindert wird. Durch die Überexpression des TRAIL-R1 wird dieser Inhibitor wegtitriert, und die JNK kann über den TRAIL-R1 aktiviert werden.

In jedem Fall zeigen die Daten deutlich, dass die beiden zu 53% homologen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 unterschiedliche Antwortmuster induzieren, und dass die beiden

Rezeptoren aller Wahrscheinlichkeit nach von unterschiedlichen Formen des Liganden TRAIL aktiviert werden, nämlich löslichem und vernetztem TRAIL für den TRAIL-R1, und nur vernetztes TRAIL für den TRAIL-R2. Da die Applikation von TRAIL in Tierexperimenten keine Nebenwirkungen verursacht, und nach den bisherigen Untersuchungen nur in transformierten Zellen oder Tumorzellen Apoptose induziert, wird es als ein potentiell Krebs-Therapeutikum angesehen. Da die beiden apoptotischen TRAIL-Rezeptoren unterschiedliche Antworten hervorrufen, werden rezeptorselektive TRAIL-Derivate, die aufgrund des Grades ihrer Vernetzung nur den TRAIL-R1 oder beide TRAIL-Rezeptoren aktivieren können, für die weitere Entwicklung von auf TRAIL basierenden Medikamenten gegen Krebs wichtig sein. So können mögliche Nebenwirkungen, die unter Umständen durch einen der beiden Rezeptoren induziert werden, reduziert werden.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen die Todesdomäne-Rezeptoren TRAIL-R1 und 2 sowie Apo1/Fas neben ihrer apoptotischen Wirkung auch geninduktive Eigenschaften besitzen. Doch unter welchen physiologischen Umständen kann es vorkommen, dass aufgrund der Inhibition der Apoptose und - je nach Zelltyp - auch der Reduktion eines Inhibitors ein Todesdomäne-Rezeptor auch geninduktive Eigenschaften aufweist? Eine Möglichkeit hierfür sind virusinfizierte Zellen, die zum Beispiel aufgrund der Expression des viralen, Caspase-inhibierenden CrmA-Proteins gegen die Induktion der Apoptose durch TRAIL oder FasL geschützt sind, und bei denen der gesamte Proteinsynthese-Apparat durch den Virus kontrolliert wird. Eine andere Möglichkeit sind Zellen, bei denen Apoptose nur über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien induziert werden kann, und die gleichzeitig das antiapoptotische, die Freisetzung von Cytochrom C verhindernde Protein Bcl2 in hoher Menge exprimieren. Fehlt solchen Zellen der Geninduktion-verhindernde CHX-sensitive Faktor, können TRAIL und FasL Geninduktion in diesen Zellen induzieren. Die Überexpression von Bcl2 wird als mögliche Ursache für die Resistenz von Tumoren gegen Tumortherapeutika, die Apoptose nachweislich über die Freisetzung von Cytochrom C induzieren, diskutiert.

