

Autotrope Signaltransduktion durch membranständigen Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

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

vorgelegt von Elvira Haas

Hauptberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Mitberichter: PD. Dr. Matthias Grell

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1999

**Institut für Zellbiologie und Immunologie
Universität Stuttgart**

1999

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungen..... | IV |
| Zusammenfassung..... | 1 |
| 1 Einleitung | 3 |
| 1.1 Der Tumor Nekrose Faktor (TNF)..... | 3 |
| 1.1.1 Allgemeine Einführung..... | 3 |
| 1.1.2 Gen und Proteinstruktur..... | 4 |
| 1.2 Die ADAM-Proteasen | 6 |
| 1.3 Die TNF-Ligandenfamilie | 8 |
| 1.4 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie..... | 10 |
| 1.5 Die TNF-Rezeptoren..... | 11 |
| 1.5.1 Lokalisation und Funktion..... | 11 |
| 1.6 Intrazelluläre Signalwege des TNF-R1..... | 13 |
| 1.6.1 Zentrale Apoptotische Signalwege | 13 |
| 1.6.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B | 15 |
| 1.6.2.1 Translokation von NF κ B in den Zellkern..... | 15 |
| 1.6.2.2 Transaktivierung von DNA-gebundenem NF κ B | 17 |
| 1.6.3 Aktivierung der <i>c-Jun N-terminal kinase</i> (JNK) | 20 |
| 1.6.4 Weitere Signalwege des TNF-R1 | 20 |
| 1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit..... | 22 |
| 2 Material und Methoden | 23 |
| 2.1 Reagenzien | 23 |
| 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien..... | 23 |
| 2.1.2 Lösungen und Puffer..... | 24 |
| 2.1.3 Antikörper | 24 |
| 2.1.4 Expressionsvektoren und Vektorkonstrukte..... | 25 |
| 2.1.5 Zell-Linien..... | 25 |
| 2.2 Experimentalmethoden..... | 26 |
| 2.2.1 Kultivierung und Ernte eukaryontischer Zellen..... | 26 |
| 2.2.2 Stabile Transfektion eukaryontischer Zellen..... | 26 |
| 2.2.3 Analyse und Anreicherung transfizierter Zellen mit Durchflußzytometrie..... | 26 |
| 2.2.4 Bindungsstudien mit ¹²⁵ I-TNF | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.1 TNF-Jodierung..... | 27 |
| 2.2.4.2 Gleichgewichts-Bindungsstudien bei 4°C..... | 28 |
| 2.2.4.3 Assoziationsstudien bei 37°C..... | 28 |
| 2.2.5 Interleukin-6-Assay..... | 28 |
| 2.2.6 TNF-Assay..... | 29 |
| 2.2.7 Proteinbestimmung | 29 |
| 2.2.8 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zum Nachweis der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B | 30 |
| 2.2.9 Supershift Assay..... | 31 |
| 2.2.10 SDS-PAGE..... | 31 |
| 2.2.11 Western-Blot..... | 32 |
| 2.2.11.1 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose..... | 32 |
| 2.2.11.2 Immunofärbung von Proteinen..... | 32 |
| 2.2.12 Analyse der p38 MAP Kinase Phosphorylierung..... | 33 |
| 2.2.13 Transiente Reporter-Gen Assays zur Bestimmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B | 33 |
| 2.2.14 Zytotoxizitäts-Assays..... | 34 |
| 2.2.15 RNase Protection Assay..... | 35 |
| 2.2.15.1 Stimulation der Zellen und RNA-Isolierung..... | 35 |
| 2.2.15.2 RNase Protection Assay..... | 35 |
| 2.2.16 Assay zum Nachweis der Aktivierung der c-Jun N-terminal kinase (JNK)..... | 36 |

3 Ergebnisse

38

| | |
|---|----|
| 3.1 Etablierung eines Modellsystems zum Studium der autostimulatorischen Effekte von membranständigem TNF..... | 38 |
| 3.1.1 Herstellung von Membran-TNF-exprimierenden HeLa-Zellen..... | 38 |
| 3.1.2 Koexpression von TNF-R1 und TNF $_{\Delta(1-12)}$ in tmTNF-transfizierten HeLa-Zellen | 39 |
| 3.1.3 HeLa $_{\text{tmTNF-1}}$ -Zellen produzieren kein bioaktives lösliches TNF..... | 41 |
| 3.2 Molekulare Mechanismen der konstitutiven IL-6 Produktion in HeLa $_{\text{tmTNF}}$ -Zellen..... | 42 |
| 3.2.1 HeLa $_{\text{tmTNF}}$ -Zellen produzieren konstitutiv IL-6..... | 42 |
| 3.2.2 Konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in tmTNF- exprimierenden-Zellen | 43 |
| 3.2.3 Konstitutive p38 MAP Kinase Aktivierung in HeLa $_{\text{tmTNF}}$ -Zellen..... | 46 |
| 3.3 mRNA-Expression NF- κ B-abhängiger antiapoptotischer Moleküle in HeLa $_{\text{tmTNF}}$ -Zellen | 47 |
| 3.4 Desensitivierung der TNF-induzierten JNK-Aktivierung in HeLa $_{\text{tmTNF}}$ -Zellen..... | 48 |
| 3.5 CHX oder IFN- γ induzierte Apoptose in HeLa $_{\text{tmTNF-1}}$ -Zellen | 49 |
| 3.6 Membranständiges TNF kann auf Einzelzell-Ebene in einem autotropen Mechanismus wirken | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 4 Diskussion | 54 |
| 4.1 Koexpression von TNF-R1 und membranständigem TNF auf HeLa _{mTNF} -Zellen..... | 55 |
| 4.2 Kontinuierliche IL-6 Produktion, NF- κ B- und p38 MAP-Kinase Aktivierung in HeLa _{mTNF} - Zellen..... | 56 |
| 4.3 Pathophysiologisches Potential von tmTNF | 59 |
| 4.4 Expression TNF-induzierter Schutzgene..... | 60 |
| 4.5 Apoptose-Induktion in HeLa _{mTNF} -Zellen über juxta- und/oder autotrope Mechanismen..... | 62 |
| 4.6 Differentielle Regulation TNF-induzierter Signalwege nach Langzeit-Stimulation..... | 63 |
| 4.7 Retrograde Signale über tmTNF | 63 |
| Literaturverzeichnis..... | 65 |

Verwendete Abkürzungen

| | |
|--------|--|
| AICD | activation-induced cell death |
| ADAM | a disintegrin and metalloproteinase |
| AITR | activation inducible TNFR family member |
| Ak | Antikörper |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| AP-1 | activating protein-1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ASK1 | apoptosis signal regulating kinase 1 |
| ATAR | another TRAF-associated receptor (=HVEM, TR2) |
| BSA | Rinderserum Albumin |
| CAD | caspase-activated deoxyribonuclease |
| Casper | caspase-eight-related protein (= I-FLICE, FLAME-1, cFLIP, MRIT, CASH, Clarp) |
| CD | cluster of differentiation |
| 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 |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| 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 |
| EGTA | Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetra-Essigsäure |
| ELISA | enzyme linked immunoassay |
| EMSA | electrophoretic mobility shift assay |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |

| | |
|--------------------------|--|
| FACS | fluorescence activated cell sorter |
| FADD | Fas-associating protein with a novel 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 receptor |
| GM-CSF | granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| HEBS | HEPES-gepufferte Kochsalzlösung |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure |
| HGK | HPK/GCK-like kinase |
| hiFCS | Hitze-inaktiviertes fetales Kälber-Serum |
| HRP | horseradish peroxidase |
| hu | human |
| HVEM | Herpesvirus entry mediator (=ATAR, TR2) |
| IAP | inhibitor of apoptosis protein |
| ICAD | inhibitor of caspase-activated desoxyribonuclease |
| 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 |
| LARD | lymphocyte-associated receptor of death (=DR3, Apo3, TRAMP, WSL-1) |
| 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 |
| MACH | MORT1-associated CED-3 homologue (=FLICE, caspase-8) |
| MADD | MAP kinase activator with a death domain |
| MEKK1 | MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase1 |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MORT1 | mediator of receptor-induced toxicity (=FADD) |
| mRNA | messenger Ribonucleinsäure |
| tmTNF/sTNF | membranständiges / lösliches TNF |
| NAIP | neuronal apoptosis inhibitory protein |
| NEMO | NF- κ B essential modulator (=IKK γ) |
| NF- κ B | nuclear factor κ B |
| NGFR | nerve growth factor receptor |
| NIK | NF κ B-inducing kinase |
| NPP | p-Nitrophenylphosphat |
| OD _{xnm} | optische Dichte bei x nm |
| OPG | osteoprotegerin |
| PBA | PBS mit BSA und Azid |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| RAIDD domain | RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death (=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 |
| SD | standard deviation of mean |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SD | standard deviation (=Standardabweichung) |
| SODD | silencer of death domain |

| | |
|-------------|--|
| SMase | Sphingomyelinase |
| T | Tween-20 |
| TANK | TRAF family member associated NFκB activator (=I-TRAF) |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TEMED | N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin |
| tm | membranständig |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TNF-R1 (-2) | TNF-Rezeptor-1 (-2) |
| TR1 | TNF-R1 like molecule 1 |
| 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 |
| xIAP | x-linked inhibitor of apoptosis protein |
| zVAD-fmk | N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton |

Zusammenfassung

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) ist ein pleiotropes Zytokin, das an der Vermittlung einer Vielzahl verschiedener zellulärer Antworten beteiligt ist. So ist TNF beispielsweise ein wichtiger Mediator der nicht-adaptiven Immunantwort und spielt weiterhin eine zentrale Rolle in Entzündungsreaktionen und in einigen Autoimmunerkrankungen. Die überwiegende Mehrzahl biologischer Antworten wird durch die Bindung von TNF an TNF-Rezeptor Typ 1 (TNF-R1) vermittelt. Es sind 2 bioaktive Formen von TNF beschrieben worden: Die membranständige Form des TNF-Moleküls und eine lösliche Form dieses Zytokins, die durch proteolytische Abspaltung der membranständigen Form des TNF entstehen kann. Inzwischen sind zahlreiche TNF-induzierte intrazelluläre Signalkaskaden des TNF-R1 charakterisiert worden. So wird die Induktion von Apoptose über die Aktivierung proteolytischer Enzyme, den sogenannten Caspasen vermittelt. Viele Zell-Linien sind allerdings nur in der Gegenwart von Proteinbiosynthese-Inhibitoren gegenüber dem apoptotischen Potential von TNF sensitiv. Geninduktive Signalwege führen über NF- κ B, der p38 MAP Kinase und der *c-jun N-terminal kinase* (JNK) zur Expression proinflammatorischer und anti-apoptotischer Moleküle. Es sind zahlreiche Moleküle beschrieben worden, die regulierend in diese Signalwege eingreifen können, so daß das TNF-Signal entweder überwiegend in der Geninduktion/Expression proinflammatorischer Zytokine oder in der Induktion von Apoptose resultiert.

TNF-produzierende Zellen exprimieren oft auch TNF-Rezeptoren und zeigen die genannten typischen TNF-Antworten. Inwieweit jedoch membranständiges TNF (tmTNF) an diesen autokrinen bzw. juxtakrinen Signalschleifen beteiligt ist, ist bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß HeLa-Zellen, die eine nicht proteolytisch prozessierbare, mutante Form des TNF-Moleküls als membranständiges Molekül exprimieren (HeLa_{tmTNF}-Zellen), konstitutiv tmTNF-TNF-R1 Komplexe an der Zelloberfläche exprimieren. Diese Zellen zeigen eine kontinuierliche NF- κ B- und p38 MAP Kinase- Aktivierung. Diese konstitutiv aktivierten Signalwege induzieren eine tmTNF-abhängige kontinuierliche Expression des NF- κ B-abhängigen IL-6-Gens in diesen Zellen. Der JNK-Signalweg hingegen scheint desensitiviert zu sein, da die HeLa_{tmTNF}-Zellen weder eine kontinuierliche noch eine TNF-induzierbare JNK-Aktivierung zeigen. Überraschenderweise resultierte die kontinuierliche NF- κ B-Aktivierung nicht in der konstitutiven bzw. verstärkten Expression der sogenannten NF- κ B-abhängigen Schutzgene TRAF1 und cIAP2. Dies deutet auf eine differentielle Regulation NF- κ B-abhängiger Gene in dieser Zelle hin.

HeLa-Zellen gehen nach einer kombinierten Behandlung von TNF mit Cycloheximid bzw. mit IFN- γ in die Apoptose. HeLa_{tmTNF}-Zellen gingen bereits bei einer alleinigen Behandlung mit Cycloheximid oder IFN- γ in Apoptose. Daraus läßt sich schließen, daß HeLa_{tmTNF}-Zellen sich in einem kontinuierlichen Aktivierungszustand befinden, der bei Inhibition der Proteinbiosynthese ausreichend ist, um in den Zellen apoptotische Signalkaskaden zu aktivieren. Desweiteren konnte die Cycloheximid-induzierte Apoptose in den tmTNF-überexprimierenden Zellen durch eine Behandlung mit dem Caspaseninhibitor zVAD-fmk verhindert werden. Für diesen Signalweg war kein Zell-Zell-Kontakt notwendig. Es ist deshalb davon auszugehen, daß tmTNF über TNF-R1 auf der gleichen Zelle Signale weiterleiten kann und dadurch zu dem konstitutiv aktivierten Status der Zelle beiträgt.

Die Daten weisen darauf hin, daß autotrope Signalschleifen von tmTNF über TNF-R1 existieren. Diese Möglichkeit TNF-Signale zu vermitteln, könnte in Zellen, die membranständiges TNF und TNF-Rezeptoren koexprimieren, wie z.B. Monozyten, T-Lymphozyten oder Endothelzellen, von Bedeutung sein.

1 Einleitung

1.1 Der Tumor Nekrose Faktor (TNF)

1.1.1 Allgemeine Einführung

Das Zytokin TNF spielt eine wichtige Rolle im komplexen Netzwerk von Immunreaktionen. Gemeinsam mit den Interleukinen (IL)-1 α und - β sowie Interferon- γ (IFN- γ) ist TNF ein zentraler Mediator der nicht-adaptiven Immunantwort. Daneben werden TNF eine Vielzahl weiterer immunregulatorischer, proinflammatorischer und pathophysiologischer Wirkungen zugeschrieben.

TNF wurde in Mäusen nach Infektion mit gramnegativen Bakterien als löslicher Faktor, der in Mäusen Tumornekrose induzieren kann, ohne normale Zellen zu schädigen, isoliert und charakterisiert (Carswell, 1975). Unabhängig davon wurde TNF als Mediator der Kachexie identifiziert (Beutler et al., 1985a/b). Kurz darauf wurde das humane TNF biochemisch charakterisiert und kloniert (Pennica, 1984; Aggarwal, 1985; Wang, 1985). TNF vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an zwei verschiedene Rezeptormoleküle, TNF-R1 mit einem Molekulargewicht von 55-60 kD und TNF-R2 mit einem Molekulargewicht von 70-80 kD (Brockhaus et al., 1990; Smith et al., 1990; Schall et al., 1990; Himmler et al., 1990).

Obwohl TNF von vielen verschiedenen Zellen gebildet wird, sind aktivierte Makrophagen und Monozyten, im besonderen nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS), die wichtigsten TNF-Produzenten (Männel et al., 1980; Higuchi et al., 1990). Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, und Lymphozyten sind weitere relevante TNF-Produzenten. Im Synergismus mit IFN- γ wird die TNF-Produktion in diesen Zellen verstärkt, wie auch viele TNF-vermittelte Funktionen verstärkt werden. Das Wirkspektrum von TNF umfaßt eine ganze Reihe verschiedener zellulärer Antworten, die je nach Zelltyp und Aktivierungsstatus der Zelle variieren (Übersicht in: Vassalli 1992; Cerami and Beutler 1988/9; Grell and Scheurich 1997).

In Entzündungsreaktionen kann TNF systemisch über die Freisetzung von Prostaglandinen als endogenes Pyrogen wirken. In der Akutphase von Entzündungen ist TNF ein starker Aktivator von neutrophilen Granulozyten. Diese werden zur Adhärenz an die Endothelzellen der Gefäße und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber anderen Entzündungsmediatoren (z.B. IL-1 und IL-6) stimuliert. Durch die TNF-induzierte verstärkte Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-8, GM-CSF und IL-6) wird die

Immunantwort auf die Entzündungsreaktion stark beeinflusst. Nach Beseitigung des Entzündungsherdes scheint TNF auch für die Begrenzung der Immunantwort wichtig zu sein. So sterben TNF-defiziente Mäuse im Gegensatz zu Kontrolltieren an den Spätfolgen einer Injektion abgetöter Bakterien (Marino et al., 1997).

Im Falle einer Fehlregulation der TNF-Expression kann es zur Entstehung einer Reihe von Krankheiten kommen. So wurden in akuten Krankheitsgeschehen wie beispielsweise bakterielle Meningitis und Sepsis-Syndrom erhöhte TNF-Plasmaspiegel nachgewiesen. Auch scheint TNF bei der Entstehung einiger Autoimmunerkrankungen (z.B. Multiple Sklerose und rheumatische Arthritis) beteiligt zu sein (Überblick in: Grell und Scheurich, 1997; Eigler et al., 1997; Feldmann und Brennan, 1996).

Auf Tumorzellen und verschiedenen Tumorzell-Linien kann TNF apoptotisch wirken (Sugermann et al., 1985). Die apoptotische Wirkung spielt auch eine Rolle bei der Eliminierung virusinfizierter Zellen und beim Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) von CD8⁺ T-Zellen (Adolf et al., 1994; Zheng et al., 1995). Auf viele Tumorzell-Linien wirkt TNF jedoch nur dann zytotoxisch, wenn durch Zugabe von Transkriptions- bzw. Translationsinhibitoren (z.B. Actinomycin D oder Cycloheximid (CHX)) die Proteinbiosynthese blockiert oder reduziert wird. Es wurde eine Reihe von Proteinen beschrieben, die die Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützen können, wie z.B. Mangan-Superoxid-Dismutase (Wong and Goeddel, 1988; Wong et al., 1989), *plasminogen activator inhibitor type-2* (Pytel et al., 1990; Kumar and Baglioni, 1991), *heatshock protein* (hsp) 27 (Mehlen et al., 1995,1996), hsp70 (Jäättelä, 1992), A20 (Opipari, 1992), cFlip/I-FLICE/FLAME-1/Clarp (Irmiler et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Inohara et al., 1997), *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAP) 1 (Chu, et al., 1997; Roy et al., 1997), cIAP2 (Roy et al., 1997), *TNF receptor associated factor* (TRAF) 1 und TRAF2 (Wang et al., 1998a).

1.1.2 Gen und Proteinstruktur

Die Gene von humanem TNF und Lymphotoxin- α (LT α) sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 im Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes lokalisiert. Beide Gene sind etwa 3000 Basenpaare lang, sind jeweils durch drei Introns unterbrochen und ca. 1000 Basenpaare voneinander entfernt. (Nedwin et al., 1985, Spies et al., 1989, Carroll et al., 1987). Das Gen des LT- β Moleküls, eines weiteren Mitglieds der TNF Liganden Familie, ist ebenfalls im selben Bereich des Chromosomen 6 in gegenläufiger Orientierung kodiert (Browning, et al., 1993 Lawton et al., 1995). Alle drei Gene besitzen eine sehr ähnliche Intron-Exon-Struktur. Dies deutet darauf hin, daß sie durch Duplikationsereignisse von einem Ursprungsgen abstammen. Das humane TNF wird von einer 1,5 kb mRNA als

membranständiges Molekül (Kriegler et al., 1988) translatiert und besteht aus 233 Aminosäuren (26 kD). Das membranständige TNF kann durch membranständige Metalloproteasen der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Familie zum löslichen Zytokin von 157 Aminosäuren (17 kD) gespalten werden. Bisher wurden 2 dieser Proteasen, TACE, (*TNF-alpha converting enzyme*, ADAM17; Moss et al., 1997, Black et al., 1997) und ADAM10 (Rosendahl et al., 1997) identifiziert.

Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, daß die biologisch aktive Form von TNF ein Homotrimer ist, in dem TNF-Monomere nicht kovalent zusammen gelagert sind, um eine pyramidale Struktur auszubilden (Smith and Bagnoli, 1987; Eck et al., 1988, Eck and Sprang, 1989; Jones et al., 1989). Sowohl die C- als auch die N-Termini der Monomere befinden sich nahe der Basis der pyramidalen Struktur. Die Röntgenstrukturanalyse des LT- α und der extrazellulären Domäne des TNF-R1 hat gezeigt, daß die Rezeptorbindestellen an der Basis des trimeren Liganden an den Kontaktstellen zwischen einzelnen Monomeren liegen (Banner et al., 1993). Wie nach der Analyse der dreidimensionalen Struktur vorausgesagt (VanOstade et al., 1991), bestätigten Studien mit rekombinaten Rezeptoren, daß ein TNF-Trimer bis zu drei Rezeptormoleküle binden kann (Loetscher et al., 1991). Dadurch kann eine Aggregation von Rezeptormolekülen erfolgen, welche die Aktivierung der Rezeptorgekoppelten Signalwege induziert, wie bereits Anfang der 90-iger Jahre mit agonistischen TNF-Rezeptorantikörpern gezeigt wurde (Engelmann et al., 1990). Interessanterweise scheint die Trimerisierung des membranständigen TNF bereits intrazellulär zu erfolgen (Tang et al. 1996).

Die membranständige Form des TNF ist nicht nur als membranständige Proform des löslichen Liganden anzusehen, sondern als biologisch aktiver Ligand, der seine Antworten im Zell-Zell-Kontakt vermittelt (Kriegler et al., 1988; Perez et al., 1990) Inzwischen sind einige Antworten, die durch membranständiges TNF vermittelt werden, beschrieben worden, z.B. Zytotoxizität, B-Zellaktivierung, oder auch die Fähigkeit, antibakterielle Effekte *in vitro* auszulösen (Luettig et al., 1989; Aversa et al., 1993; Del Prete et al., 1994; Birkland et al., 1992). Desweiteren haben Studien mit transgenen Tieren gezeigt, daß die Expression von membranständigem TNF ausreicht, um entzündliche Gelenkerkrankungen, vergleichbar der rheumatoiden Arthritis im Menschen, auszulösen (Keffer et al., 1991; Alexopoulou et al., 1997).

1.2 Die ADAM-Proteasen

Wie bereits erwähnt, gehören die TNF-spaltenden Metalloproteasen zu der kürzlich charakterisierten ADAM-Familie. Die Mitglieder dieser Molekülklasse scheinen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Organismen und in der Pathogenese verschiedener Krankheiten zu spielen (Wolfsberg and White, 1996; Blobel, 1997). Bisher wurden 23 Mitglieder aus verschiedenen Spezies anhand ihrer allgemeinen Strukturmerkmale identifiziert.

Die ADAM-Proteasen weisen verschiedene funktionelle Domänen auf, die in Abb. 1 schematisch dargestellt sind.

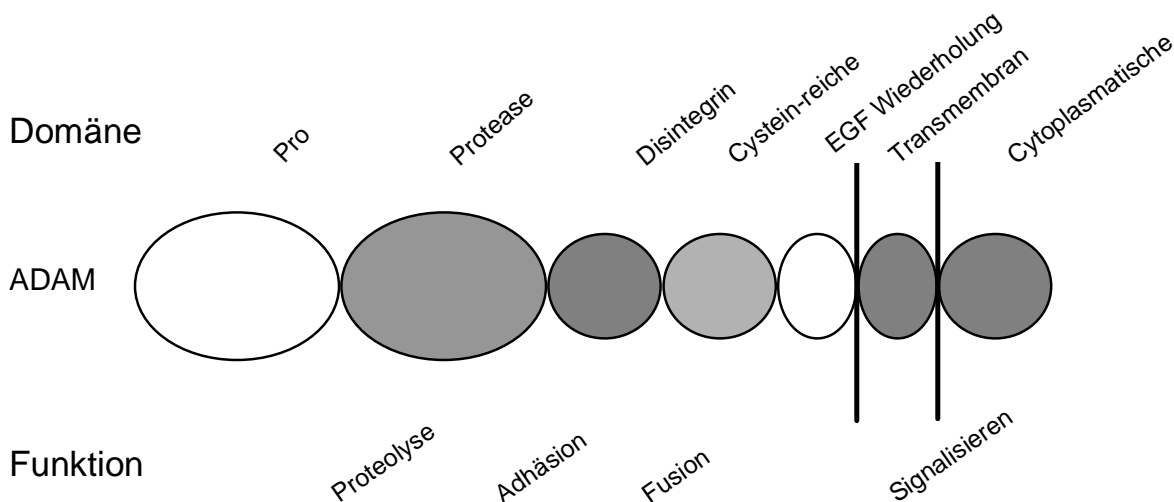


Abb: 1. Domänen-Organisation der ADAM-Proteasen und funktionelle Zuordnung der Domänen. Der Lipidbilayer ist durch 2 senkrechte Linien angedeutet (modifiziert nach Black and White, 1998).

Der extrazelluläre Teil der Proteasen läßt sich in Pro-, Protease-, Disintegrin-, die EGF- (*epidermal growth factor*) und die Cysteinreiche-Domäne unterteilen. Es wird angenommen, daß die Prodomäne das Molekül in einem inaktiven Zustand hält. Nach Aktivierung wird die Prodomäne proteolytisch abgespalten und eine Dimerisierung der membranständigen ADAMs kann stattfinden. Die daraus resultierende Zn-abhängige Proteaseaktivität erstreckt sich nur auf Ziel-Moleküle derselben Zelle (Peschon et al., 1998, Maskos et al., 1998). Obwohl die Spaltungssequenzen nicht konserviert sind und auch in unterschiedlichen Abständen zur Membran lokalisiert sind, gibt es Hinweise auf gemeinsame Wirkmechanismen. Zum einen kann die Inhibition des *Ectoderm-Shedding* vieler membranständiger Proteine durch eine einzige mutante Zell-Linie vermittelt werden (Arribas et al., 1998; Merlos-Suares et al., 1998). Zum anderen scheinen gemeinsame Signalmoleküle, wie die Proteinkinase C, Calcium/Calmodulin-Kinasen und Rezeptor-

tyrosinkinasen, an der Aktivierung dieser Proteasen beteiligt zu sein (Arribas et al., 1998; Merlos-Suares et al., 1998, Aichner et al., 1997; Dethlefsen et al., 1998).

Die Inaktivierung erfolgt durch proteolytische Abspaltung der Protease-Domäne, die in löslicher Form signifikant weniger aktiv ist (Black et al., 1997, Moss et al., 1997). Ein verfeinertes Regulationssystem der Proteaseaktivität könnte TIMP-3 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-3*) darstellen, der als spezifischer endogener Inhibitor der Proteaseaktivität von ADAM17 beschrieben wurde (Armour et al., 1998).

Die Disintegrin-Domäne ist zur Adhäsion an das zu spaltende Protein wichtig, kann aber nach Abspaltung der Protease-Domäne noch eine integrinähnliche Funktion wahrnehmen und Zell-Zell-Kontakt vermitteln (Werb and Yang, 1998). Der Cystein-reichen-Domäne werden neben Zell-Zell-Fusions-Eigenschaften auch Adhäsions-Funktion zugeschrieben. Der intrazelluläre Teil könnte zur Signalweiterleitung dienen. Eine potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstelle wie eine *src-homology 3* Domäne sind in diesem Abschnitt des Moleküls beschrieben worden (Black, et al., 1997). Proteasen der ADAM-Familie besitzen keine eigenständige katalytische Funktion, so daß die Signale durch intrazelluläre Adaptermoleküle vermittelt werden müssen. Diese sind bisher noch unbekannt. Es wird angenommen, daß über die Bindung der Disintegrin-Domäne an Integrine bidirektionale Signalweiterleitung stattfinden kann (Zhang, et al., 1998).

Kürzlich konnten Peschon und Kollegen (Peschon et al., 1998) durch Deletion der Zn-Bindedomäne im katalytischen Zentrum von TACE (Δ Zn) zeigen, daß TACE eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung der Maus spielt. Die *tace* ^{Δ Zn/ Δ Zn} Maus zeigte nicht den Phänotyp einer TNF *knock-out* Maus sondern den Phänotyp einer Maus ohne epidermalem Wachstumsfaktor Rezeptor, der sich in pränataler bzw. verfrühter postnataler Letalität widerspiegelte (1 Tag nach der Geburt). Genauere Untersuchungen zeigten, daß TACE eine wichtige Rolle in der Proteolyse von membranständigem epidermalem Wachstumsfaktor und *transforming growth factor* β spielt, die nur in löslicher Form funktionell sind. Die löslichen Moleküle haben eine essentielle Funktion in der Endothelzellreifung und -organisation während der Embryonalentwicklung.

Darüber hinaus konnten sie weitere Substrate für TACE identifizieren, TNF-R2 und L-Selectin. TACE kommt somit auch eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen zu. So kann das *Shedding* von L-Selectin das Leukozyten *Rolling* am Endothel verhindern und damit ihre Extravasation in die Entzündungsherde (Khan et al., 1998). Lum und Kollegen konnten zeigen, daß ein weiteres Mitglied der TNF-Liganden Superfamilie, TRANCE, von TACE *in vitro* prozessiert werden kann (Lum et al., 1999). Dieser Befund unterstreicht die Wichtigkeit

von TACE und verwandten Proteasen bei der Regulation des Immunsystems sowie in der Knochen Homöostase.

ADAM-Proteasen spielen neben der Regulation proliferativer/inflammatorischer Prozesse auch bei der Apoptose eine wichtige Rolle, wie am Beispiel des Fas-Liganden (FasL) gezeigt worden ist. So kann die proteolytische Spaltung von membranständigem FasL Apoptose in lymphoiden Zellen verhindern. Die proteolytische Prozessierung von FasL zu einem löslichen Molekül kommt einer Inaktivierung des membranständigen Liganden gleich. Dieser wurde als sehr potentes apoptose-induzierendes Molekül beschrieben (Tanaka et al., 1998).

Die Wichtigkeit dieser Metalloproteasen wurde in anderen Spezies bestätigt. In *Drosophila* beispielsweise, ist proteolytische Prozessierung von NOTCH durch ADAM kuzbanain (ADAM10) für die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems notwendig (Pan and Rubin, 1997). Das verwandte Molekül in *Caenorhabditis Elegans*, SUP-17, könnte ähnliche Funktionen besitzen (Wen et al., 1997).

1.3 Die TNF-Ligandenfamilie

Neben dem namensgebenden TNF gehören noch zahlreiche weitere Zytokine zur TNF-Familie. Eine Übersicht der bekanntesten Moleküle der TNF-Liganden Familie mit den jeweiligen komplementären Rezeptoren ist in Abb. 2 dargestellt. Es handelt sich mit Ausnahme von $LT\alpha$ und TWEAK um Typ-II Membranproteine, die ihre Homologien zu TNF im extrazellulären C-terminalen Bereich besitzen. Sie sind typischerweise als Trimer biologisch aktiv, wie explizit für TNF, $LT\alpha$ und CD40L gezeigt werden konnte. (Eck and Sprang, 1989; Jones et al, 1989; Bazan et al., 1993; Karpusas et al., 1995) und werden häufig auf der Oberfläche von T- und/oder B-Zellen exprimiert.

Für einige Liganden konnten lösliche Formen nachgewiesen werden, die durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne entstehen können (Kap. 1.1.1 und 1.2). Die Bioaktivität der löslichen Form ist im Vergleich zu membranständigen Form teilweise unterschiedlich. So besitzt die lösliche Form des FasL, wie in Kap. 1.2 dargestellt, stark verringerte Bioaktivität und kann deshalb mit der membranständigen Form des Liganden um Rezeptorbindung kompetieren und so seine Wirkung antagonisieren. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Liganden der TNF Familie hauptsächlich ihre Wirkung im Zell-Zell Kontakt vermitteln.

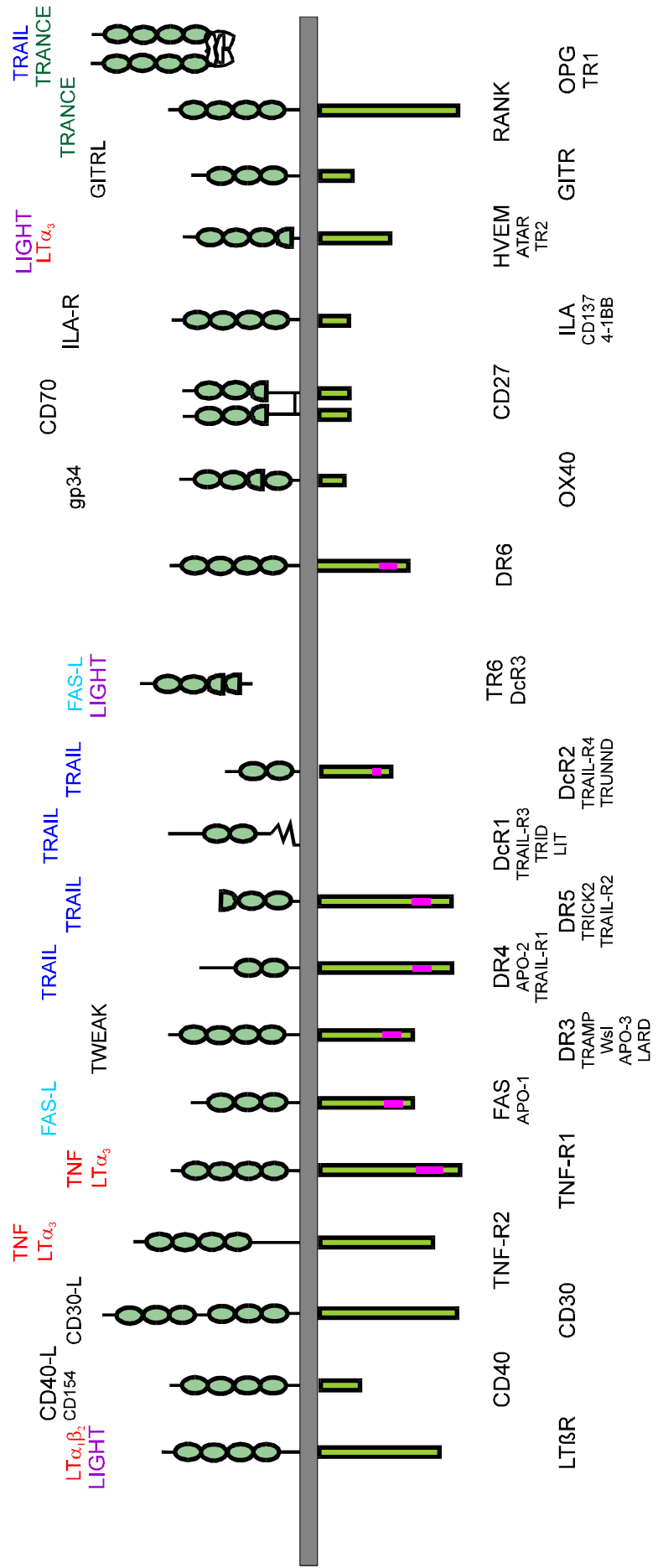


Abb. 2: Die TNF-Rezeptoren-Superfamilie mit ihren jeweiligen Liganden. Elypsenförmige Strukturen im extrazellulären Bereich der Rezeptoren stellen die cysteinreichen Subdomänen dar, die als allgemeines Strukturmerkmal dieser Rezeptoren gelten. Die "death domain" der jeweiligen Rezeptoren ist in magenta dargestellt. Der Lipidbilayer ist als grauer Balken skizziert. Einige Rezeptoren wurden gleichzeitig von verschiedenen Gruppen unabhängig identifiziert und tragen deshalb mehrere Namen (Abbildung erweitert nach Grell and Clauss, 1999).

1.4 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie

Die Zytokine der TNF-Familie binden an Rezeptoren einer komplementären Familie, der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Ein repräsentativer Ausschnitt der aktuell bekannten Moleküle ist in Abb. 2 dargestellt. Einige virale Genprodukte, die hier nicht dargestellt sind, gehören ebenfalls zur TNF-Rezeptor-Superfamilie (Smith et al., 1994). Die Rezeptoren dieser Superfamilie sind Typ-I Transmembranproteine und durch 2-6 Kopien einer cysteinreichen Subdomäne auf dem extrazellulären Teil des Rezeptors, die jeweils aus ca. 40 Aminosäure (AS) mit 6 konservierten Cysteinen bestehen, charakterisiert (Smith et al., 1994). Im intrazellulären Bereich gibt es keine Sequenzhomologien, die allen Mitgliedern dieser Familie gemeinsam sind.

Ein Teil der Rezeptoren allerdings zeigt Sequenzhomologie in einem ca. 80 AS umfassenden konservierten Bereich der intrazellulären Domäne, der als "death domain" (DD) bezeichnet wird. Das DD-Motiv wurde erstmals bei der Analyse von Fas-Mutanten als eine intrazelluläre Region, die für die Induktion von Apoptose notwendig ist, beschrieben (Itoh and Nagata, 1993). Die Deletion dieses ca. 80 AS großen Bereiches oder eine definierte Punktmutationen, wie z.B. ein Aminosäureaustausch an Position 225 bei Fas, wie er in Ipr-Mäusen gefunden wird, verhindern die Fas-FasL-vermittelte Apoptose. Die DD ist ein gemeinsames essentielles Strukturmotiv apoptotisch wirkender Rezeptoren, wie durch Struktur- bzw. Sequenzanalysen an den intrazellulären Domänen von TNF-R1 und Fas (Tartaglia et al., 1993a; Itoh and Nagata, 1993) ursprünglich gezeigt wurde. Homologe Sequenzen befinden sich auch in DR3, DR4, DR5 und DR6 (Marsters et al., 1996a; Chinnaiyan et al., 1996a; Kitson et al., 1996; Bodmer et al., 1997; Screaton et al., 1997a/b; Pan et al., 1997a/b; Walczak et al., 1997; Schneider et al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Chaudhary et al., 1997; Pan et al., 1998). Auch CD40 zeigt in einem ca. 40 AS umfassenden Bereich limitierte Sequenzhomologie zur DD (Itoh et al., 1991), gehört aber aufgrund seiner überwiegend proliferativen Funktionen nicht direkt zur Gruppe der DD-Rezeptoren.

Durch verschiedene experimentelle Zugänge ist gezeigt worden, daß die DD der DD-Rezeptoren autoaggregieren können (Song et al., 1994; Boldin et al., 1995a; Bazzoni et al., 1995). Liganden-unabhängige Autoassoziation der DD wird im Falle von TNF-R1 und von DR3 durch ein 60 kD Molekül, "silencer of death domain" (SODD), verhindert (Jiang et al., 1999). Ähnliche Modelle sind auch für die anderen DD-Rezeptoren vorstellbar.

Eine weitere Gemeinsamkeit einiger Mitglieder der TNF-Rezeptorsuperfamilie, ist die Fähigkeit TRAF-Proteine direkt zu binden und durch diese Adaptermoleküle intrazelluläre Signale, va. proliferativer Art, weiterleiten zu können (Übersicht in: Wajant et al., 1999). Die

TRAF-Familie ist durch gemeinsame Sequenzhomologien am C-terminalen Teil der Proteine, der sogenannten TRAF-Domäne, charakterisiert, die erstmals für die TNF-R2-assoziierten Proteine TRAF1 und TRAF2 beschrieben wurden (Rothe et al., 1994). Bisher sind 6 Moleküle (TRAF1-6) mit dieser typischen TRAF-Domäne in Säugerzellen beschrieben worden. Es gibt keine einheitliche TRAF-Bindesequenz innerhalb der TRAF-bindenden Rezeptoren, mit Ausnahme eines PXQX(T/S) Motivs in der intrazellulären Domäne von CD30, CD40, TNF-R2 und RANK (Ishida et al., 1996; Miller et al., 1998; Takeuchi et al., 1996; Anderson et al., 1997). Daneben ist ein (V/Q)EE-Motiv, über das TRAF2 an die Rezeptoren binden kann, in der intrazellulären Domäne von ATAR, CD30, OX40 und RANK identifiziert worden (Hsu et al., 1997; Boucher et al., 1997, Arch et al., 1998; Galibert et al., 1998; Darnay et al., 1998).

1.5 Die TNF-Rezeptoren

1.5.1 Lokalisation und Funktion

Zwei verschiedene TNF-Rezeptoren, TNF-R1 und TNF-R2, wurden identifiziert und kloniert (Loetscher et al., 1990; Schall et al., 1990; Smith et al., 1990; Himmler et al., 1990; Heller et al., 1990; Nophar et al., 1990; Goodwin et al., 1991). Das Gen für TNF-R1 ist auf Chromosom 12p13 lokalisiert (Fuchs et al., 1992), während das Gen des TNF-R2 auf Chromosom 1p36 lokalisiert ist (Baker et al., 1991). Die Analyse der mRNA-Expression zeigt eine nahezu ubiquitäre Expressionsverteilung beider Rezeptoren.

Die meisten TNF-Antworten (Kap. 1.1) werden über TNF-R1 vermittelt. Dies läßt sich teilweise damit erklären, daß lösliches TNF bei physiologischer Temperatur (37°C) eine ca. 20-fach höhere Affinität zu TNF-R1 als zu TNF-R2 besitzt (Grell et al., 1998b). Daneben sind für TNF-R1 zahlreiche nachgeschaltete Signalwege gezeigt worden, die sich in der Vielfalt der verschiedenen TNF-Antworten widerspiegelt. Während TNF-R1 durch lösliches und membranständiges TNF aktiviert werden kann (Kap. 3; Grell, persönliche Mitteilung), wird TNF-R2 vor allem durch die Transmembranform aktiviert (Grell et al., 1995).