7 Literaturverzeichnis

- Alderson M, Tough T, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley K, Goodwin R, Smith C, Ramsdell F, and Lynch D (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 181, 71, 1995.
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Herbert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh, Schwall RH (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 104, 155-162.
- Barkett M, Xue D, Horvitz HR and Gilmore TD (1997). Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J. Biol. Chem.*, 272, 29419-29422.
- Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M (1999). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.*, 13, 1297-1308.
- Bazan, JF (1993). Emerging families of Cytokines and receptors. *Curr. Biol.* 3, 603-606.
- Bazzoni F, Alejos E, and Beutler B (1995). Chimeric tumor necrosis factor receptors with constitutive signaling activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5376-5380.
- Beg AA and Baldwin AS Jr (1994). Activation of multiple NF-kappa B/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene*, 9(5), 1487-1492 .
- Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, and Baldwin AS Jr (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol. Cell. Biol.*, 13(6), 3301-3310.
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, and Duke R (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377, 630, 1995.
- Berberich I, Shu G, Siebelt F, Woodgett JR, Kyriakis JM, and Clark EA (1996). Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J.*, 15, 92-101.
- Bergmann M, Hart L, Lindsay M, Barnes PJ, and Newton R (1998). I-kappa-B-alpha degradation and nuclear factor-kappa-B DNA binding are insufficient for interleukin-1-beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappa-B-dependent transcription - requirement for an additional activation pathway. *J. Biol. Chem.*, 273, 6607-6610.
- Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P and Fiers W (1996). The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.*, 15, 1914-1923.
- Bodmer J-L, Burns K, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Thome M, Bornand T, Hahne M, Schröter M, Becker K, Wilson A, French LE, Browning JL, MacDonald HR, and Tschopp J (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). *Immunity*, 6, 79-88.
- Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, and Wallach D (1995). Self association of the DD of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/Apo1 prompts signaling for TNF and Fas/Apo1 effects. *J. Biol. Chem.*, 270, 387-391.
- Brunner T, Mogil R, LaFace D, Yoo N, Mahboubi A, Echeverri F, Martin S, Force W, Lynch D, Ware C, and Green D (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, 373, 441, 1995.
- Cahill MA, Peter ME, Kischkel FC, Chinnaiyan AM, Dixit VM, Krammer PH, and Nordheim A (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene*, 13, 2087-2096.
- Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC, Sung YC, Byung-Ha Oh BH(1999) 2.8 °A Resolution Crystal Structure of Human TRAIL, a Cytokine with Selective Antitumor Activity. *Immunity*, Vol. 11, 253-261, August, 1999.

- Chang HY, Yang X, and Baltimore D (1999). Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 1252-1256.
- Chaudhary PM, 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- κ B pathway. *Immunity*, 7, 821-830.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu G-L, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, and Dixit VM (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.
- Cohen L, Henzel WJ, and Baeuerle PA (1998). IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature*, 395, 292-296.
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, and Goodwin RG (1997b). The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity*, 7, 813-820.
- Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang C-P, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA (1997a) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*, 1997, 186:1165-1170.
- Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin M, and Krammer P (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by Apo1/Fas. *Nature*, 373, 438-441.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, and Karin M (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388, 548-554.
- Duan H, and Dixit VM (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385, 86-89.
- Eck, M.J., and Sprang, S.R. (1989). The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution: implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.*, 264, 17595-17605.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*, 273: 14363-14367
- Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper R I, Davis R J, Harlow E, and Sanchez I (1997). Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 3302-3307.
- Grell M, and Clauss M (1999). TNF and TNFR superfamily. *Int. Func. Res.*, in Press.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, and Scheurich P (1995). The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor Is the Prime Activating Ligand of the 80 KDa Tumor Necrosis Factor Receptor. *Cell*, 83, 793-802
- Grell M, Wajant H, Zimmermann G, and Scheurich P (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 570-575
- Griffith T, Brunner T, Fletcher S, Green D, and Ferguson T (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270, 1189, 1995.
- Griffith TS and Lynch, DH (1998). TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr.Biol.* 10, 559-563
- Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ (1998a). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.*, 161, 2833-2840.
- Henkart PA (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity*, 4(3):195-201.
- Hsu HL, Shu HB, Pan MG and Goddel DV (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84, 299-308.
- Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley FR, Ashkenazi A, and de Vos MA (1999). Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/TRAIL in a Complex with Death Receptor 5. *Molecular Cell*, 4, 563-571.

- Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K and Yonehara S (1999). The CED-4 homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase 8 during apoptosis. *Nature*, 398, 777-785
- Itoh N, and Nagata S (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 268, 10932-10937.
- Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*, 283, 543-546.
- Johnson C, Van Antwerp D and Hope TJ (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *Embo J.*, 18, 6682-6693.
- Johnson NL, Gardner AM, Diener KM, Lange-Carter CA, Gleavy J, and Jarpe M B (1996). Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J. Biol. Chem.*, 271, 3229-3237.
- Jones EY, Stuart DI, and Walker NPC (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature*, 338, 225-228.
- Ju, S, Panka, D, Cui, H, Ettinger, R, El-Khatib, M, Sherr, D, Stanger, B, and Marshak-Rothstein, A (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*, 373, 444-448.
- Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann H-P, and Blenis J (1997). Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 24-35.
- Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, and Thomas D (1995). 2A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*, 3, 1031-1039.
- Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ and Leder (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity*, 8, 297-303.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer, M, Pawlita M, Krammer P and Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signalling complex (DISC). *EMBO J*, 14, 5579-5588.
- Kitson J, Raven T, Jiang Y-P, Goeddel DV, Giles KM, Pun K-T, Grinham CJ, Brown R, and Farrow SN (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature*, 384, 372-375.
- Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Paya CV, Moscat J (1999). Activation of I κ B kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*, 19, 2180-2188.
- Latinis KM, and Koretzky GA (1996). Fas ligation induces apoptosis and Jun kinase activation independently of CD45 and Lck in human T cells. *Blood*, 87, 871-875.
- Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig, MC and Choi Y (1997). TRAF2 is essential for JNK but not NF- κ B activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity*, 7, 703-713.
- Lenczowski J M, Dominguez L, Eder A M, King LB, Zacharchuk CM, and Ashwell JD (1997). Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 170-181.
- Levkau B, Scatena M, Giachelli CM, Ross R and Raines EW (1999). Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF- κ B loop. *Nature Cell. Biol.*, 1, 227-233.
- Li H and Yuan J (1999). Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2), 261-266
- Li H, Zhu H, Xu CJ, and Yuan J (1998) Cleavage of BID by Caspase-8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-489.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y and Liu Z-G (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.*, 13, 2514-2526.

- Liu X, Naekyung K, Yang J, Jemmerson R and Wang X (1997). Induction of apoptotic program in cell-free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome. *Cell*, 86, 147-157.
- Liu Z-G, Hsu H, Goeddel DV, and Karin M (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell*, 87, 565-576.
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, and Alnemri ES (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 272, 25417-25420.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, and Wallach D (1997). MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*, 385, 540-544.
- Maniatis T (1997). Catalysis by a multiprotein I κ B kinase complex. *Science*, 278, 818-819.
- Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, Gray CL, Rothe M and Ashkenazi A (1997a). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J.Biol.Chem.* 272, 14029-14032.
- Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Bauer KD, and Ashkenazi A (1996b). Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by crmA. *Curr. Biol.*, 6, 750-752.
- Marsters SA, Sheridan JP, Donahue CJ, Pitti RM, Gray CL, Goddard AD, Bauer KD, and Ashkenazi A (1996a). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF- κ B. *Curr. Biol.*, 6, 1669-1676.
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997b). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997 Dec 1,7,1003-1006.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH and Peter ME (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 16, 2794-2804.
- Miura M, Friedlander RM, and Yuan JY (1995). Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8318-8322.
- Nagata S, and Golstein P (1995). The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-56.
- Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H (1998). ASK-1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell.*, 2(3), 389-395.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM and Donner DB (1999). NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 40, 82-85.
- Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J, Dixit VM. (1998a). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett*, 431(3), 351-356.
- Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM (1998b). TRUND, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett* 1998, 6, 424, 41-45
- Pan, G, Ni, J, Wei, Y-F, Yu, G-L, Gentz, R, and Dixit, VM (1997b). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 277, 815-818.
- Pan, G, O'Rourke, K, Chinnaiyan, AM, Gentz, R, Ebner, R, Ni, J, and Dixit, VM (1997a). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276, 111-113.
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L and Kriegler M (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell to cell contact. *Cell*, 63, 251-258.
- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 17,396, 699-703
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996). Induction of apoptosis by Apo2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 271, 12687-12689.

- Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, and Rothe M (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell*, 90(2), 373-383.
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM and Goeddel DV (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*, 269, 1424-1427.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, and Goeddel DV (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.
- Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, and Karin M (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, 395, 297-300.
- Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, and Moscat J (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J.*, 18(11), 3044-3053.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin K-M, Krammer PH and Peter ME (1998). Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 17, 1675-1687.
- Schneider P, Holler N, Bodmer J L, Hahne M, Frei K, Fontana A, and Tschopp J (1998). Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. *J. Exp. Med.*, 187, 1205-1213
- Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer J-L, Hoffmann K, Kataoka T, Holler N, and Tschopp J (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NFκB. *Immunity*, 7, 831-836.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Loas M, Wesselborg S and Peter ME (1998). Apoptosis signalling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254, 439-459.
- Schwenzer R, Mühlenbeck F, Irmeler M, Peters N, Scheurich P, Tschopp J, Wajant H (2000). Interacion of the I-κB kinase complex with RIP, TRAF1 and a caspase-generated NF-κB-inhibitory fragment of TRAF1. In Bearbeitung.
- Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu X-N, Cowper AE, McMichael AJ, and Bell JI (1997b). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol.*, 7, 693-696.
- Screaton GR, Xu X-N, Olsen AL, Cowper AE, Tan R, McMichael A, and Bell JI (1997a). LARD: A new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4615-4619.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti PM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI et al. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 277:818-821.
- Shi C-S and Kehrl JH (1997). Activation of Stress-Activated Protein Kinase/ c-Jun N-Terminal Kinase, but not NFκB, by the Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor 1 through a TNF Receptor-associated Factor 2- and Germinal Center Kinase related-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 272, 32102-32107.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, TRAIL G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89: 309-319.
- Sluss H K, Barrett T, Derijard B, and Davis RJ (1994). Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 8376-8384.
- Smith CA, Farrah T, and Goodwin RG (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76, 959-962.
- Song HY, Dunbar JD, and Donner DB (1994). Aggregation of the intracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor defined by the two-hybrid system. *J. Biol. Chem.*, 269, 22492-22495.
- Song HY, Régnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, and Rothe M (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of nuclear factor-κB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9792-9796.

- Stancovski I, and Baltimore D (1997). NF- κ B activation: The I κ B kinase revealed? *Cell*, 91, 299-302.
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, and Seed B (1995). RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, 81, 513-523.
- Takahashi T, Tanaka M, Brannan C, Jenkins N, Copeland N, Suda T, and Nagata S (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 7, 969-76.
- Takeuchi M, Rothe M, and Goeddel DV (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem.*, 271,19935-42.
- Tanaka M, Itai T, Adachi M, and Nagata S (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nature Med.*, 4(1), 31-36.
- Tewari M, and Dixit VM (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.*, 270, 3255-3260.
- Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9), 4350-4354.
- Toyoshima F, Moriguchi T, and Nishida E (1997). Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. *J. Cell Biol.*, 139, 1005-1015.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989). Monoklonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245, 301-305.
- Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, and Haegeman G (1998). P38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor kappa-B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.*, 273, 3285-3290.
- Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 411-452
- Verheij M, Bose R, Lin X-H, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, and Kolesnick R N (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, 380, 75-79.
- Wajant H, Grell M and Scheurich P (1999). TNF receptor associated factors in Cytokine signaling. *Cytokine and growth factor reviews*,00,1-12.
- Wajant H, Johannes F-J, Haas E, Siemienski K, Schubert G, Weiss T, Grell M, and Scheurich P (1998). Dominant-negative FADD inhibits TNFR60-, Fas/Apo1- and TRAIL-R/Apo2-mediated cell death but not gene induction. *Curr. Biol.*, 8, 113-116.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, and Rauch CT (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.*, 16, 5386-5397.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith, C, Smolak P, Goodwin, RG, Rauch CT, Schuh JCL and Lynch DH (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nature*, 5, 157-163.
- Ware CF, Santee S, Glass E (1998). Tumor necrosis factor-related ligands and receptors. In: *Cytokine Handbook*, Editor Thomson AW, 549-593.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan C, Copeland N, Jenkins N, and Nagata S (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356, 31, 1992.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG (1995). Identification and characterisation of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3, 673-682.
- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, and Choi Y (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T-cells. *J. Biol. Chem.*, 272, 25190-25194.

- Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, and Goeddel DV (1997). I κ B Kinase- β : NF κ B activation and complex formation with I κ B Kinase- α and NIK. *Nature*, 278, 866-869.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, and Greenberg ME (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270, 1326-1331.
- Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, and Israel A (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, 93(7), 1231-1240.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HJ and Baltimore D (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 89, 1067-1076.
- Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV and Mak TW (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 279, 1954-1958.
- Yeh W-C, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV and Mak TW (1997). Early lethality, functional NF- κ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*, 7, 715-725.
- Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, and Kyriakis JM (1998). Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J. Biol. Chem.*, 273(35), 22681-226892.
- Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH and Winoto A (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*, 392, 296-299.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90, 405-413.

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Publikationen:

Frank Mühlenbeck, Elvira Haas, Ralph Schwenzer, Gisela Schubert, Matthias Grell, Craig Smith, Peter Scheurich, and Harald Wajant (1998). TRAIL/Apo2L Activates c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) via Caspase-dependent and Caspase-independent Pathways. *J. Biol. Chem.*, 273, 33091–33098.

Eingereicht:

Harald Wajant, Elvira Haas, Ralph Schwenzer, Frank Mühlenbeck, Sebastian Kreuz, Gisela Schubert, Matthias Grell, Craig Smith and Peter Scheurich. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level or upstream of FADD

Eingereicht:

Frank Mühlenbeck, Pascal Schneider, Jean-Luc Bodmer, Ralph Schwenzer, Gisela Schubert, Peter Scheurich, Dieter Moosmayer, Jürg Tschopp and Harald Wajant. TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation.

Daneben wurden verwandte Themen bearbeitet und wie folgt veröffentlicht:

Tilo Weiss, Matthias Grell, Katrin Siemienski, Frank Mühlenbeck, Horst Dürkop, Klaus Pfizenmaier, Peter Scheurich, and Harald Wajant (1998). TNFR80-Dependent Enhancement of TNFR60-Induced Cell Death Is Mediated by TNFR-Associated Factor 2 and Is Specific for TNFR60. *J. Biol. Chem.*, 161, 3136–3142.

Harald Wajant, Frank Mühlenbeck, Peter Scheurich (1998). Identification of a TRAF (TNF Receptor-Associated Factor) gene in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Evol.*, 47, 656-662.

Schneider P, Schwenzer R, Haas E, Mühlenbeck F, Schubert G, Scheurich P, Tschopp J, Wajant H (1999). TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *Eur J Immunol*, 29, 1785-1792.

Eingereicht:

ChunMing Chen, Mariola Fotin; Frank Mühlenbeck; Gudrun Zimmermann, Harald Wajant, YanHwa Wu Lee, Matthias Grell. Lymphotoxin- β Receptor Signaling through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors (TRAFs).

Eingereicht:

Ralph Schwenzer, Frank Mühlenbeck, Martin Imler, Nathalie Peters, Peter Scheurich, Jürg Tschopp and Harald Wajant. Interaction of the I κ B kinase complex with RIP, TRAF1 and a caspase-generated NF- κ B-inhibitory fragment of TRAF1.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

Stuttgart, den 3.2.2000.



Vielen Dank!

An Peter Scheurich, Klaus Pfizenmaier und vor allem Harald Wajant für die intensive wissenschaftliche Betreuung und die ausdauernde Motivation, Ergebnisse zu produzieren!

An die Arbeitsgruppe von Harald Wajant für die freundliche Atmosphäre und die Hilfe im Laboralltag.

An alle, die mein Chaos mit würdiger Ruhe ertragen haben...

An Dino, dank ihm bekam ich immer mal wieder frische Luft (und er eine Scheibe Salami...!)

An Christina, die sich immer die Schauermärchen aus dem Labor geduldig angehört hat.

Und an alle, die mich sonst so ertragen mussten!