Einige zelluläre Antworten können jedoch durch TNF-R2 allein vermittelt werden, so die Induktion der Thymozyten- und T-Zell-Proliferation (Tartaglia et al., 1991, 1993b, Vandenabeele et al., 1992; Grell et al., 1998a), die Produktion von GM-CSF (Vandenabeele et al., 1992), die Aktivierung von NF- κ B (Rothe et al., 1995a), sowie in manchen Systemen, überraschenderweise auch die Induktion von Apoptose (Heller et al., 1992; Grell et al., 1993; 1994a/b; 1995; Medvedev et al., 1994; Bigda et al., 1994). Vercammen und Kollegen konnten zeigen, daß die Stimulation des TNF-R2 zur Bildung und Freisetzung von

endogenem TNF führt, das durch Aktivierung des TNF-R1 zytotoxische Signale vermitteln kann (Vercammen et al., 1995). Ob es sich bei dem endogenen TNF um die löslich oder membranständige Form des Moleküls handelt, konnte nicht geklärt werden.

Auf welche Weise andere Nicht-DD-Rezeptoren, wie z.B. der LT- β -Rezeptor, CD40 oder CD30, Apoptose vermitteln, war lange Zeit unklar. Neuere Erkenntnisse anhand von Deletionsstudien zeigen, daß im Falle des LT- β -Rezeptors TRAF3 eine Rolle in der Vermittlung apoptotischer Signale zu spielen scheint (VanArsdale et al., 1997). Für CD40 und CD30 wurde kürzlich ein anderer Mechanismus vorgeschlagen (Grell et al., 1999). So induziert Stimulation dieser Rezeptoren die Expression von membranständigem TNF, das wiederum durch Interaktion mit TNF-R1 Apoptose vermitteln kann. Für TNF-R2 konnte ebenfalls gezeigt werden, daß dieser Rezeptor die Expression von membranständigem TNF induziert, das wiederum über TNF-R1 Apoptose vermittelt (Grell et al., 1999)

Für die Rezeptorkooperation zwischen den beiden TNF-Rezeptoren sind noch zwei weitere Modelle vorgeschlagen worden. Zum einen das "ligand passing" Modell, nach dem der TNF-R2 als TNF-Zuträger für TNF-R1 auf der Zelloberfläche dient und dadurch auf TNF-R1-Antworten verstärkend wirkt (Tartaglia et al., 1993c). Ein weiteres Modell wurde für die TNF-R1 vermittelte Apoptose vorgeschlagen. So kompetiert TNF-R1 mit TNF-R2 um die Bindung mit TRAF2, einem zentralen Regulator der TNF-R1-induzierten Apoptose. Dadurch wird die TRAF2-Bindung an TNF-R1 verringert und damit die Verfügbarkeit der TRAF2-assoziierten Schutzfaktoren am TNF-R1, wodurch die apoptotische TNF-Antwort verstärkt wird (Weiss et al., 1997; Weiß, 1997).

Wie bereits in Kap. 1.2 beschrieben, kann TNF-R2 durch TACE proteolytisch abgespalten und somit inaktiviert werden (Peschon et al., 1998). Für TNF-R1 wird spekuliert, daß seine Ektodomäne ebenfalls durch eine noch zu identifizierende Metalloprotease abgespalten werden könnte (Müllberg et al., 1995). Es wird angenommen, daß lösliche TNF-Rezeptoren mit membranständigen Rezeptoren um die Bindung an TNF kompetieren und so die proinflammatorische TNF-Antwort verringern können (Engelmann et al., 1989). Im Umkehrschluß ist davon auszugehen, daß reduziertes TNF-Rezeptor *Shedding* zu einem verlängerten TNF-Signal führen könnte. Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, daß es durch vererbte Mutationen innerhalb der extrazellulären Domäne des TNF-R1 zu einem reduzierten *Ektodomain-Shedding* kommen kann. Betroffene Personen zeigen phasenweise einen auto-inflammatorischen Phänotyp, der als "TNF-R1-associated periodic syndromes" bezeichnet wird (Dermott et al., 1999). Diese Befunde unterstreichen die Wichtigkeit der Gegenregulation TNF-R1-induzierter proinflammatorischer Prozesse.

1.6 Intrazelluläre Signalwege des TNF-R1

Es sind eine Vielzahl verschiedener TNF-Antworten beschrieben worden. Meistens werden sie via TNF-R1 vermittelt (Kap. 1.1.1 und 1.5.1). Um dies auf molekularer Ebene umzusetzen, werden von der Zelle viele unterschiedliche Signalwege benutzt (Übersicht in Heller and Krönke, 1997; Grell and Scheurich, 1997; Grell and Clauss, 1999). Da TNF-R1 keine enzymatische Aktivität aufweist, werden die Signale über Adapterproteine in der Zelle weitergeleitet. Die Autoassoziation der DD von TNF-R1 und damit Autoaktivierung der intrazellulären Signalkaskaden wird durch SODD (Jiang et al., 1999; Kap. 1.4) verhindert. Nach Rezeptorstimulation zerfällt der TNF-R1-SODD Komplex und die DD des TNF-R1 wird für andere Adapterproteine zugänglich. Einige wichtige TNF-R1-vermittelte Signalwege und deren weitere Regulation werden im folgenden diskutiert.

1.6.1 Zentrale Apoptotische Signalwege

Apoptotische Signale werden über die Aktivierung von Cystein-Proteasen, den sogenannten Caspasen, vermittelt. Ihnen wird eine Schlüsselrolle in der Induktion der Apoptose beigemessen (Henkart, 1996). Spezifische Caspaseninhibitoren wie CrmA (*cytokine response modifier A*) oder zVAD-fmk zeigen, daß in DD-Rezeptor-induzierter Apoptose immer Caspasen involviert sind (Miura, et al., 1995; Tewari and Dixit, 1995; Marsters et al., 1996b; Bodmer et al., 1997; Chinnaiyan et al., 1996a; Pan et al., 1997a, Walczak et al., 1997, Pan et al., 1998).

Die Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und bestehen aus drei Domänen: Einer N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (ca. 20 kD) und einer kleinen Untereinheit mit ca. 10 kD. Die Aktivierung erfolgt durch zwei proteolytische Spaltungen zwischen den Domänen. Caspasen mit langen Prodomänen werden als Initiator-Caspasen bezeichnet, da sie relativ früh im apoptotischen Signalgeschehen aktiviert werden. Diese Caspasen sind nach Aktivierung in der Lage, eine weitere Gruppe von Caspasen, die sogenannten Effektor-Caspasen zu aktivieren. Der genaue Ablauf der apoptotischen Signalkaskaden ist jedoch noch unklar (Enari et al., 1996). Gezeigt ist jedoch, daß die Effektor-Caspasen direkt an der Ausführung des apoptotischen Signals beteiligt sind indem sie spezifische "Todessubstrate" spalten. Poly(ADP)-Ribose-Polymerase, Gelsolin, ICAD (*inhibitor of caspase-activated desoxyribonuclease*) und Laminine sind Substrate dieser Effektor-Caspasen (Übersicht in Li and Yuan, 1999). Die Proteolyse dieser Proteine ist direkt für die charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose verantwortlich und somit auch für den Zelltod. Durch Spaltung des zytoplasmatisch vorliegenden Inhibitormoleküls ICAD beispielsweise, wird die DNase CAD (*caspase-activated DNase*,

Enari et al., 1998; =DFF, DNA-fragmentation factor, Liu et al., 1997) aktiviert und kann in den Zellkern transloziert werden. Im Nukleus kann sie dann DNA fragmentieren (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998).

Nach Rezeptor-Stimulation wird eine Initiator-Caspase, die Caspase 8 (=FLICE, *FADD-like ICE*, Muzio et al., 1996; Boldin et al., 1996) über zwei DD-enthaltende Adapterproteine in den TNF-R1 Signalkomplex rekrutiert. Diese sind TRADD (*TNF-R1-associated death domain*, Hsu et al., 1995) und FADD (*Fas-associated death domain*, Hsu et al., 1996a; Chinnaiyan et al., 1996b, Boldin et al., 1996). Ein weiteres Strukturmotiv, die "death effector domain" (DED) befindet sich am N-terminalen Teil von FADD (Chinnaiyan et al., 1995, 1996b). Es wird angenommen, daß die Caspase 8, die ebenfalls eine DED am N-terminalen Teil besitzt, über diese Domäne an den TNF-R1 Rezeptorkomplex rekrutiert wird. FADD-defiziente Mäuse bestätigen die wichtige Rolle dieses Adaptermoleküls in der TNF- und FasL-vermittelten Apoptose (Zhang et al., 1998; Yeh et al., 1998). Apoptoseinduktion über Fas ist ein relativ gut verstandener Signalweg: Oligomerisierung von Fas induziert die Bildung eines sogenannten DISC (*death inducing signaling complex*), der aus Rezeptoren und assoziierten Proteinen besteht (Kischkel et al., 1995). In diesem Komplex bindet Caspase 8 über zwei unterschiedlich phosphorylierte Formen von FADD an den Rezeptor. Dadurch können apoptotischen Kaskaden, die denen des TNF-R1 ähnlich sind, in Gang gesetzt werden.

Die Rekrutierung von Caspase 8 in den TNF-R1 Signalkomplex resultiert in einer Auto-Aktivierung dieser Caspase. Es wird angenommen, daß Caspase 8 dann kaskadenartig weitere Caspasen aktivieren kann. Die Caspase 3 wird als zentraler Mediator der TNF-R1-vermittelten Apoptose angesehen (Übersicht in: Ashkenazi and Dixit, 1998). Für eine initiale Regulierung der Caspase-8-induzierten Proteasekaskaden scheint ein Molekül wichtig zu sein, das an Caspase-8 binden kann und unter bestimmten Umständen negativ regulatorisch auf Fas-Rezeptor induzierte Apoptose wirkt. Dieses Molekül wurde gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert und mit folgenden Namen bezeichnet: Casper (Shu et al., 1997), I-FLICE (Hu et al., 1997), FLIP (Irmeler et al., 1997), FLAME-1 (Srinivasula et al., 1997), MRIT (Han et al., 1997), CASH (Goltsev et al., 1997), CLARP (Inohara et al., 1997) und Usurpin (Rasper et al., 1998). Ein ähnliches Szenario wie für Fas-Rezeptor ist für die TNF-R1-induzierte Apoptose vorstellbar, da gezeigt wurde, daß eine dominant-negative Mutante der Caspase-8 ebenfalls TNF-induzierten Zelltod inhibiert (Boldin et al., 1996).

Ein weiterer apoptotischer Signalweg divergiert am TRADD-Molekül. Da TRADD als Adapter für zahlreiche intrazelluläre Signalwege dient, könnte man dieses Molekül als Adapterplattform bezeichnen. In Überexpressionsexperimenten wurde gezeigt, daß neben FADD auch das DD-Protein RIP (*receptor interacting protein*) über TRADD ligandenabhängig

in den TNF-R1-Signalkomplex rekrutiert wird (Hsu et al., 1996b). RIP besteht aus einer C-terminalen DD und einer N-terminalen Domäne mit Homologien zu der Kinase-Domäne von Serin-Threonin-Kinasen zeigt (Stanger et al., 1995). Die Überexpression von RIP führt zur Induktion von Apoptose und auch zur Aktivierung von NF- κ B (Hsu et al., 1996b; Grimm et al., 1996). Über die Funktion der Kinase-Domäne ist bislang noch nichts bekannt. Für die DD konnte jedoch die Bindung des DD-Proteins RAIDD/CRADD (Duan and Dixit, 1997; Ahmad et al., 1997) gezeigt werden, dessen Überexpression Apoptose induziert, die durch Caspase-Inhibitoren wie CrmA oder zVAD-fmk hemmbar ist. Die N-terminale Region von RAIDD weist ein sogenanntes CARD- (*caspase recruitment domain*) Motiv auf, an das die homologe Domäne in der regulatorischen Domäne der Caspase 2 (ICH-1) binden und damit Caspase 2 aktiviert wird (Duan and Dixit, 1997).

1.6.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

In der Literatur gibt es inzwischen einige Hinweise für die Notwendigkeit von zwei unterschiedlichen Signalwegen, die zur effizienten Transkription NF- κ B-abhängiger Gene notwendig sind. Diese Signalkaskaden sind in Abb. 3 skizziert und werden im folgenden diskutiert.

1.6.2.1 Translokation von NF- κ B in den Zellkern

Auch für diesen Signalweg ist TRADD die Adapterplattform. Das bereits oben erwähnte DD-Molekül RIP bindet nach Rezeptorstimulation über seine DD an TRADD und über seine intermediäre Region an TRAF2 (Hsu et al., 1996b). In Überexpressionsstudien wurde gezeigt, daß RIP als Mediator dieses Signalweges fungiert (Hsu et al., 1996b; Liu et al., 1996). Die Etablierung RIP-defizienter Mäuse bestätigte die essentielle Rolle dieses Moleküls in der TNF-induzierten NF- κ B-Aktivierung (Kelliher et al., 1998).

An die N-terminale Region des TRADD-Moleküls kann TRAF2, das in transienten Überexpressionsstudien NF- κ B aktivieren kann (Rothe et al., 1995a), mit seiner C-TRAF-Domäne binden (Hsu et al., 1996a; Takeuchi et al., 1996). Mutationsanalysen haben gezeigt, daß für diese Funktion der RING-Finger sowie die ersten beiden Zink-Finger des Moleküls essentiell sind (Takeuchi et al., 1996). Eine Deletionsmutante, bei der das RING-Finger-Motiv fehlt, wirkt daher als dominant-negativer Inhibitor der TNF-R1-induzierten NF- κ B-Aktivierung (Rothe et al., 1995a). TRAF2 bindet wiederum NIK (*NF- κ B inducing kinase*; Malinin et al., 1997), wobei für diese Bindung nicht nur die TRAF-Domäne, sondern auch weitere N-terminale Regionen von TRAF2 notwendig sind.

NIK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die Homologien zu MAPKK-Kinasen zeigt. Überexpression von NIK führt zur NF- κ B-Aktivierung. Eine Mutante ohne Kinase-Funktion blockiert dagegen die NF- κ B-Aktivierung, die durch Überexpression von TNF-R1, TRADD oder TRAF2 induziert wird. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß NIK die I κ B Kinasen α und β (IKK α/β bzw. IKK-1/IKK-2) binden kann, die Bestandteile eines ca. 900 kd Proteinkomplexes, dem sogenannten IKK-Komplex, sind (Regnier et al., 1997; DiDonato et al., 1997; Woronicz et al., 1997). NIK scheint allerdings vorwiegend die IKK-1 zu aktivieren (Ling et al., 1998). Der durch TNF-R1 initiierte Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B führt demnach über die Assoziation der Moleküle TRADD, RIP, TRAF2 und NIK zur Aktivierung des IKK-Komplexes, die dann durch Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitor-Proteins I κ B, dessen Degradation induzieren. Das freigesetzte NF- κ B kann nachfolgend über seine nukleäre Lokalisationssequenz in der Zellkern transloziert werden und an die DNA binden (Malinin et al., 1997; Maniatis, 1997; Stancovski and Baltimore, 1997). Dieser Signalweg scheint zwar ausreichend, aber nicht essentiell für die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung zu sein, da in TRAF2-defizienten Mäusen bzw. in Mäusen mit einer dominant negativen Mutante von TRAF2, noch TNF-induzierte NF- κ B-Kerntranslokation nachgewiesen werden kann (Lee et al., 1997a; Yeh et al., 1997). Es wird spekuliert, daß ein weiteres Mitglied der TRAF-Familie, TRAF5, TRAF2 in der NF- κ B-Aktivierung substituieren könnte.

Alternative TNF-R1-vermittelte NF- κ B-Aktivierungswege sind vorstellbar. Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß MEKK1 (*MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase 1*) IKK-1 und IKK-2 *in vitro* aktivieren kann (Lee et al., 1998). Ein weitere Möglichkeit wurde kürzlich von Sanz und Kollegen vorgeschlagen (Sanz et al., 1999). Danach wird die atypische Proteinkinase ζ (ζ PKC) über das Adapterprotein p62 an den TNF-Signalkomplex rekrutiert. Molekularer Adapter im TNF-R1 Signalkomplex für p62 ist RIP. Über diesen Signalweg kann ohne die Beteiligung von TRAF-Proteinen eine selektive Aktivierung der IKK-2 vermittelt werden (Sanz et al., 1999).

Die Regulation des IKK-Komplexes wurde in letzter Zeit intensiv untersucht. Neben IKK-1 und IKK-2 sind noch weitere Mitglieder des Komplexes identifiziert worden. So spielt NEMO (*NF- κ B essential modulator* = IKK γ , Yamaoka et al., 1998; Rothwarf et al., 1998) eine essentielle Rolle in der Aktivierung und Regulation der IKK, ohne direkt an der Phosphorylierung der I κ Bs beteiligt zu sein. Ein weiteres Molekül des Komplexes, IKAP (*IKK-complex-associated protein*, Cohen et al., 1998) dient als sogenanntes "Gerüstprotein", das die richtige Anordnung der Kinasen zueinander sicherstellt. Neuere Daten aus IKK-1 defizienten Mäusen legen den Schluß nahe, daß diese Kinase nicht essentiell für die TNF-

induzierte NF- κ B-Aktivierung ist, sondern vielmehr eine wichtige Rolle in der Morphogenese und in der Differentiation von epidermalen Keratinozyten spielt (Hu et al., 1999). IKK-2 dagegen wird als zentraler Mediator in der Weiterleitung von Signalen proinflammatorischer Stimuli, wie z.B. TNF, angesehen (Delhase et al., 1999). Der bereits beschriebene Signalweg über TRADD-RIP-p62- ζ PKC aktiviert selektiv die IKK-2 und könnte deshalb besondere Bedeutung in der TNF-induzierten NF- κ B-Aktivierung haben.

Die oben beschriebenen Signaltransduktionswege werden durch weitere Interaktionsmoleküle im positiven und negativen Sinn reguliert. Die als TRIP, I-TRAF/TANK und A20 bezeichneten Moleküle wirken dabei regulatorisch auf die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung (Lee et al., 1997b; Song et al., 1996; Cheng and Baltimore, 1996; Rothe et al., 1996). Da weiterhin gezeigt wurde, daß NF- κ B-abhängige Proteine eine Schutzfunktion gegen TNF-induzierte Apoptose ausüben können (Liu et al., 1996; Wu et al., 1996; VanAntwerp et al., 1996; Wang et al., 1996; Beg and Baltimore, 1996), wirken die Moleküle TRIP, I-TRAF/TANK und A20 auch hier regulatorisch. Die TRAF-bindenden Proteine cIAP1 und cIAP2 gehören zu einer Familie von zellulären und viralen Proteinen, die anti-apoptotisch wirken können (Hawkins et al., 1996, Vaux and Strasser, 1996) und wahrscheinlich durch eine direkte, inhibitorische Wirkung auf pro-apoptotische Caspasen ausüben (Roy et al., 1997; Deveraux et al., 1997). Kürzlich wurde vorgeschlagen, daß cIAP1 und cIAP2 (Rothe et al., 1995b) über TRAF1 und TRAF2 and den TNF-R1-Signalkomplex rekrutiert werden und dort direkt die Aktivierung der Caspase 8 inhibieren (Wang et al., 1998a). Ein weiteres TRAF-bindendes Protein ist Peg3 (Relaix et al., 1999). Es scheint über die Bindung an TRAF2 die NF- κ B-Aktivierung zu modulieren und anti-apoptotisch zu wirken. In anderen Signalwegen scheint es pro-apoptotische Funktionen zu haben (Relaix et al., 1999).

1.6.2.2 Transaktivierung von DNA-gebundenem NF- κ B

Durch Inhibitionsstudien konnte gezeigt werden, daß die DNA-Bindung des NF- κ B-Heterodimers nicht ausreicht, um eine effiziente Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen zu induzieren (Beyaert et al., 1996; Vanden Berghe et al., 1998; Bergmann et al., 1998).

TNF induziert, wie bereits erwähnt, durch Aktivierung des IKK-Komplexes die Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitormolekül I κ B und damit die Freisetzung und Translokation von NF- κ B Heterodimeren, die vorwiegend aus p50/p65-Heterodimeren aufgebaut sind (Beg et al., 1993; Beg and Baldwin, 1994). Zum effizienten Transkriptionsstart muß die p65 Untereinheit jedoch phosphoryliert werden (Wang et al., 1998b; Zhong et al.,

1998). Dies kann zu einer verstärkten Bindung von transkriptionellen Koaktivatoren wie etwa CBP/p300 führen (Zhong et al., 1998).

Wie kann TNF eine Phosphorylierung von p65 vermitteln? Beyaert und Kollegen konnten zeigen, daß die TNF-induzierte Aktivierung der p38 MAP (*mitogen-activated protein*) Kinase Signalweg für die Transaktivierung des NF- κ B Moleküls wichtig ist (Beyaert et al., 1996). Der molekulare Mechanismus, wie die p38 MAP Kinase Signalkaskade die Transaktivierung der p65 Unterheit vermittelt, ist noch unklar. Auch die Kinasen, die p65 phosphorylieren, sind noch nicht bekannt.

Es sind jedoch mehrere molekulare Adaptoren bekannt, die die Aktivierung der p38 MAP Kinase Kaskade durch den TNF-R1 Rezeptorkomplex vermitteln: Die MAPKK Kinase ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*; Ichijo et al., 1997) und die Serin-Threonin-Kinasen GCKR/GCK (*germinal center kinase-related protein kinase / germinal center kinase*, Shi and Kehrl, 1997; Yuasa et al., 1998) wurden als Aktivatoren des p38 Signalweges und des JNK Signalweges (siehe unten) beschrieben. ASK1 gilt zusätzlich auch als Mediator TNF-induzierter Signalwege, die zur Apoptose führen (Ichijo et al., 1997). Über TRAF2 könnten diese Kinasen als molekulare Adapter des p38 MAP Kinase Signalweges an den TNF-R1 Signalkomplex fungieren. Im Gegensatz dazu konnte durch eine Kinase-inaktive Mutante der für die NF- κ B-Aktivierung beschriebene MAPKKK NIK von Carpentier und Kollegen gezeigt werden, daß dieses Molekül keinen Einfluß auf den p38 MAP Kinase Signalweg hat (Carpentier et al., 1998).

Über weitere nachgeschaltete Kinasen dieser Signalkaskade, hauptsächlich MAPKK3 und MAPKK6 (Dérillard et al., 1995; Raingeaud et al., 1996), kann dann die direkte Aktivierung der p38 MAP Kinase vermittelt werden. Als Substrate der p38 MAP Kinase sind unter anderem verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF-1, ATF-2, CHOP oder Max, beschrieben worden. Der Transkriptionsfaktor ATF-2 kann mit NF- κ B in einer DNA-

abhängigen Art interagieren und dadurch zu einer verstärkten Transkription NF- κ B abhängiger Gene führen (Du et al., 1993; Kaszubska et al., 1993). Daneben sind noch Kinasen als Substrate identifiziert worden (z.B. MAPKAP Kinase 2, Rouse et al., 1994).

Eine Rolle in der Transaktivierung des NF- κ B Moleküls könnte auch der ERK (*extracellular regulated signal kinase*) Signalweg spielen (Vanden Berghe et al., 1998). Der Mechanismus ist allerdings unklar.

Ein Lipasen-abhängiger Signalweg, der die Transaktivierung des NF- κ B-Moleküls vermitteln könnte, ist kürzlich von Bergmann und Kollegen anhand von Inhibitorstudien vorgeschlagen worden (Bergmann et al., 1998). Danach ist die Aktivierung der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C und der Proteinkinase C notwendig, um eine effiziente Transkription NF- κ B-abhängiger Gene zu vermitteln. Deren Kopplung an den TNF-R1 ist in Kap. 1.6.4. näher erläutert.

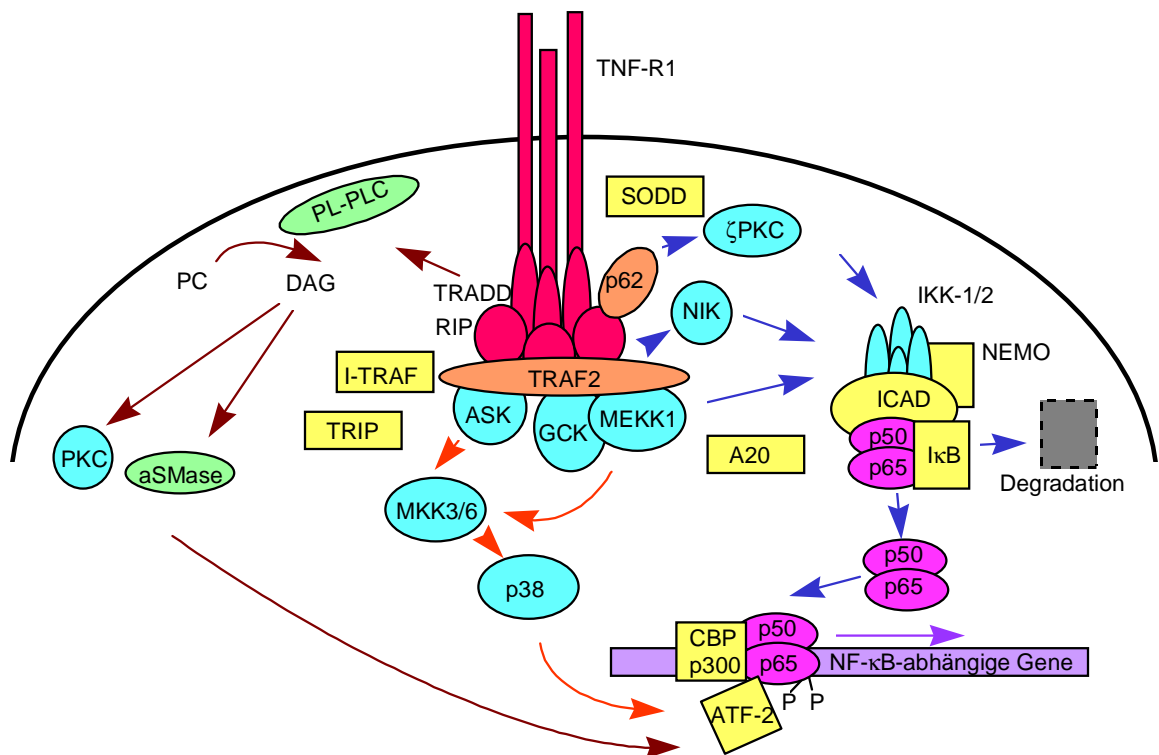


Abb. 3: TNF-R1-induzierte NF- κ B-Aktivierung. Die bekanntesten Signaltransduktionswege, die von TNF-R1 zur NF- κ B-Aktivierung führen, sind schematisch dargestellt. Proteinkinasen sind türkis dargestellt, Proteine, die eine *death domain* enthalten, rot, Adapterprotein ohne *death domain* sind orange dargestellt und inhibitorische bzw. regulatorische Proteine gelb. Der Signaltransduktionsweg, der zur Kerntranslokation des NF- κ B-Moleküls führt, ist mit blauen Pfeilen skizziert und die Signalwege, die zur Transaktivierung des NF- κ B-Moleküls führen in roten bzw. braunen Pfeilen. Weitere Einzelheiten sind im Text erläutert.

1.6.3 Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)

An TRAF2 divergiert noch ein weiterer Signaltransduktionsweg des TNF-R1: Die Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK = SAPK, *Stress-activated-protein-kinase*). Dies ergibt sich aus verschiedenen Untersuchungen, die zeigen, daß die Überexpression von TRAF2 nicht nur zur Aktivierung von NF- κ B, sondern auch zur Aktivierung der JNK führt, und daß die dominant-negative TRAF2-Mutante auch die JNK-Aktivierung hemmt (Reinhard et al., 1997; Liu et al., 1996, Natoli et al., 1997; Song et al., 1997). Da die Überexpression von NIK keinen Einfluß auf die JNK-Aktivität hat, und die Kinase-inaktive NIK-Mutante zwar die NF κ B-, nicht aber die JNK-Aktivierung hemmt, scheinen am TRAF2-Molekül die Wege zur NF κ B- und JNK-Aktivierung zu divergieren (Song et al., 1997).

Ein Weg zur JNK-Aktivierung ausgehend von TRAF2 scheint über eine direkte Assoziation der GCKR/GCK (Shi and Kehrl, 1997; Yuasa et al., 1998) und MEKK1 (Song et al., 1997; Baud et al., 1999) vermittelt zu werden. Ein zweiter Weg führt auch durch eine direkte TRAF2-Assoziation der bereits bei der NF- κ B-Aktivierung erwähnten MAPKK Kinase ASK1 zur JNK-Aktivierung (Nishitoh et al., 1998). Ein dritter Weg ist über die Serin-Threonin-Kinase HGK (*HPK/GCK-like kinase*) beschrieben worden (Yao et al., 1999). Da mindestens zwei dieser Kinasen direkt mit TRAF2 interagieren können, ist anzunehmen, daß die Aktivierung dieser Kinasen durch weitere, noch näher zu charakterisierende Faktoren moduliert und kontrolliert wird. Dabei ist es vorstellbar, daß diese Kinasen einen Signalkomplex, ähnlich dem IKK-Komplex bilden.

Die TRADD/TRAF2-Interaktion scheint, im Gegensatz zur Translokation des NF- κ B-Moleküls, in der Aktivierung der c-jun-N-terminalen Kinasen essentiell zu sein, wie die Experimente mit den bereits erwähnten TRAF2-defizienten Mäusen bzw. Mäusen, die eine dominant-negativ Mutante von TRAF2 exprimieren, zeigen (Lee et al., 1997a; Yeh et al., 1997).

1.6.4 Weitere Signalwege des TNF-R1

Neben TRADD kann noch Sentrin und das DD-Protein MADD (*MAP kinase activator with death domain*) an die DD von TNF-R1 binden. Sentrin ist 101 AS groß und bindet auch an die DD von Fas. Zur Funktion dieses Moleküls ist bislang nur bekannt, daß Überexpression von Sentrin Zellen vor Fas- und TNF-induzierter Apoptose schützen kann (Okura et al., 1996). Mitogene Signalkaskaden können auch über MADD an TNF-R1 gekoppelt werden. So aktiviert die Überexpression von MADD die MAP Kinase ERK (*Extracellular signal-regulated*

kinase), und die Expression der DD von MADD stimuliert außer ERK noch JNK und Phosphorylierung der Phospholipase A₂ (Schievella et al., 1997).

Über die Aktivierung verschiedener Lipasen ist bisher nur wenig bekannt. TNF vermittelt über die Aktivierung der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PC-PLC) die Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) aus Membranphospholipiden (Schütze et al., 1991). DAG scheint bei Aktivierung der Sphingomyelinase mit einem sauren pH-Optimum eine Rolle zu spielen (Schütze et al., 1994). Daneben scheint aber noch eine Aktivierung der sauren Sphingomyelinasen über die Adapterproteine TRADD und FADD möglich zu sein (Schwander et al., 1998). Durch die Hydrolyse von Sphingomyelin durch die endosomal/lysosomal lokalisierte saure Sphingomyelinase entsteht Ceramid. Es ist auf noch ungeklärte Weise an der Vermittlung apoptotischer Signale sowie der NF κ B- Aktivierung beteiligt (Wiegmann et al., 1994; Testi et al., 1996).

Auch an Regionen außerhalb der DD des TNF-R1 binden verschiedene Proteine: TRAP1 (TNF receptor associated protein 1, Song et al., 1996b), das Sequenzhomologien zum hsp 90 Protein aufweist, 55.11, das Homologien zu einer Untereinheit des Proteasoms zeigt (Boldin et al., 1995c), FAN (*Factor associated with N-SMase activation*, Adam-Klages et al., 1996) und PIP5 Kinase (Castellino et al., 1997). Über die Bedeutung von TRAP1 und 55.11 für die TNF-R1-Signaltransduktion ist zur Zeit noch nichts bekannt. FAN vermittelt die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase. Das durch die neutrale Sphingomyelinase aus Membransphingomyelin freigesetzte Ceramid führt dann offenbar zur Aktivierung der Phospholipase A₂ und damit zur Produktion proinflammatorischer Metabolite (Adam et al., 1996; Adam-Klages et al., 1996; Heller and Krönke, 1994). Durch die PIP5 Kinase wird PIP₂ gebildet, ein wichtiger sekundärer Botenstoff. PIP₂ könnte eine Verbindung zwischen TNF-R1 und der Proteinkinase C sowie Calcium-abhängigen enzymatischen Aktivitäten darstellen (Castellino et al., 1997).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Expression von membranständigem TNF ist ausreichend, um einen pathologischen Phänotyp in der Maus, vergleichbar mit der rheumatoiden Arthritis im Menschen, auszulösen (Kap. 1.1.2, Alexopoulou et al., 1997). Ob und in welchem Ausmaß juxtatrope bzw. autotrope Signalketten von membranständigen TNF über TNF-R1 daran beteiligt sind, ist bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit soll daher ein Modellsystem zur Untersuchung der Interaktion von membranständigem TNF (tmTNF) und TNF-R1 unter Ausschluß von Effekten, die durch lösliches TNF induziert werden können, etabliert werden. Zur Charakterisierung des Modellsystems soll Zelloberflächen-Expression von TNF-R1 und tmTNF in tmTNF-überexprimierenden Zellen analysiert werden. Davon ausgehend sollen dann einige typische TNF-R1 Signalwege in diesen Zellen näher beleuchtet werden und dabei insbesondere untersucht werden, ob die daraus resultierenden TNF-Antworten auch durch Interaktion von tmTNF und TNF-R1 auf dergleichen Zelle vermittelt werden können (autotrop) und/oder ob der direkte Zellkontakt zur Nachbarzelle notwendig ist (juxtotrop).

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--|-----------------------------------|
| Zellkulturplatten und -flaschen | Greiner, Frickenhausen |
| RPMI 1640 | Seromed, Berlin |
| hiFCS | “ |
| Trypsin/EDTA-Lösung | “ |
| EDTA-Lösung | “ |
| HBSS | “ |
| HBSS ohne Phenolrot | “ |
| DMEM | “ |
| Zeocin | Invitrogen, Leek, Holland |
| Cycloheximid | Sigma, Deisenhofen |
| TEMED | “ |
| TNF-ELISA-Testkit | R & D Systems, Wiesbaden |
| IL-6-ELISA-Testkit | Pharmingen, San Diego, USA |
| RiboQuant™ Multi-Probe RNase Protection Assay System | “ |
| Multi-Probe Template Set hAPO5 | “ |
| RNA-Insta-Pure | Eurogentec s.a , Seraing, Belgien |
| (α ^{33}P) UTP (20 mCi/ml) | Amersham Buchler, Braunschweig |
| (γ ^{33}P) ATP (10 mCi/ml) | “ |
| (γ ^{32}P) ATP (10 mCi/ml) | “ |
| Na ^{125}I (100 mCi/ml) | “ |
| Blotting-Papier Whatman 3MM Chr | Whatman International, England |
| Nitrozellulose | Schleicher und Schuell, |
| Protein-G-Sepharose | Pharmacia LKB, Freiburg |
| PD Sephadex G25 Säule | “ |
| Protease-Inhibitoren | Boehringer, Mannheim |
| (PMSF, NaF, Na-orthovanadat, Leupeptin) | |
| Bio-Rad Protein-Assay | Bio-Rad, München |
| Nuc Trap® Probe Purification Columns | Stratagene, Heidelberg |
| Inhibitor SB203580 | Smith-Kline Beechem, England |
| zVAD-fmk | Bachem, Heidelberg |

Rekombinantes humanes TNF mit einer spezifischen Aktivität von 2×10^7 U/mg wurde von I.-M. von Broen, Knoll AG, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt.

Rekombinantes IL-1 β wurde von Immunokontakt, Frankfurt, bezogen.

c-Jun-GST-Fusionsprotein als Substrat für die JNK-Assays wurde von F. Mühlenbeck, Institut für Zellbiologie und Immunologie präpariert, das hierfür verwendete Expressionskonstrukt pGex-c-Jun (1-87) wurde von I. Berberich, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Alle anderen Reagenzien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

2.1.2 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 |
| 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 (zytoplasmatische Extrakte) | 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,9, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF |

2.1.3 Antikörper

| | |
|--|--|
| FITC-konjugierter Ziege anti-Maus-Ig Ak (IgG und IgM) | Dianova, Hamburg |
| Maus anti-hu TNF-R1 mAk H398 (IgG2a) [Thomae et al. 1990] | Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart |
| Maus anti-hu TNF mAk T1 (IgG1) | “ |
| Maus anti-hu-TNF mAk 357-101-4 | A. Meager (NIBSC; Herts, UK) |
| Maus anti-hu TNF mAk MAB610 (IgG1) | R & D Systems, Wiesbaden |
| Biotinylierter Ziege anti-hu TNF mAk MAF210 (IgG) | “ |
| Kaninchen anti-hu JNK1 polyklonaler Ak | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA |
| Kaninchen anti-hu p50 NF-kB polyklonaler Ak | “ |
| Kaninchen anti-hu p65 NF-kB polyklonaler Ak | “ |
| Kaninchen anti-hu c-rel NF-kB polyklonaler Ak | “ |

| | |
|--|--|
| Kaninchen anti-hu p38 MAP kinase polykloner Ak | New England BioLabs, Schwalbach |
| Kaninchen anti-hu phosphorylierte p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) polyklonaler Ak | “ |
| <i>horseradish peroxidase</i> -konjugierter Ziege anti- Kaninchen polyklonaler Ak | “ |
| Maus anti-hu Caspase-3 mAk (IgG2a) | Transduction Laboratories, Lexington, USA |
| Ratte anti-hu IL-6 mAk (IgG1) | PharMingen, San Diego, USA |
| Biotinylierter Ratte anti-hu IL-6 mAk (IgG2a) | “ |
| Maus Kontrollantikörper (IgG1) | Sigma, Deisenhofen |
| Kaninchen anti-Maus IgG-AP | “ |

2.1.4 Expressionsvektoren und Vektorkonstrukte

Das Konstrukt kodierend für eine enzymatisch nicht spaltbare Form von humanem TNF wurde durch eine Deletion von 12 Aminosäuren C-terminal der Prozessierungsstelle von membranständigen zu löslichem TNF (Ala 76/ Val 77) erhalten (TNF_{Δ1-12}). Diese Deletionsmutante von TNF wurde in den Expressionsvektor pZeo^{SV} (Invitrogen, San Diego, Ca, USA) kloniert und freundlicherweise von Oxana Weiler (Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt.

Der Expressionsvektor für die *Firefly* Luciferase unter der Kontrolle eines aus drei NF-κB-Elementen bestehenden Minimalpromotors wurde freundlicherweise von Marius Üffing, Gesellschaft für Strahlenforschung in München, zur Verfügung gestellt.

Der Expressionsvektor pRL-TK (Promega) enthält das *Renilla* Luciferasegen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *herpes simplex thymidase kinase* Promotors. Die schwache, konstitutive *Renilla* Luciferase-Expression wurde als interner Standard verwendet und diente zur Überprüfung der Effizienz von Transfektionen.

2.1.5 Zell-Linien

HeLa-Zellen (humane Epithelzell-Linie), 293-Zellen (humane Nierenzell-Linie) und L929-Zellen (murine Fibroblastenzell-Linie) wurden von der “American Type Culture Collection“ (ATCC), Manassas, VA, USA, bezogen.

2.2 Experimentalmethoden

2.2.1 Kultivierung und Ernte eukaryontischer Zellen

HeLa-, L929- und 293-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 5% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (hi FCS) bei 37°C und 96 % Luftfeuchtigkeit unter 5% CO₂ Begasung kultiviert. Zum Ernten der adhären wachsenden HeLa- 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 mit Hilfe eines Ausschlußfarbstoffes (0,4% Eosin, 10% FCS, 0,9% NaCl, 0,05% NaN₃) in einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.2 Stabile Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur Transfektion wurde Superfect (Qiagen, Niederlande) verwendet. Superfect ist ein Polykation, das mit der DNA komplexiert. Die entstehenden positiv geladenen Komplexe können dann von den Zellen über negativ geladene Oberflächenrezeptoren internalisiert werden. 2x10⁶ 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 komplexiert. Die Zellen wurden unmittelbar vor Zugabe des Transfektionsmediums einmal mit PBS gewaschen; anschließend wurde die Komplexlösung mit 3 ml serumhaltiges RPMI gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach Inkubation für 3 h im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch serumhaltiges Zellkulturmedium ersetzt. 24h nach der Transfektion wurde das Antibiotikum Zeocin (400 µg/ml) zugegeben. Die folgenden Tage wurde das Medium regelmäßig gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Nach 14 Tagen wurden die herangewachsenen Einzelklone gezählt, vereinigt und die tmTNF-exprimierenden Zellen durch "fluorescence activated cell sorting" (FACS) angereichert.

2.2.3 Analyse und Anreicherung transfizierter Zellen mit Durchflußzytometrie

Zur Analyse von Zelloberflächen-exprimierten Molekülen wurden je 2x10⁵ Zellen nach dem Ernten mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,02% in PBS) in 100 µl PBA (0,025% BSA, 0,02% NaN₃ in PBS) resuspendiert. Bei einer pH 3 Behandlung, um potentielle Rezeptor-Ligand-Interaktionen aufzubrechen (Porteu and Hieblot 1994; Higuchi et al. 1994), wurden die Zellen pelletiert und in 100 µl Glycin-HCl-Puffer (50 mM Glycin, 125 mM NaCl, pH 3) für 1.5 min inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 433 g) wurden die pelletierten Zellen mit dem jeweiligen Antikörper (20 µg/ml in 100 µl 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.

Zur Anreicherung transfizierter Zellen wurden 5×10^6 Zellen in 500 µl Volumen unter sterilen Bedingungen wie oben beschrieben markiert. Abschließend 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% hiFCS aufgenommen und in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät.

2.2.4 Bindungsstudien mit ¹²⁵I-TNF

2.2.4.1 TNF-Jodierung (Fraker et al., 1978)

Zur Durchführung von Bindungsstudien war die radioaktive Markierung von TNF notwendig. Es wurde die Iodo-Bead-Markierungsmethode ausgewählt, da das Oxidationsmittel Iodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3α,6α-diphenylglycoluril) wasserunlöslich an Beads immobilisiert ist und dadurch einfach von jodiertem TNF zu trennen ist. Im wesentlichen wurde der Anleitung des Herstellers gefolgt (Pierce, USA). Für die Jodierung von je 5 µg TNF wurde 1 Iodobead verwendet. Die Beads wurden zweimal mit 500 µl Puffer A (100 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,5) gewaschen und auf Filterpapier vorsichtig getrocknet. Die Markierungsreaktion wurde in einem 2 ml Rundbodeneppendorf-Gefäß durchgeführt: ein Bead wurde in 88 µl Puffer A mit 5 µl Na¹²⁵I (0,5 mCi) für 5 min bei RT inkubiert, dann wurden 5 µg TNF (in 20 µl PBS) zugegeben und für weitere 5-10 min bei RT inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde in regelmäßigen Abständen leicht geschüttelt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem 100 µl des Reaktionsansatzes auf eine PD10 Sephadex G25 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) pipettiert wurden, die zuvor mit 15 ml sterilfiltriertem Puffer B (0,5 % BSA in PBS) äquilibriert wurde. Das Reaktionsgefäß wurde noch zweimal mit Puffer A gewaschen und der Waschpuffer wurde jeweils auch auf die Säule pipettiert. Die Trennung des ¹²⁵I-markierten TNF von freiem Jod erfolgte durch sequentielle Zugabe von je 500 µl Puffer B. Es wurden 10 Fraktionen von jeweils 500 µl aufgefangen. Von den Fraktionen wurden 10 µl in ein Zählröhrchen überführt und im γ-Counter (LB 2100, Berthold, Wildbad, Deutschland) gemessen. Die Fraktionen des ersten Peaks wurden vereinigt. Diese Fraktionen enthalten erfahrungsgemäß ca. 80 % der eingesetzten Gesamtmenge an Protein. Die spezifische Radioaktivität betrug 40-60 µCi/µg

Protein. Das ^{125}I -TNF wurde auf 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt und bei 4°C gelagert. Die biologische Aktivität von ^{125}I -TNF, die in einem Zytotoxizitätsassay (Kap. 2.2.14) im Vergleich mit unmarkiertem TNF bestimmt wurde, lag bei 40-60%.

2.2.4.2 Gleichgewichts-Bindungsstudien bei 4°C

Zur Bestimmung der Gesamtbindung von ^{125}I -TNF an $\text{Hela}_{\text{tmTNF}}$ - und HeLa-Zellen wurden jeweils 1×10^6 Zellen für 2 h bei 4°C in PFA (2% hiFCS, 0,02% NaN_3 in PBS) mit einer sättigenden Konzentration an ^{125}I -TNF (15 ng/ml) inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe eines 200-fachen Überschusses an nicht-markierten TNF bestimmt. Eine pH 3 Behandlung wurde wie in Kap. 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Das gebundene ^{125}I -TNF wurde nach Zentrifugation über eine Phthalatöl-Mischung (Dichte 1,014 g/cm^3) im Zellpellet mit einem γ -Counter bestimmt (Grell et al., 1995). Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung ermittelt.

2.2.4.3 Assoziationsstudien bei 37°C (Grell et. al, 1998)

Für Assoziationsstudien wurden 1×10^6 $\text{Hela}_{\text{tmTNF}}$ -Zellen bzw. HeLa-Zellen in HFA (2% hiFCS, 0.2% NaN_3 in HBSS) für 30 min auf 37°C erwärmt. Dann wurden die Zellen mit vorgewärmten ^{125}I -TNF (15 ng/ml) bei 37°C für verschiedene Zeitwerte inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe eines 200-fachen Überschusses an nicht-markierten TNF bestimmt. Die Inkubation wurde durch Zentrifugation über eine Phthalatöl-Mischung gestoppt und die spezifisch an die Zellen gebundene Radioaktivität wurde wie in Kap. 2.2.4.2 beschrieben ermittelt.

2.2.5 Interleukin-6-Assay

Jeweils 1.5×10^4 Zellen wurden in beschichteten 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vor Zugabe von TNF (10 ng/ml) bzw. des p38 MAP Kinase Inhibitors SB203580 (50 μM) wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen.

Für die TNF-Neutralisations-Experimente wurden 1×10^3 Zellen ausgesät und am nächsten Tag jeweils serielle Verdünnungen von TNF-spezifischen Antikörpern und Kontroll-Antikörpern zugegeben. Nach fünf Tagen Kultur wurden die Zellen einmal mit warmem Medium gewaschen und jeweils die entsprechenden Antikörper wieder in das Zellkulturmedium zugegeben.

Nach 6 h Inkubation mit den entsprechenden Agenzien bei 37°C wurden die Platten abzentrifugiert (433 g, 5 min, Raumtemperatur). Auf eine mit einem anti-IL-6 mAk (100 ng/Well) beschichtete und anschließend mit PBS + 10% hiFCS geblockte ELISA-Platte wurden 100 µl der Überstände überführt. 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% hiFCS 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 ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 10,4). Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte im ELISA-Reader (R5000, Dynatech, Guernsey, GB) bei 405 nm.

2.2.6 TNF-Assay

Jeweils 1.5×10^4 Zellen wurden in beschichteten 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Platten wurden einmal mit PBS gewaschen und die Zellen in 100 µl Zellkulturmedium für weitere 18 h inkubiert. Dann wurden die Platten abzentrifugiert (433 g, 5 min, Raumtemperatur) und 100 µl der Überstände wurden auf eine anti-TNF mAk (mAk MAB610, 400 ng/Well) beschichtete und anschließend mit PBS + 10% hiFCS geblockte ELISA-Platte überführt. Als Nullwert wurde Medium in ein beschichtetes Well gegeben. Für den TNF-ELISA wurde eine Eichreihe aus rekombinantem hu-TNF in beschichteten Wells pipettiert. 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-TNF mAk (mAk BAF210, 20 ng/Well) jeweils in PBS + 10% hiFCS zugegeben. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden wie in Kap. 2.2.5 beschrieben durchgeführt.

2.2.7 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad, München) bestimmt. Dazu wurden 2 µl der Proteinlösung mit 1 ml des 1:5 in H₂O verdünnten Protein-Assay-Reagenz gemischt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die OD bei 595 nm gemessen. Über eine Eichreihe mit BSA wurde die Proteinkonzentration der Lösung berechnet.

2.2.8 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zum Nachweis der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden in beschichteten 10 cm Petrischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Stimulation wurden die Zellen mit TNF (20 ng/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Petrischalen wurden dann auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Mit einem Gummischaber wurden die Zellen in kaltem PBS geerntet, in Röhrchen überführt und pelletiert (5 min, 433 g, 4°C). Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS wurde das Pellet in 100 μ l kaltem Puffer A (Lysispuffer für zytoplasmatische Extrakte) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 6 μ l 10% Nonidet P-40-Lösung zugegeben und 2 min bei 4°C geschüttelt. Die freigesetzten Zellkerne wurden durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4°C) pelletiert. Im Überstand befanden sich die zytoplasmatischen Proteine, die teilweise für SDS-PAGE und Western-Blot verwendet wurden. Das Pellet wurde in 50 μ l Puffer C (20 mM HEPES, pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) resuspendiert. Nach 20 min Schütteln bei 4°C und Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand, der die nukleären Proteine enthielt, abgenommen. Der Proteingehalt der Kernextrakte wurde, wie in Kap. 2.2.7 beschrieben, bestimmt.

Das im EMSA eingesetzte, HPLC-gereinigte NF κ B-spezifische Oligonukleotid (5'-ATC AGG GAC TTT CCG CTG GGG ACT TTC CG-3') (MWG-Biotech, Ebersberg) wurde mit (γ - 33 P) ATP in einer T4 Polynukleotidkinase-Reaktion am 5' Ende radioaktiv markiert. 500 pg Oligonukleotid, 10 pmol bzw. 50 μ Ci (γ - 33 P) ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase wurden dazu in 1x T4-Polynukleotidkinase-Puffer gemischt und 1h bei 37°C inkubiert. Nach Abtrennung der freien Nukleotide über eine Säule (Nuc Trap® Probe Purification Columns, Stratagene, Heidelberg; nach Anleitung des Herstellers) wurde das markierte einzelsträngige Oligonukleotid mit nicht-markiertem anti-sense-Oligonukleotid hybridisiert. Sense- und anti-sense-Oligonukleotid wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 min bei 100°C inkubiert und bei Raumtemperatur über 1-2 h langsam abgekühlt. Zur Bestimmung der radioaktiven Markierung wurde 1 μ l der Probe in 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Roti-szint eco plus, Roth, Karlsruhe) im Szintillations-Meßgerät (Canberra-Packard, Dreieich) gemessen.

Für den EMSA wurden die Kernextrakte zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einer unspezifischen Kompetitor-DNA inkubiert. Dazu wurden jeweils 5 μ g der Kernextrakte mit 5 μ g poly (dl:dC) in Bindungspuffer (5 mM HEPES, pH 7,8, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 5 mM DTT, 10% Glycerol) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 2 μ l (ca. 500000 cpm) doppelsträngige, radioaktiv markierte Oligonukleotid-Probe zugegeben und wieder für 15 min

bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurde ein Kontrollansatz mit 100-fachem Überschuß an unmarkiertem Oligonukleotid mitgeführt. Die Proben wurden mit 4 µl 6x DNA-Probenpuffer (1 mM EDTA, 50% Glycerin, 0,025% Bromphenolblau, 0,015% Xylencyanolblau) versetzt und in einem 1 mm dicken, nativen Polyacrylamidgel (6% Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) in 0,25x TBE, Laufpuffer 0,25x TBE) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte nach dem Trocknen des Gels auf Blotting-Papier (1 h bei 70°C und Vakuum im Geltrockner) am Phosphorimager (STORM, Molecular Dynamics, Kiefeld).

2.2.9 Supershift Assay

Es wurden EMSA, wie in Kap. 2.2.8 beschrieben, mit folgender Abwandlung durchgeführt. Die Kernextrakte aus TNF-behandelten (30 min, 20 ng/ml) HeLa-Zellen und unbehandelten HeLa_{tmTNF-1}-Zellen wurden nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Probe zusätzlich mit p65-, p50- und c-rel-spezifischen Antikörpern (3 µg/Ansatz) für 20 min bei RT inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung und Analyse der Komplexe aus Oligonukleotid-Transkriptionsfaktor-Antikörper erfolgte wie in Kap. 2.2.8 beschrieben. Die Zusammensetzung der Komplexe war anhand der Laufstrecke zu erkennen.

2.2.10 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte im diskontinuierlichen System in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Phase, Lübeck). Zur Herstellung des Trenngels (Dicke: 1 mm) wurde eine 12%-ige Trenngellösung mit APS in einer finalen Konzentration von 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. Zuvor wurde die Polymerisierungsreaktion der Sammelgellösung mit APS (1% Endkonz.) und TEMED (0,1 % Endkonz.) gestartet.

Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, kurz zentrifugiert und dann auf Eis abgekühlt. Es wurden ca. 100 µg Protein/Tasche aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte 1,5 h bei 40 mA. Als Molekulargewichtsstandard wurde eine Mischung von vorgefärbten Referenzproteinen (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

| <u>Komponenten des Standards</u> | <u>(kDa)</u> |
|---|---------------------|
| α_2 -Makroglobulin | (196) |
| β -Galaktosidase | (118) |
| Fruktose-6-Phosphat Kinase | (90) |
| Pyruvat Kinase | (70) |
| Fumerase | (55) |
| Lactat Dehydrogenase | (38) |
| Triose-P-Isomerase | (33,5) |

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

2.2.11.1 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell, Dassel) erfolgte in einer horizontalen Blotkammer (Phase, Lübeck). Die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurde mit Blotpuffer getränkt und das folgende Sandwich aufgebaut: Kathode / 2 Lagen Filterpapier / Gel / Nitrozellulose / 2 Lagen Filterpapier / Anode. Geblottet wurde für 1,5 h bei einer mittleren Stromstärke von 1,5 mA/cm² und RT.

2.2.11.2 Immunofärbung von Proteinen

Nach dem Elektrotransfer wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Nitrozellulosemembran mit Blockpuffer abgesättigt (3% Milch in PBS-T, 1 h bei RT). Alle weiteren Schritte wurden bei RT und unter leichtem horizontalem Schwenken durchgeführt. Die Membran wurde mit PBS-T gewaschen (dreimal 5 min). Danach erfolgte die Inkubation mit der 1. Antikörperlösung (1:1000 anti-Caspase-3 mAk in 3% BSA/PBS-T) für 1-2 h. Um den nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen und anschließend mit einem AP-gekoppelten anti-Maus mAk (1:10.000 in PBS-T) für 1 h inkubiert. Die Entwicklung der mit Antikörper markierten Banden erfolgte mit der ECF (*enhanced chemifluorescence*) Methode nach den Angaben des Herstellers (Amersham, Braunschweig). Die Membran wurde dreimal mit PBS-T gewaschen, mit 24 μ l ECF-Substrat/cm² für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Banden mit einem STORM (Molecular Dynamics, Krefeld) visualisiert.

2.2.12 Analyse der p38 MAP Kinase Phosphorylierung

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in beschichteten 10 cm Petrischalen ausgesät und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Zur Stimulation wurden die Zellen mit TNF (20 ng/ml) für 15 min bei 37°C inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Petrischalen wurden dann auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Mit einem Gummischaber wurden die Zellen in kaltem PBS geerntet, in Röhrchen überführt und pelletiert (5 min, 433 g, 4°C). Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS, wurden die Zellen gezählt und in 150 µl 2-fach Probenpuffer für SDS-Gele lysiert. Die Lysate wurden mit Ultraschall behandelt (5 Pulse, Sonoplus HD200, Bandelin, Berlin), für 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Jeweils äquivalente Zellmengen (ca. 40 µl in 2-fach Probenpuffer) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Elektroblothing auf Nitrozellulose überführt (Kap.2.2.10 und 2.2.11.1).

Die Immunofärbung der p38 bzw. der phosphorylierten p38 MAP Kinase erfolgte im wesentlichen wie in Kap. 2.2.11.2 beschrieben unter Berücksichtigung folgender Änderungen. Als Waschpuffer wurde TBS-T verwendet. Nach dem Blocken (5% Trockenmilch in TBS-T) wurde mit dem anti-p38 bzw. dem anti-phospho p38 MAP Kinase Ak (1:1000 in 5% BSA/TBS-T) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein HRP-konjugierter Ak (1:2000 in Blockpuffer) als sekundär Ak verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem LumiGLO®-System (Biolabs). Dazu wurden die Substratlösung und die Peroxidlösung 1:20 mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt und im Dunkeln unter leichtem Schütteln mit der Membran inkubiert. Der Blot wurde von der überschüssigen Flüssigkeit befreit und auf einen Röntgenfilm (Pierce, Rockford, USA) gelegt. Die Belichtungszeit betrug je nach Signalstärke 30 s bis 5 min. Nach der Expositionszeit wurde der Film mit Entwickler (G150 für Röntgenfilme, AGFA) und Fixer (G350 für Röntgenfilme, AGFA) entwickelt.

2.2.13 Transiente Reporter-Gen Assays zur Bestimmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB

Jeweils 8×10^3 HeLa- bzw. $1,5 \times 10^4$ 293-Zellen wurden in beschichteten 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Komplexbildung zwischen der DNA und den Polykationen des Transfektionsreagenzes wurden für jedes zu transfizierende Well 0,25 µg Expressionsvektoren und 0.85 µl Superfect in 10 µl serumfreien RPMI für 10 min bei RT inkubiert. Zu dem Reaktionsansatz wurden jeweils 90 µl serumhaltigen RPMI pro Well pipettiert, gemischt und 100 µl Transfektionsmedium pro Well zugegeben. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen vorsichtig mit warmen PBS gewaschen.

Als Reportergenkonstrukt wurde ein Expressionsvektor, der für eine induzierbare *Renilla* Luciferase unter der Kontrolle eines NF- κ B Minimal-Promotors kodiert, verwendet. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und zur Standardisierung der *Renilla* Luciferase Meßwerte wurde ein weiterer Expressionsvektor, der für eine Firefly Luciferase unter einem konstitutiv aktiven Promotor (pRL-TK, Promega) kodiert, im Verhältnis 1:10 kotransfiziert. Nach 3 h Inkubation mit dem Transfektionsmedium wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 100 μ l serumhaltiges Zellkulturmedium ersetzt.

Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von jeweils 50 μ l Lysispuffer (Dual Light Kit, Promega) pro Well 24 h nach der Transfektion. In den letzten 6 h vor der Zell-Lyse wurden die Zellen mit TNF (20 ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. HeLa-Zellen wurden zusätzlich vor der Lyse einmal mit PBS gewaschen. Die Expression der NF- κ B-abhängigen *Firefly* Luciferase wurde in den Zell-Lysaten (45 μ l) von HeLa- und 293-Zellen nach Zugabe des Substrates für die *Firefly* Luciferase (Dual Light Kit, Promega) luminometrisch (Lumat LB9501, Berthold) ermittelt. Nach Zugabe eines "Stop and Glo"-Reagenz zu dem Reaktionsansatz (Zell-Lysat und 1. Luciferase-Reagenz) wurde die Expression der konstitutiv exprimierten *Renilla* Luciferase ebenfalls luminometrisch ermittelt. Das Prinzip des "Stop and Glo"-Reagenzes beruht darauf, daß die Lichtreaktion, die durch Zugabe des ersten Substrates entsteht, gestoppt wird und gleichzeitig die Lichtreaktion des zweiten Substrates in Gang gesetzt wird. Zur Standardisierung wurden die *Firefly* Luciferase Meßwerte durch die *Renilla* Luciferase Meßwerte geteilt.

2.2.14 Zytotoxizitäts-Assays

Jeweils $1,5 \times 10^4$ HeLa-Zellen bzw. 2×10^4 L929-Zellen wurden in beschichteten 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die zu testenden Substanzen wurden entweder in seriellen Verdünnungen oder in konstanten Konzentrationen zugegeben. In L929-Zellen erfolgte die Bestimmung des TNF-induzierten Zelltodes in Anwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Actinomycin D (1 μ g/ml). Die Quantifizierung der Anzahl der lebenden Zellen erfolgte nach 20 h Inkubation bei 37°C 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 μ l Kristallviolettlösung (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol) wurde die Färbelösung mit H₂O abgespült und die Platten an der Luft getrocknet. Zur Messung wurde das Kristallviolett mit 150 μ l Methanol bei Raumtemperatur gelöst und die Mikrotiterplatten im ELISA-Reader (R5000, Dynatech, Guernsey, GB) bei 550 nm analysiert.

2.2.15 RNase Protection Assay

2.2.15.1 Stimulation der Zellen und RNA-Isolierung

Jeweils 5×10^6 Zellen wurden in beschichteten 15 cm Petrischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen stimuliert (50 ng/ml TNF für 5 h bei 37°C), durch Abschaben geerntet und einmal mit kaltem PBS gewaschen.

Zur Isolierung der RNA wurden die Zellpellets in Insta-Pure-Lösung (Eurogentec s.a., Belgien) suspendiert (0,2 ml Insta-Pure-Lösung/ 10^6 Zellen). Nach Zugabe von Chloroform (0,2 ml/2 ml Homogenat) und 15 sec Schütteln wurde das Homogenat für 15 min auf Eis inkubiert und dann zur Phasentrennung zentrifugiert (5 min, 13000 rpm, RT). Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen, und die RNA mit Isopropanol präzipitiert (Zugabe von 1 Volumen Isopropanol, Inkubation für 15 min auf Eis). Nach Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde kurz (3-5 min) in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50-80 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat) -behandeltem Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der Qualität der RNA-Präparation wurden 3 µl gelöste RNA mit 1 µl 6x Probenpuffer (1 mM EDTA, 50% Glycerin, 0,025% Bromphenolblau, 0,015% Xylencyanolblau) versetzt und in einem 1%-igen Agarose-Gel (mit 0,001% Ethidiumbromid, in 1x TBE) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Konzentration der gelösten RNA erfolgte durch Messung der OD bei 260.

2.2.15.2 RNase Protection Assay

Der Assay wurde mit dem RiboQuant™ Multi-Probe RNase Protection Assay System (Pharmingen, San Diego, USA) im wesentlichen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Präparation radioaktiver RNAs als Sonden zur Detektion von mRNA verschiedener TRAF- und IAP-Gene wurden das Multi-Probe Template-Set hApo5 (xIAP, TRAF1, TRAF2, CART, NAIP, cIAP2, cIAP1, TRPM2, TRAF3) (PharMingen, San Diego, USA) in *in vitro*-Transkriptionsreaktionen eingesetzt:

5 µl (α - ^{33}P) UTP (20 mCi/ml), 5 µl H₂O, 1 µl GACU Nukleotid Pool, 2 µl DTT, 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 1 µl Template Set, 1 µl RNasin, 1 µl T7 Polymerase wurden gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach DNase-Verdau (+ 2 µl DNase, 30 min, 37°C) wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (26 µl EDTA, 25 µl Tris-gesättigtes Phenol, 25 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1), 2 µl Hefe-RNA) und eine Chloroform-Extraktion (50 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1)) durchgeführt, und die RNA aus der wäßrigen Phase gefällt (Zugabe von 50 µl 4 M Ammoniumacetat und 250 µl eiskaltem 100% Ethanol, Inkubation 30

min bei -70°C , Zentrifugation 15 min, 13000 rpm, 4°C). Das RNA-Pellet wurde einmal mit 90% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 μl Hybridisierungspuffer aufgenommen. Zur Bestimmung der radioaktiven Markierung wurde 1 μl der Probe in 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Roti-szint eco plus, Roth, Karlsruhe) im Szintillations-Meßgerät (Canberra-Packard, Dreieich) gemessen. Mit dem auf diese Weise erhaltenen Set radioaktiver RNA-Sonden wurden die RNAs aus den stimulierten Zellen untersucht. Dazu wurden je 10 μg der zellulären RNA 30 min bei -70°C gefroren, anschließend 1 h in der Vakuumzentrifuge getrocknet, und nach Aufnahme in 8 μl Hybridisierungspuffer mit 2 μl radioaktiver Sonde gemischt. Die Sonden wurden zuvor mit Hybridisierungspuffer auf 1×10^6 cpm/ μl eingestellt. Zur Hybridisierung wurden die Proben auf 90°C erhitzt und dann bei 56°C für 12-16 h inkubiert. Nach Abkühlen auf 37°C wurde 0,25 μl RNase A + T1-Mix in 100 μl RNase-Puffer zugegeben und 45 min bei 30°C inkubiert. Die RNase wurde dann durch Proteinase K-Verdau (Zugabe von 1,2 μl Proteinase K und 1,2 μl Hefe-RNA in 15 μl Proteinase K-Puffer, 15 min Inkubation bei 37°C) und Phenol-Chloroform-Extraktion (65 μl Tris-gesättigtes Phenol, 65 μl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1)) entfernt und die RNA aus der wäßrigen Phase gefällt (Zugabe von 120 μl 4 M Ammoniumacetat und 650 μl eiskaltem 100% Ethanol, Inkubation 30 min bei -70°C , Zentrifugation 15 min, 13000 rpm, 4°C). Das RNA-Pellet wurde einmal mit 90% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, und in 5 μl Probenpuffer aufgenommen. Nach 3 min Denaturieren bei 90°C wurden die Proben auf ein 30 x 40 cm großes, 0,5 mm dickes denaturierendes Polyacrylamidgel (4,8% Acrylamid:Bisacrylamid (19:1), 48% (w/v) Harnstoff in 1x TBE) aufgetragen und 75 min bei 50 W aufgetrennt (Laufpuffer 0,5x TBE). Die durch Hybridisierung mit den Sonden „geschützten“ mRNAs wurden nach dem Trocknen des Gels auf Blotting-Papier (1 h bei 70°C und Vakuum im Geltdrockner) am Phosphorimager (STORM, Molecular Dynamics, Krefeld) analysiert.

2.2.16 Assay zum Nachweis der Aktivierung der c-Jun N-terminal kinase (JNK)

Jeweils 2×10^6 Zellen wurden in beschichteten 10 cm Petrischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Stimulation der Zellen mit TNF (20 ng/ml) bzw. IL- 1β (5 ng/ml) für 15 min wurden die Petrischalen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 1 ml kaltem IP-Puffer (20 mM TRIS, pH 7,4, 5 mM MgCl_2 , 1% TritonX100, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 mM Na-orthovanadat, 1 mM NaF, 10 pg/ml Leupeptin) mit einem Gummischaber geerntet, in Röhrchen überführt, und mit Ultraschall aufgeschlossen (15 Pulse, Sonoplus HD200, Bandelin, Berlin). Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und zur Immunpräzipitation der JNK mit 0,6 μg polyklonalem Kaninchen anti-

JNK1 IgG versetzt und bei 4°C für 1 h gerollt. Anschließend wurden 25 µl Protein-G-Sepharose zugegeben und die Ansätze für weitere 30 min bei 4°C gerollt. Die an die Protein-G-Sepharose gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden dann zweimal mit IP-Puffer und einmal mit Puffer A (20 mM Mops, pH 7,2, 2 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1% TritonX100) gewaschen und in 70 µl Puffer A aufgenommen. Durch Zugabe von 6 µl GST-c-Jun (1-87)-Fusionsprotein (ca. 200-300 ng) und 0,15 µl (γ ³²P)-ATP (10 mCi/ml) wurde die Kinase-Reaktion gestartet. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 2x Probenpuffer gestoppt und die Proben nach 3 min Denaturieren bei 90°C auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (Kap. 2.2.10) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel auf Blotting-Papier getrocknet (1 h bei 70°C und Vakuum im Geltrockner) und dann am Phosphorimager (STORM, Molecular Dynamics, Krefeld) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Modellsystems zum Studium der autostimulatorischen Effekte von membranständigem TNF

3.1.1 Herstellung von Membran-TNF-exprimierenden HeLa-Zellen

Die Deletion von 12 Aminosäuren C-terminal der Prozessierungsstelle von membranständigem zu löslichem TNF (Ala 76/ Val 77) führt zu einem TNF-Molekül ($\text{TNF}_{\Delta(1-12)}$), das als bioaktives membranständiges TNF (tmTNF) ohne Abgabe von löslichem bioaktiven TNF in den Zellkulturüberstand exprimiert wird (Perez et al., 1990; Grell et al., 1995). Um mögliche autostimulatorische Effekte von membranständigem TNF charakterisieren zu können, wurden stabile tmTNF-exprimierende HeLa-Transfektanten etabliert. HeLa-Zellen wurden ausgewählt, da für diese Zell-Linie eine Reihe von TNF-induzierten zellulären Antworten beschrieben worden sind. Des weiteren exprimieren diese Zellen nahezu ausschließlich TNF-R1, so daß selektiv die Interaktion von tmTNF mit TNF-R1 untersucht werden kann.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit einem tmTNF-Expressionskonstrukt bzw. mit einem Kontroll-Vektor transfiziert (Kap. 2.2.2). Nach Antibiotika-Selektion (Zeocin im Kulturmedium) wurden mehr als 50 unabhängige Zellklone pro Transfektion ($n=3$) beobachtet. Die Transfektion mit tmTNF resultierte nicht in weniger Zellklonen als die Transfektion mit dem Kontroll-Vektor und vor der ersten Anreicherung waren bereits ca. 15 % tmTNF-exprimierende Zellen detektierbar. Dies zeigte, daß die Expression von tmTNF für HeLa-Zellen nicht toxisch ist. Mit Hilfe eines TNF-spezifischen mAk (T1) sowie eines *fluorescence activated cell sorters* (FACS) wurden tmTNF-exprimierende Zellen identifiziert und angereichert (Kap. 2.2.2). Nach je 3 Anreicherungs-schritten wurden aus 3 unabhängigen Transfektionen deutlich tmTNF-exprimierende Zellpopulationen erhalten: $\text{HeLa}_{\text{tmTNF-1}}$ (Abb. 4A), $\text{HeLa}_{\text{tmTNF-2}}$, und $\text{HeLa}_{\text{tmTNF-3}}$. Die $\text{HeLa}_{\text{tmTNF-2}}$ und $\text{HeLa}_{\text{tmTNF-3}}$ -Zellpopulationen exprimierten tmTNF in vergleichbarer Menge (Daten nicht gezeigt). In HeLa-Zellen bzw. in Kontroll-Vektor-transfizierten HeLa-Zellen war TNF nicht an der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 4C, Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Koexpression von TNF-R1 und TNF $_{\Delta(1-12)}$ in tmTNF-transfizierten HeLa-Zellen

TNF-R1 war mit einem TNF-R1-spezifischen mAk (H398) auf HeLa_{tmTNF-1}-Zellen im Gegensatz zu untransfizierten HeLa-Zellen nicht detektierbar (Abb. 4A). Das Fehlen von nachweisbaren Mengen an TNF-R1 auf HeLa_{tmTNF-1}-Zellen könnte auf die Herunterregulation der Rezeptoren von der Zelloberfläche hindeuten. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, daß zwischen TNF-R1 und tmTNF an der Zelloberfläche Komplexe gebildet werden, da der verwendete mAk H398 nicht an TNF-R1 binden kann, wenn gleichzeitig TNF gebunden ist (Thoma et al., 1990). Um potentielle Ligand-Rezeptor-Komplexe aufzubrechen, wurden die Zellen vor der durchflußzytometrischen Analyse einer pH 3 Behandlung unterzogen. In HeLa_{tmTNF-1}-Zellen war nach dieser Behandlung TNF-R1 spezifisch mit mAk H398 nachweisbar (Abb. 4B). TNF-R1 wurde auf HeLa_{tmTNF-1}-Zellen in vergleichbaren Mengen wie in unbehandelten (Abb. 4C) und pH 3 behandelten (Abb. 4D) HeLa-Zellen nachgewiesen.

Durch Gleichgewichts-Bindungsstudien (Kap. 2.2.4.2) mit radioaktiv markiertem TNF (^{125}I -TNF) konnte die Existenz von tmTNF/TNF-R1-Komplexen an der Zelloberfläche von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen bestätigt werden (Abb. 4E). Dazu wurden HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen jeweils nach einer bzw. ohne pH 3 Behandlung mit ^{125}I -TNF bei 4°C inkubiert und von nicht gebundener Radioaktivität durch Zentrifugation getrennt. Die spezifische ^{125}I -TNF Bindung nach pH 3 Waschschrift betrug ungefähr 50% des Wertes, der bei untransfizierten HeLa-Zellen mit ^{125}I -TNF gemessen wurde. Auch hier war ohne pH 3 Behandlung, im Gegensatz zu untransfizierten HeLa-Zellen, keine spezifische Bindung an HeLa_{tmTNF-1}-Zellen nachweisbar.

Die Assoziationsstudien mit ^{125}I -TNF (Kap. 2.2.4.3) bei der physiologisch relevanten Temperatur von 37°C zeigten, daß unter diesen Bedingungen eine spezifische schnelle Assoziation des radioaktiven Liganden an HeLa_{tmTNF-1}-Zellen erfolgte. Lösliches TNF konnte also gegen mTNF bei 37°C ausgetauscht werden. Die gemessene Assoziationsrate von ^{125}I -TNF an HeLa_{tmTNF-1}-Zellen war der an HeLa-Zellen ähnlich. Allerdings war die Bindung von ^{125}I -TNF an HeLa_{tmTNF-1}-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen unter diesen Bedingungen um ca. 70 % reduziert (Abb. 4F).

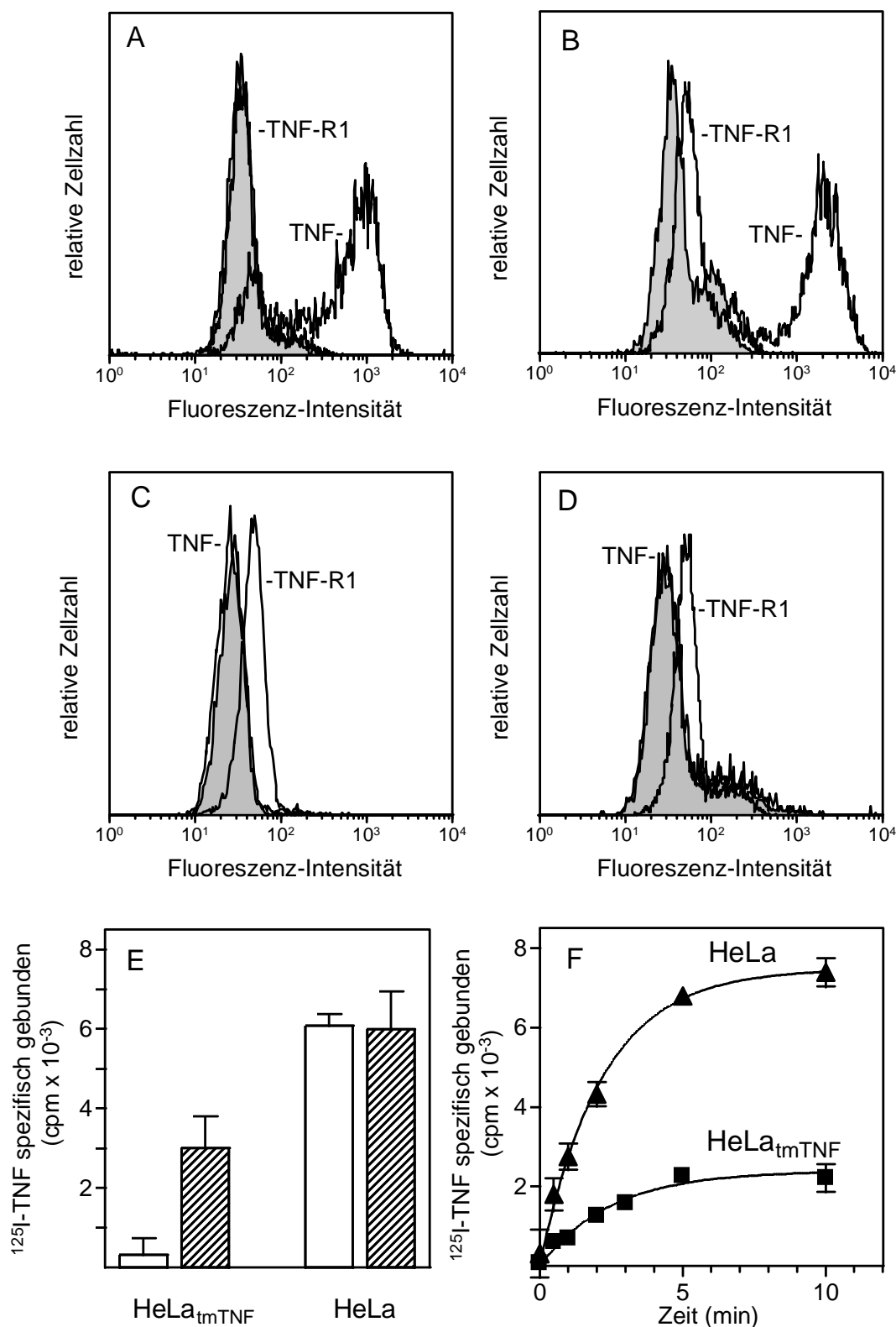


Abb. 4: Koexpression von TNF-R1 und membranständigem TNF auf HeLa_{tmTNF-1}-Zellen. Die Bestimmung der Zelloberflächen-Expression von TNF-R1 und membranständigem TNF in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen (A und B) und HeLa-Zellen (C und D) wurde durch Immunfluoreszenz-Markierung und durchflußzytometrische Analyse mit dem TNF-R1-spezifischen mAk H398 und dem TNF-spezifischen mAk T1 (jeweils 20 µg/ml), wie angezeigt, durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Kontroll-mAk (20 µg/ml Maus IgG; graues Histogramm) inkubiert. Die in (B) und (D) analysierten Zellen wurden vor der Immunfluoreszenz-Markierung einer pH 3 Behandlung unterworfen (Kap. 2.2.3). (E) Die Bindung von ¹²⁵I-TNF (15 ng/ml) an HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und an HeLa-Zellen wurde in

Gleichgewichtsbindungs-Studien (Kap. 2.2.4.2) bei 4°C ermittelt, nachdem die Zellen mit einem pH 3 Puffer (schraffierte Balken) oder einem neutralen Puffer (pH 7,3, leere Balken) behandelt wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachwerten von spezifischer ^{125}I -TNF-Bindung, d.h. nach Subtraktion der unspezifischen Bindung, die in Anwesenheit eines 200-fachen Überschusses von unmarkiertem TNF bestimmt wurde. (F) In Assoziations-Studien (Kap. 2.2.4.3) wurden HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen mit ^{125}I -TNF (15 ng/ml) bei 37°C inkubiert. Zell-gebundene Radioaktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Entfernung des freien Liganden durch Zentrifugation bestimmt. Die unspezifische Bindung wurde in der Anwesenheit eines 200-fachen Überschusses des unmarkierten Liganden bestimmt und ist in der Abbildung subtrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachwerten eines repräsentativen Experiment.

3.1.3 HeLa_{tmTNF-1}-Zellen produzieren kein bioaktives lösliches TNF

Die Zellkultur-Überstände von HeLa_{tmTNF-1}- und HeLa-Zellen wurden auf das Vorhandensein von löslichem bioaktivem TNF getestet. Dazu wurde in einem TNF-ELISA die Menge an löslichem TNF und in einem Bioassay die Menge an löslichem bioaktivem TNF bestimmt. Wie in Abb. 5A gezeigt, produzierten HeLa_{tmTNF-1}-Zellen unter den gewählten Experimentalbedingungen (15×10^4 Zellen in 100 μl für 18 h bei 37°C) ca. 100 pg/ml sTNF. Eine sTNF-Produktion von untransfizierten HeLa-Zellen war im Rahmen der Nachweisgrenze des Assaysystems (ca. 10 pg/ml sTNF) nicht nachweisbar. Das von den HeLa_{tmTNF-1}-Zellen produzierte TNF zeigte keine biologische Aktivität im Zytotoxizitäts-Assay (Meager et al., 1989). Die Nachweisgrenze des Assaysystems lag ebenfalls bei ca. 10 pg/ml (Abb. 5B).

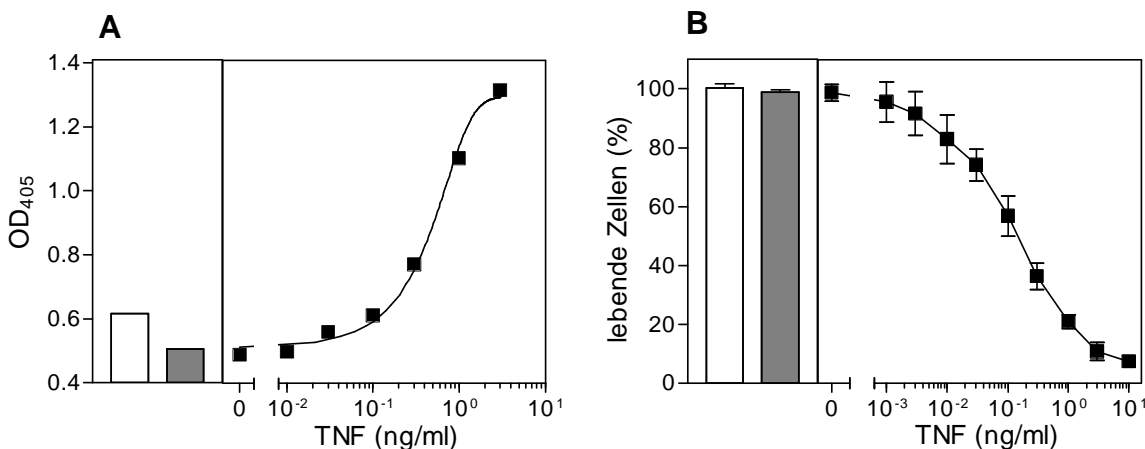


Abb. 5: HeLa_{tmTNF-1}-Zellen sezernieren geringe Mengen lösliches, nicht bioaktives TNF. HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen ($1,5 \times 10^4$ Zellen in 100 μl Zellkulturmedium) wurden für 18 h bei 37°C inkubiert. (A) In den Überständen von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen (leere Balken) und HeLa-Zellen (karierte Balken) wurde die Konzentration an sTNF mit einem TNF-spezifischen ELISA bestimmt (Kap. 2.2.6). Für die Eichreihe wurde rekombinantes humanes TNF titriert. (B) Die Zellkulturüberstände (100 μl) von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen (leere Balken) und HeLa-Zellen (karierte Balken) wurden in Anwesenheit von Actinomycin D (1 $\mu\text{g/ml}$) mit L929-Zellen inkubiert. In der Eichreihe wurde rekombinantes TNF titriert. Die Bioaktivität des sTNF in den Zellkulturüberständen wurde nach 24 h Inkubation bestimmt, indem die zytotoxischen Effekte durch Anfärben mit Kristallviolett quantifiziert und mit den zytotoxischen Effekten von sTNF in der Eichreihe verglichen wurden (Kap. 2.2.14).

3.2 Molekulare Mechanismen der konstitutiven IL-6 Produktion in HeLa_{tmTNF}-Zellen

3.2.1 HeLa_{tmTNF}-Zellen produzieren konstitutiv IL-6

Die Anwesenheit von tmTNF/TNF Komplexen an der Zelloberfläche eröffnet die Möglichkeit, daß HeLa_{tmTNF}-Zellen ein konstitutives TNF-induziertes Signal zeigen könnten. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde in HeLa_{tmTNF}-Zellen die Stimulation der IL-6 Gen-Expression als eine typische TNF-Antwort bestimmt. Tatsächlich produzierten HeLa_{tmTNF}-Zellen kontinuierlich große Mengen an IL-6, die vergleichbar zu der sTNF-induzierten IL-6 Produktion in HeLa Zellen war (Abb. 6A). Die Zugabe von exogenem löslichen TNF konnte in HeLa_{tmTNF}-Zellen die IL-6 Produktion nicht weiter verstärken. Um die Spezifität dieses Effekts zu bestimmen, wurden HeLa_{tmTNF}-Zellen mit TNF-spezifischen neutralisierenden Antikörpern inkubiert. Diese Behandlung zeigte eine teilweise, von der Antikörperkonzentration abhängige Inhibition der IL-6 Produktion (Abb. 6B).

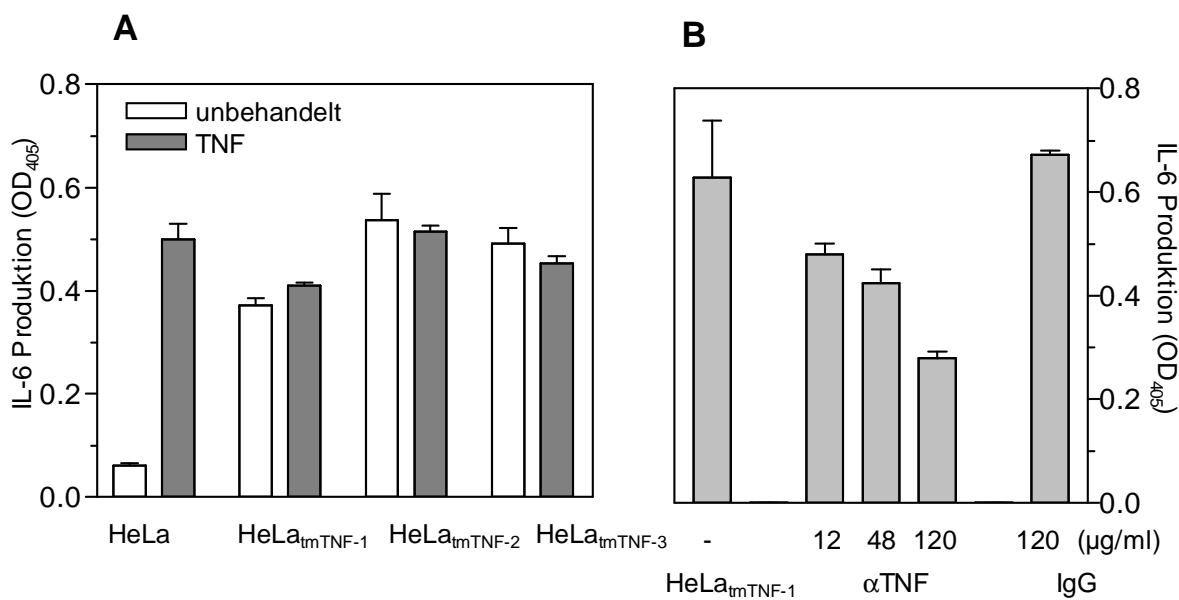


Abb. 6: Konstitutive IL-6 Produktion von HeLa_{tmTNF}-Zellen. (A) HeLa_{tmTNF}-Zellpopulationen und HeLa-Zellen wurden mit TNF (10 ng/ml) für 6 h stimuliert oder blieben unbehandelt. Die IL-6-Konzentration im Zellkulturmedium wurde mit einem IL-6-spezifischen ELISA bestimmt (Kap. 2.2.5). (B) HeLa_{tmTNF-1}-Zellen wurden 5 Tage mit den gezeigten Konzentrationen eines TNF-neutralisierenden Antikörper (mAk 357-101-4), eines Kontroll-Antikörpers oder Zellkulturmedium inkubiert, gewaschen und dann für weitere 6 h in Anwesenheit des jeweiligen Reagenz kultiviert. Die IL-6-Konzentration im Zellkulturmedium wurde wie oben bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachwerten eines repräsentativen Experimentes.

3.2.2 Konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in tmTNF-exprimierenden-Zellen

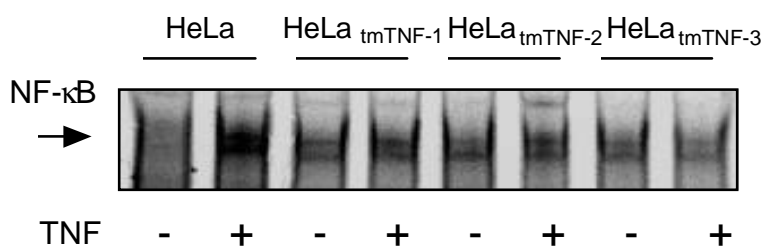
Für die IL-6 Produktion ist gezeigt worden, daß sie essentiell von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B abhängt (Libermann and Baltimore, 1990). Um zu prüfen, ob in den HeLa_{tmTNF}-Zell-Transfektanten eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung vorliegt, wurde zunächst mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA, Kap. 2.2.8) in HeLa_{tmTNF}-Zellen getestet, ob NF- κ B konstitutiv in den Zellkern transloziert wird. Dazu wurden Kernextrakte von HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen mit einem endständig markierten Oligonukleotid inkubiert, das die NF- κ B-Bindungssequenz enthält. Oligonukleotid-gebundenes NF- κ B wurde durch die veränderte Beweglichkeit des markierten Oligonukleotids in der anschließenden Gelelektrophorese erkenntlich. In allen HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen konnte eine konstitutive nukleäre Translokation von bindungsaktivem NF- κ B gezeigt werden (Abb. 7A). Die NF- κ B-Translokation in den Zellkern war in allen HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen im Vergleich zu sTNF-stimulierten, untransfizierten HeLa-Zellen niedriger und Zugabe von sTNF konnte die NF- κ B-Aktivierung in den HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen nicht weiter verstärken.

Funktionelles NF- κ B ist in der Regel aus 2 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Für die sTNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung ist gezeigt worden, daß vorwiegend die Translokation von einem p50/p65 Hetero-Dimer in den Zellkern stattfindet (Beg and Baldwin, 1994; Beg et al., 1993). Um die Zusammensetzung des in HeLa_{tmTNF}-Zellen translozierten NF- κ B zu bestimmen, wurden EMSA, wie oben beschrieben, mit folgender Abwandlung durchgeführt: Nach Zugabe des radioaktiven Oligonukleotids wurde mit Antikörpern, die spezifisch an die p50-, p65- bzw. an c-rel-Untereinheit des NF- κ B Heterodimers binden, vor der Gelelektrophorese inkubiert (*Supershift*, Kap. 2.2.9). Durch die Antikörperbindung verändert sich die Beweglichkeit des Oligonukleotid-NF- κ B-Komplexes und die NF- κ B-Bande verschiebt sich im Elektrophorese-Gel nach oben wodurch sich die ursprüngliche NF- κ B-Bande reduziert. In HeLa_{tmTNF}-Zellen wie auch in HeLa Zellen war das nukleär lokalisierte NF- κ B-Molekül aus p50/p65 Hetero-Dimeren aufgebaut (Abb. 7B).

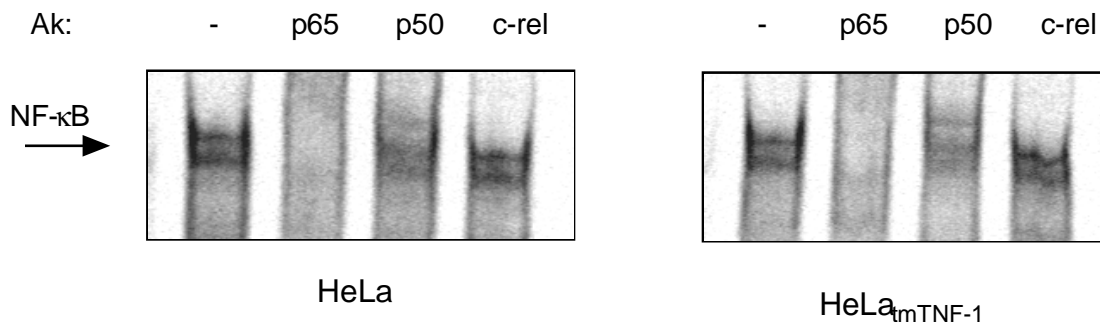
Kürzlich wurde gezeigt, daß nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B nicht ausreichend ist, um effiziente Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen zu initiieren (Beyaert et al., 1996). Deshalb wurde in transienten Transfektionsassays die Aktivierung eines NF- κ B-abhängigen Reportergens untersucht (Kap. 2.2.13). Dazu wurde ein Expressionsplasmid, das für eine induzierbare Luciferase unter der Kontrolle eines NF- κ B Minimal-Promotors kodiert, in HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen transfiziert. Die Expression

der NF- κ B-abhängigen Luciferase wurde in Zell-Lysaten von HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen 24 h nach Transfektion luminometrisch quantifiziert. Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wurde ein weiteres Expressionskonstrukt unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors kotransfiziert. In diesen Experimenten konnten die Ergebnisse der EMSA-Studien bestätigt werden, in denen in allen HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen eine konstitutive, aber im Vergleich zu sTNF-behandelten HeLa-Zellen, niedrigere NF- κ B-Aktivierung gezeigt wurde (Abb 7C). Die Zugabe von sTNF konnte die NF- κ B-Aktivierung in den HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen nicht verstärken.

A



B



C

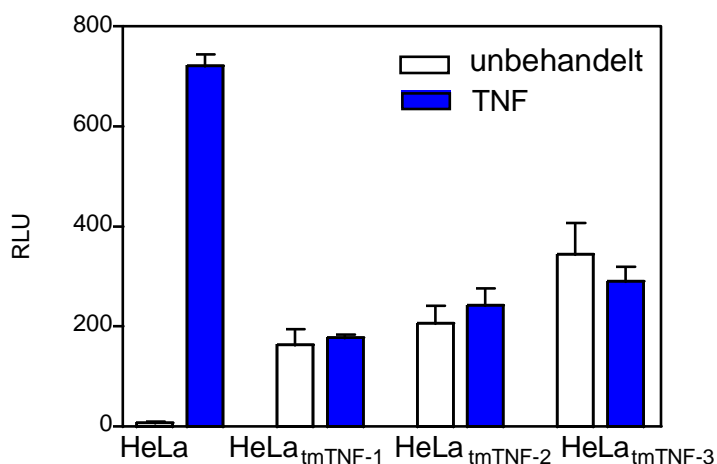


Abb. 7: Konstitutive NF- κ B-Aktivierung in HeLa_{tmTNF}-Zellen. (A) Die Kernextrakte von unbehandelten bzw. TNF-behandelten (30 min, 20 ng/ml) HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit einem radioaktiv markierten NF- κ B-spezifischen Oligonukleotid inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Phosphorimaging analysiert (Kap. 2.2.8). (B) Die Kernextrakte von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen (unbehandelt) und HeLa-Zellen (20 ng/ml TNF, 30 min) wurden zusätzlich zu dem radioaktiv markierten

Oligonukleotid mit p50-, p65- und c-rel-spezifischen Antikörpern (jeweils 3 $\mu\text{g}/\text{Ansatz}$) inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Phosphorimaging analysiert (Kap. 2.2.9). (C) HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit einem Luciferase Reporter Plasmid transient transfiziert (Kap. 2.2.13). Nach 24 h wurde in Zell-Lysaten aus unbehandelten oder TNF-behandelten (6 h, 20 ng/ml) Zellen die Luciferase-Expression luminometrisch bestimmt. Die Standardisierung der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe eines kotransfizierten Kontroll-Luciferase Reporter-Plasmids. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachwerten eines repräsentativen Experimentes.

Um Zelltyp-spezifische Artefakte auszuschließen, die in einer konstitutiven NF- κ B-Aktivierung resultieren könnten, wurden 293-Zellen mit tmTNF-Expressionskonstrukt bzw. einem Kontroll-Vektor transfiziert und 2 stabile tmTNF-exprimierende Zell-Populationen etabliert (Kap. 2.2.2 und 2.2.3). Aus je 4 Anreicherungsschritten wurden aus 2 unabhängigen Transfektionen tmTNF-exprimierende Zellpopulationen erhalten: 293_{tmTNF-1} und 293_{tmTNF-2}. (Abb. 8A). In 293 bzw. Kontroll-Vektor-transfizierten Zellen war TNF an der Zelloberfläche nicht nachweisbar (Abb. 8A, Daten nicht gezeigt). Um in 293_{tmTNF}-Zellen die NF- κ B-Aktivierung zu untersuchen, wurden transiente Reporter-Gen Assays, wie oben beschrieben, durchgeführt. In den beiden 293_{tmTNF}-Zell-Populationen konnte eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden (Abb. 8B). Die Stärke des Signals war vergleichbar mit dem Signal, das nach Stimulation mit sTNF in untransfizierten 293-Zellen erhalten wurde. Die Zugabe von sTNF zu den 293_{tmTNF}-Zell-Populationen führte zu keiner Verstärkung des konstitutiven Signals (Abb. 8B).

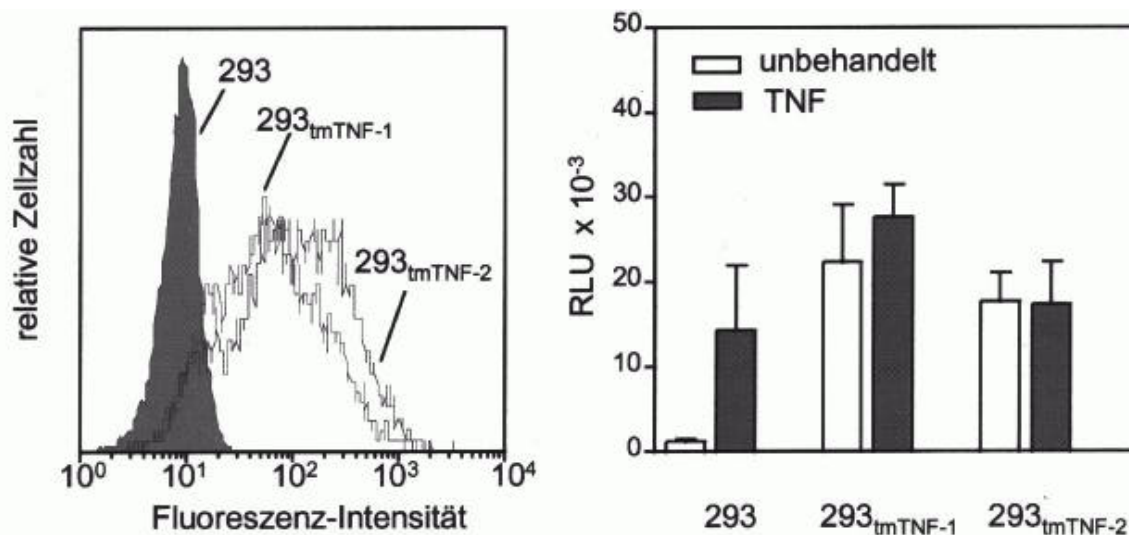


Abb. 8: Expression von tmTNF in 293-Zellen resultiert in konstitutiver NF- κ B-Aktivierung. (A) Die Zelloberflächen-Expression von membranständigen TNF in 293_{tmTNF-1}-Zellen, 293_{tmTNF-2}-Zellen und 293-Zellen wurde durch Immunofluoreszenz-Markierung und durchflußzytometrische Analyse mit dem TNF-spezifischen mAk T1 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bestimmt. (B) 293_{tmTNF}-Zellen und 293-Zellen wurden mit einem Luciferase Reporter Plasmid transient transfiziert (Kap. 2.2.13). Nach 24 h wurde in Zell-Lysaten aus unbehandelten oder TNF-behandelten (6 h, 20 ng/ml) Zellen die Luciferase-Expression luminometrisch bestimmt. Die Standardisierung der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe eines kotransfizierten Kontroll-Luciferase Reporter-Plasmids. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachwerten eines repräsentativen Experimentes.

3.2.3 Konstitutive p38 MAP Kinase Aktivierung in HeLa_{tmTNF}-Zellen

Kürzlich ist gezeigt worden, daß die NF- κ B-abhängige Genexpression und somit auch die IL-6 Geninduktion kritisch von der p38 MAP Kinase Signalkaskade abhängt (Beyaert et al., 1996). Um die Beteiligung der p38 MAP Kinase an der konstitutiven IL-6 Produktion in HeLa_{tmTNF}-Zellen zu bestimmen, wurden HeLa_{tmTNF}-Zellen mit dem p38 MAP Kinase-spezifischen Inhibitor SB203580 (Cuenda et al., 1995) inkubiert und die Konzentration an IL-6 im Zellkulturüberstand bestimmt. SB203580 bewirkte eine Hemmung von ca. 50% der kontinuierlichen IL-6 Produktion in HeLa_{tmTNF}-Zellen (Abb 9). Dies deutet darauf hin, daß in tmTNF-Transfektanten die p38 MAP Kinase konstitutiv sein könnte. Um auf molekularer Ebene die Aktivierung der p38 MAP Kinase zu untersuchen, wurden mit einem für aktivierte p38 MAP Kinase spezifischen Antikörper Westernblots durchgeführt. Wie Abb. 10 zeigt, ist in allen HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen eine konstitutiv phosphorylierte und damit aktivierte p38 MAP Kinase nachweisbar. Die sTNF-stimulierten HeLa-Zellen zeigten eine vergleichbare p38 MAP Kinase Aktivierung wie die unstimulierten HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen. Die Zugabe von sTNF konnte die Aktivierung der p38 MAP Kinase in den HeLa_{tmTNF}-Zell-Populationen nicht weiter verstärken.

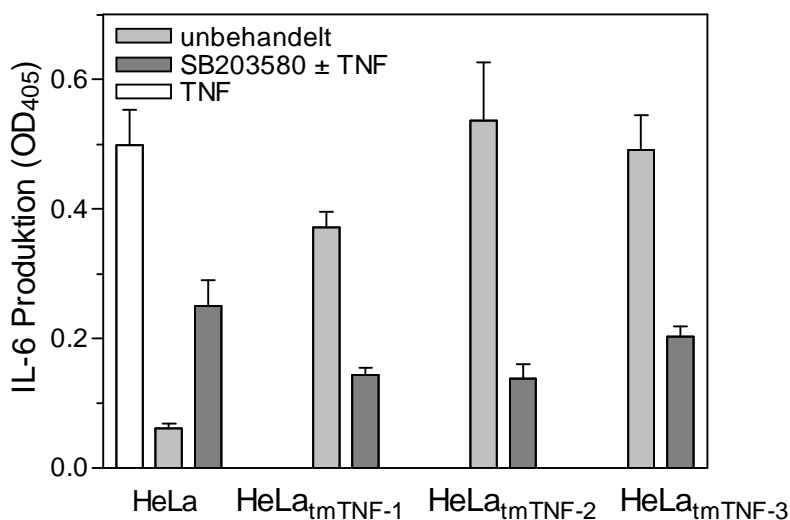


Abb. 9: Inhibition der IL-6 Produktion durch p38 MAP Kinase Inhibitor SB203580. HeLa_{tmTNF}-Zellen wurden mit SB203580 (50 μ M) für 6 h inkubiert oder blieben unbehandelt. HeLa-Zellen wurden jeweils zusätzlich mit TNF (20 ng/ml) in Abwesenheit oder in Anwesenheit von SB203580 (50 μ M) für 6 h inkubiert. Die IL-6-Konzentration im Zellkulturmedium wurde mit einem IL-6-spezifischen ELISA bestimmt (Kap. 2.2.5). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachwerten eines repräsentativen Experimentes.

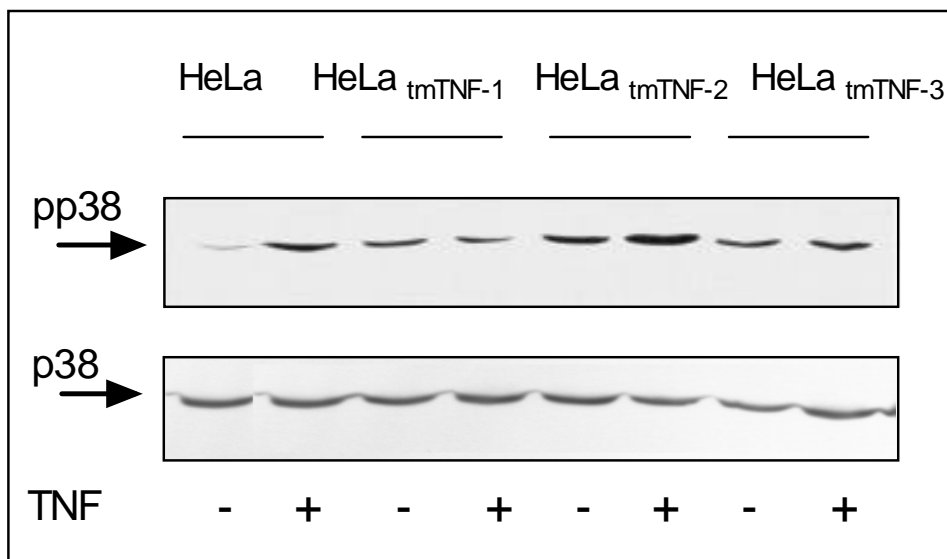


Abb. 10: Konstitutive Aktivierung der p38 MAP Kinase in HeLa_{tmTNF}-Zellen. HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit TNF (20 ng/ml, 15 min) stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Aktivierung der p38 MAP Kinase wurde in diesen Zellen mit einem anti-phospho-p38 MAP Kinase Antikörper (pp38, obere Bildhälfte) und einem anti p38 MAP Kinase Antikörper (p38, untere Bildhälfte) mittels "Western-Blot" (Kap. 2.2.12) analysiert.

3.3 mRNA-Expression NF- κ B-abhängiger antiapoptotischer Moleküle in HeLa_{tmTNF}-Zellen

Die TNF-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B spielt nicht nur bei der Induktion proinflammatorischer Moleküle wie z.B. IL-6 (Kap. 3.2) sondern auch bei der Inhibition der Apoptose eine wichtige Rolle (Wang et al., 1996). Als protektiver Mechanismus ist die Induktion von NF- κ B-abhängigen anti-apoptotischen Molekülen, die die Aktivierung der Caspase 8 inhibieren, beschrieben worden (Wang et al., 1998a). Diese anti-apoptotischen Moleküle sind Mitglieder des TNF-R1-Signalweges: TRAF1, TRAF2, c-IAP1 und cIAP-2.

Es stellte sich nun die Frage, ob die konstitutive NF- κ B-Aktivierung in HeLa_{tmTNF}-Zellen ebenfalls in einer konstitutiven Induktion dieser Moleküle resultieren könnte. Dazu wurde die Induktion dieser Moleküle in "RNase protection assays" (RPA) untersucht. Aus TNF-stimulierten bzw. unstimulierten HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit folgendem Set an radioaktiven Sonden hybridisiert: NAIP, cIAP1, cIAP2, TRPM, TRAF1, TRAF3 und TRAF4. Nach Hybridisierung der radioaktiven Sonden mit den Gesamt-RNAs wurde die nicht-hybridisierte, einzelsträngige RNA mit RNase verdaut, und die durch Hybridisierung mit den Sonden-Molekülen "geschützten" mRNAs gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, daß in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen kein Unterschied im Expressionsmuster der analysierten RNAs im Vergleich mit untransfizierten

HeLa-Zellen zeigten (Abb. 11). Auch die Zugabe von sTNF resultierte nicht in einer Veränderung des mRNA-Expressionsmusters in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen, wohingegen eine sTNF-Behandlung in HeLa-Zellen die Expression von TRAF1- und cIAP2-mRNA induzierte. Während TRAF1-mRNA in unstimulierten HeLa-Zellen nicht nachweisbar war, war cIAP2-mRNA in geringer Menge schon in den unstimulierten Zellen vorhanden. Die Expression der anderen Moleküle, insbesondere TRAF2 und cIAP1, wurde dagegen durch die Stimulation mit sTNF in HeLa-Zellen nicht beeinflusst. TRAF2- und cIAP1-mRNA waren in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen konstitutiv exprimiert und durch sTNF-Stimulation konnte in beiden Zell-Populationen keine Veränderung des Expressionsstatus beobachtet werden (Abb.11).

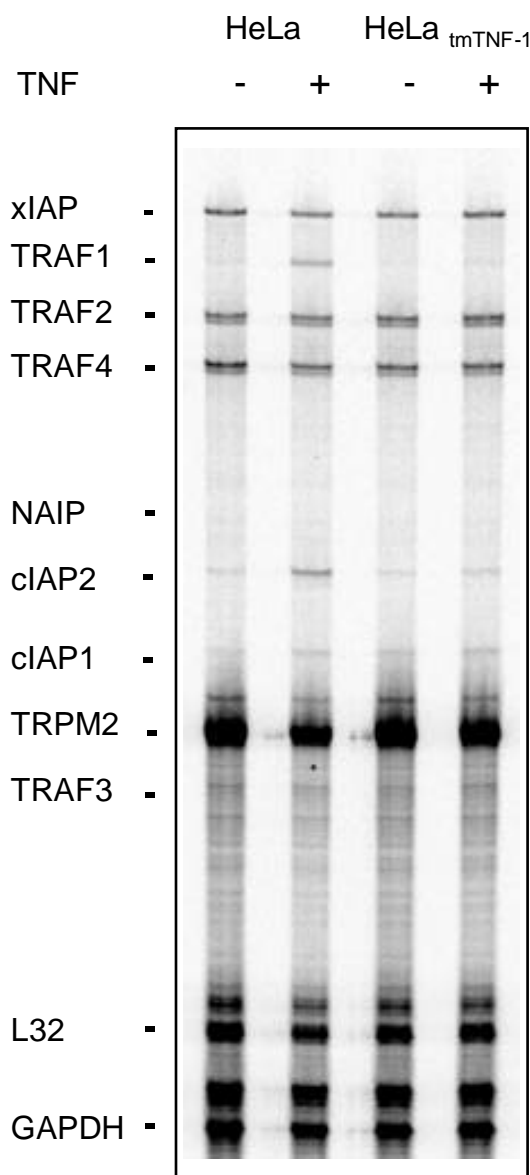


Abb. 11: Einfluß der tmTNF-Expression auf die Transkription von cIAP- und TRAF-Genen. HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen wurden für 4.5 h mit TNF (50 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt. Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde in "RNase protection assays" mit den angegebenen ³³P-markierten Sonden analysiert (Kap. 2.2.15). Die Auswertung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Banden erfolgte über Posphor imaging.

induzierten JNK-Aktivierung in HeLa_{tmTNF}-Zellen

Neben dem Transkriptionsfaktor NF- κ B ist auch AP-1 ein Mediator TNF-induzierter Antworten (Karin et al., 1997). Für c-jun ist gezeigt, daß es als Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1 fungiert. Um den Effekt der konstitutiven tmTNF-Expression in HeLa-Zellen auf diesen geninduktiven TNF-Signalweg zu untersuchen, wurde die Aktivierung der JNK in diesen Zellen untersucht (Kap. 2.2.16). Dazu wurden TNF- und IL-1 β -stimulierte bzw. unbehandelte HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen lysiert, die JNK mit anti-JNK-Antikörper immunpräzipitiert und die entstandenen JNK-Antikörper-Komplexe an Protein-G-Sepharose-Beads gebunden. Diese wurden mit GST-c-jun (1-87)-Fusionsprotein und radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach Auftrennung im SDS-Gel konnte die Menge des phosphorylierten Substrats festgestellt und daraus die Aktivität der JNK abgeleitet werden.

Es zeigte sich, daß die HeLa_{tmTNF}-Zellen keine konstitutive JNK-Aktivierung aufweisen (Abb. 12). Die Zugabe von sTNF konnte keine Aktivierung der JNK induzieren, wohingegen in HeLa-Zellen mit 10 ng/ml TNF eine deutliche JNK-Aktivierung gezeigt wurde. Die Stimulation von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen mit IL-1 β resultierte in einer JNK-Aktivierung, die vergleichbar mit der IL-1 β -induzierten JNK-Aktivierung in untransfizierten HeLa-Zellen war.

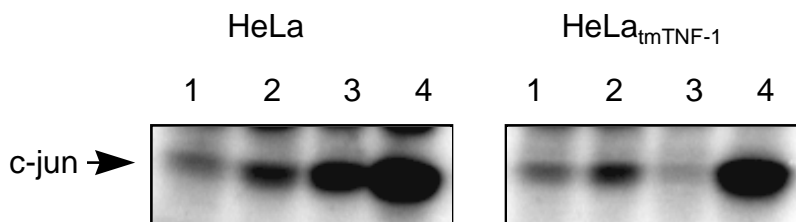


Abb. 12: Einfluß der tmTNF-Überexpression auf die sTNF- und IL-1 β -induzierte JNK-Aktivierung. HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit 0,1 ng/ml TNF (Spur 2), 10 ng/ml sTNF (Spur 3) oder mit 5 ng/ml IL-1 β (Spur 4) für 20 min stimuliert oder blieben unbehandelt (Spur 1). Nach Zellaufschluß, Immunpräzipitation der JNK mit anti-JNK-Ak und Bindung der entstandenen Komplexe an Protein-G-Sepharose, wurde die an den Beads immobilisierte JNK mit γ -³²P-ATP und GST-c-jun (1-87)-Protein inkubiert. Nach SDS-Gelelektrophorese wurde phosphoryliertes c-jun durch Phosphorimaging analysiert (Kap. 2.2.16).

3.5 CHX oder IFN- γ induzierte Apoptose in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen

HeLa-Zellen sind gegenüber den zytotoxischen Effekten von TNF weitgehend resistent. In Anwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) kann TNF jedoch Apoptose induzieren (Wallach und Holtmann, 1988). Dies deutet darauf hin, daß in HeLa-Zellen Schutzmechanismen existieren, die von *de novo* Proteinsynthese abhängig sind. Es stellte

sich nun die Frage, ob in HeLa_{tmTNF}-Zellen die Zugabe von CHX ausreichend ist, um Apoptose zu induzieren, da die bisherigen Ergebnisse auf einen tmTNF-induzierten konstitutiv aktivierten TNF-R1-Signalkomplex hindeuten.

Tatsächlich waren HeLa_{tmTNF-1}-Zellen sehr CHX-sensitiv, wie sich der ED50 von ca. 1 µg/ml für die CHX-induzierte Zytotoxizität ergab (Abb. 13A). Im Gegensatz dazu überlebten ca. 70 % der untransfizierten HeLa-Zellen wesentlich höhere CHX-Konzentrationen (bis zu 60 µg/ml). Die Zugabe von sTNF verstärkte die CHX-induzierte Zytotoxizität in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen nicht weiter, wohingegen HeLa-Zellen die erwartete starke zytotoxische Antwort zeigten (Abb. 13B). In HeLa_{tmTNF-1}-Zellen konnte die CHX-induzierte und in HeLa-Zellen die CHX+sTNF-induzierte Cytotoxizität mit dem Breitspektrum-Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk inhibiert werden (Abb. 13C).

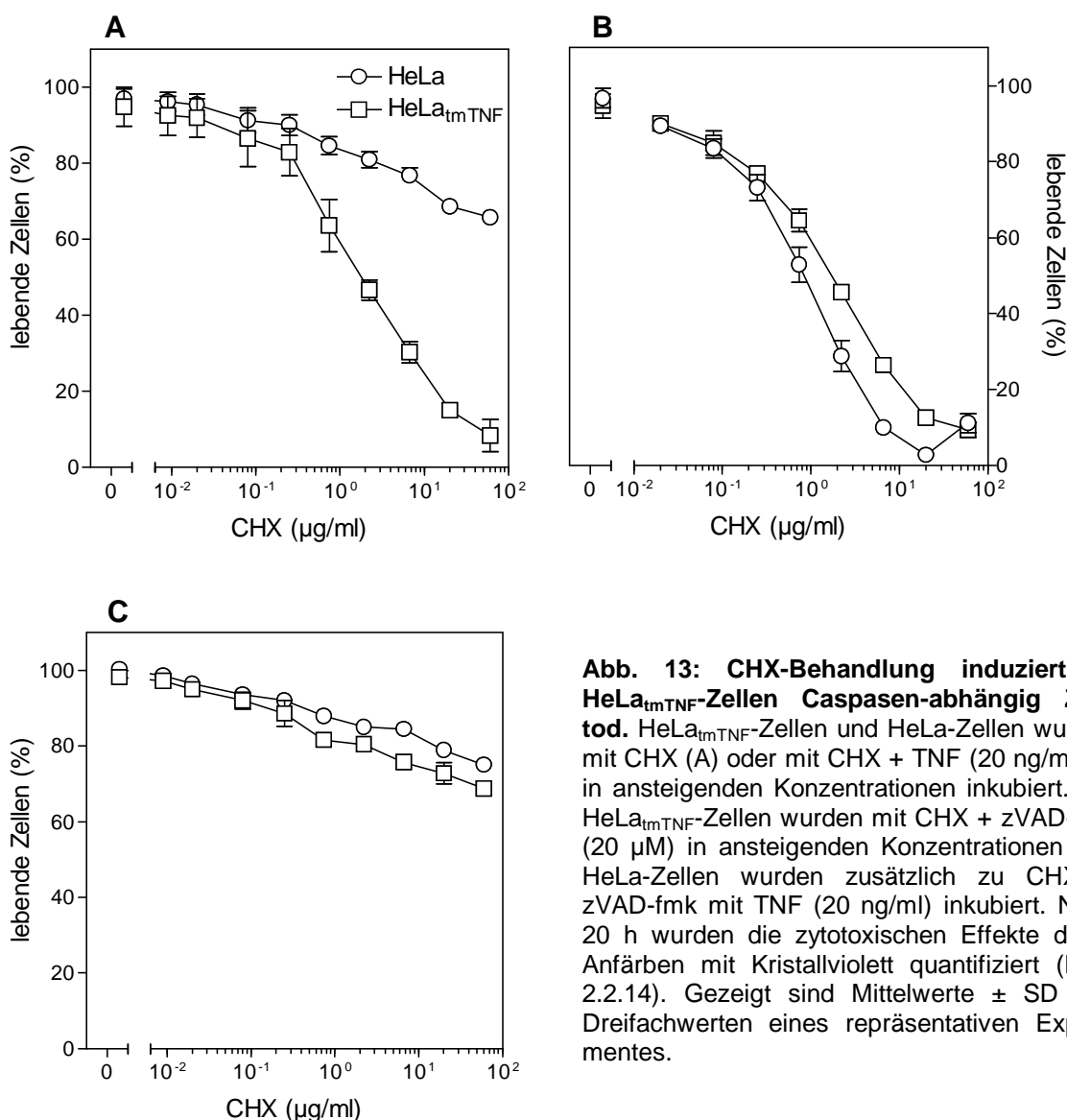


Abb. 13: CHX-Behandlung induziert in HeLa_{tmTNF}-Zellen Caspasen-abhängig Zell-tod. HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit CHX (A) oder mit CHX + TNF (20 ng/ml, B) in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. (C) HeLa_{tmTNF}-Zellen wurden mit CHX + zVAD-fmk (20 µM) in ansteigenden Konzentrationen und HeLa-Zellen wurden zusätzlich zu CHX + zVAD-fmk mit TNF (20 ng/ml) inkubiert. Nach 20 h wurden die zytotoxischen Effekte durch Anfärben mit Kristallviolett quantifiziert (Kap. 2.2.14). Gezeigt sind Mittelwerte ± SD aus Dreifachwerten eines repräsentativen Experimentes.

Für TNF ist gezeigt worden, daß es mit

IFN- γ synergistisch reagieren kann. Eine Kombination aus TNF und IFN- γ kann im Langzeitassay Zytotoxizität in HeLa-Zellen induzieren (Scheurich et al., 1986). In HeLa_{tmTNF-1}-Zellen wurde durch IFN- γ eine Zytotoxizität von ca. 50 % induziert, wohingegen in HeLa-Zellen diese Behandlung keinen Effekt hatte. Eine Kombination aus IFN- γ und TNF induzierte in HeLa-Zellen Zytotoxizität im gleichen Ausmaß wie IFN- γ allein in HeLa_{tmTNF}-Zellen verursachte (Abb. 14).

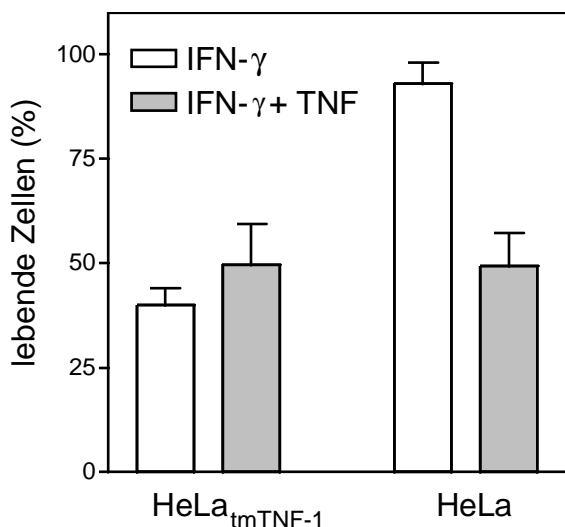


Abb. 14: IFN- γ -Behandlung induziert Zelltod in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen. HeLa_{tmTNF}-Zellen und HeLa-Zellen wurden jeweils mit IFN- γ (20 ng/ml) in der Abwesenheit oder Anwesenheit von TNF (50 ng/ml) inkubiert. Nach 20 h wurden die zytotoxischen Effekte durch Anfärben mit Kristallviolett quantifiziert (Kap. 2.2.14). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils mit Doppelwerten ausgeführt wurden (100% = unbehandelte Zellen).

Um zu bestätigen, daß es sich bei den CHX-induzierten zytotoxischen Effekten in HeLa_{tmTNF}-Zellen um Apoptose handelt, wurde die Aktivierung der Caspase 3 untersucht. Für diese Caspase ist gezeigt worden, daß sie eine zentrale Rolle in der Durchführung apoptotischer Prozesse spielt (Janicke et al., 1998). Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung. Als Aktivierungsparameter wurde die Reduktion der Bande für unprozessierte d.h. nicht aktivierte Caspase im "Western-Blot" analysiert (Kap. 2.2.11). HeLa_{tmTNF-1}-Zellen zeigten nach Zugabe von CHX eine nahezu vollständige Aktivierung der Caspase 3 (Abb. 15). Derselbe Effekt konnte in HeLa-Zellen nach Zugabe von TNF und CHX beobachtet werden. CHX allein induzierte in HeLa-Zellen bereits eine sichtbare Reduktion der Caspase-3 Bande. Diese Reduktion war aber um ein vielfaches geringer als die Reduktion der Bande, die nach Zugabe von CHX zu HeLa_{tmTNF-1}-Zellen beobachtet werden konnte.

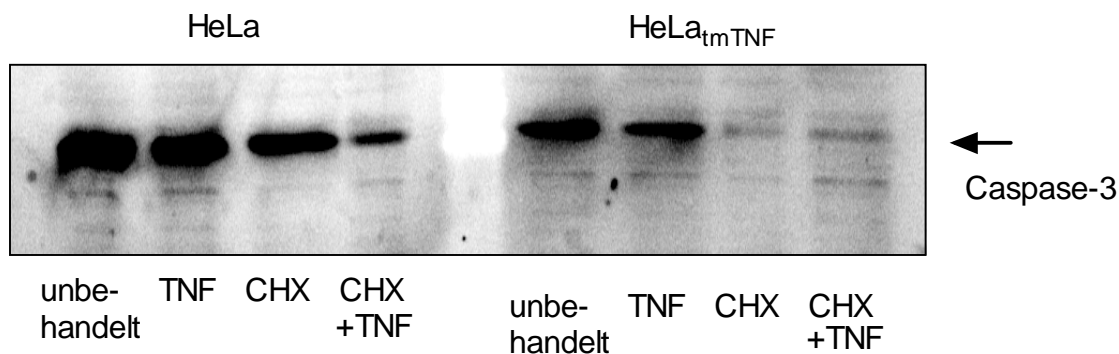


Abb. 15: CHX induziert Caspase-3-Degradierung in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen. HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen wurden jeweils mit CHX (1 µg/ml) oder in Kombination mit TNF (20 ng/ml) für 4 h stimuliert. Die Caspase-3-Aktivierung wurde in zytoplasmatischen Extrakten von diesen Zellen mit einem Caspase-3-spezifischen Antikörper im "Western-Blot" analysiert (Kap. 2.2.11). Die Blots wurden mit der "enhanced chemifluorescence"-Methode entwickelt.

3.6 Membranständiges TNF kann auf Einzelzell-Ebene in einem autotropen Mechanismus wirken

In allen bisher beschriebenen Experimenten wurden Zellen verwendet, die zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen waren. Unter diesen Kulturbedingungen kann der auf der Zelloberfläche exprimierte TNF-R1 prinzipiell mit tmTNF-Molekülen derselben Zelle (autotrop) bzw. mit tmTNF-Molekülen der Nachbarzelle interagieren (juxtotrop). Um zu untersuchen, ob tmTNF und TNF-R1 auf derselben Zelle interagieren und ein Signal induzieren können, wurden HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen mit einer statistischen Dichte von einer Zelle pro Well ausgesät. Nach Adhärenz wurden die Zellen für 18 h mit 1 µg/ml CHX behandelt. Das CHX wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium sehr stark verdünnt und die Zellen wurden weiterkultiviert. Nach 14 Tagen wurde der Prozentsatz überlebender Zellen anhand der gewachsenen Zellklone mikroskopisch ermittelt.

Die CHX-behandelten HeLa_{tmTNF-1} Zellen zeigten eine drastisch reduzierte Kolonienzahl im Vergleich zu untransfizierten CHX-behandelten HeLa-Zellen (Abb. 16). Der mit dieser CHX-Konzentration-induzierte zytotoxische Effekt war mit dem Effekt vergleichbar, der bei Verwendung von konfluenten Zellmonolayern mit HeLa_{tmTNF-1}-Zellen erhalten wurde (Kap. 3.5). Die Zugabe von zVAD-fmk inhibierte die CHX-induzierte Zytotoxizität in HeLa_{tmTNF-1}-Zellen (Abb. 16). Dadurch konnte bestätigt werden, daß CHX Zytotoxizität in einem Caspase-abhängigen Mechanismus induziert und tmTNF den TNF-R1 auf derselben Zelle stimulieren kann.

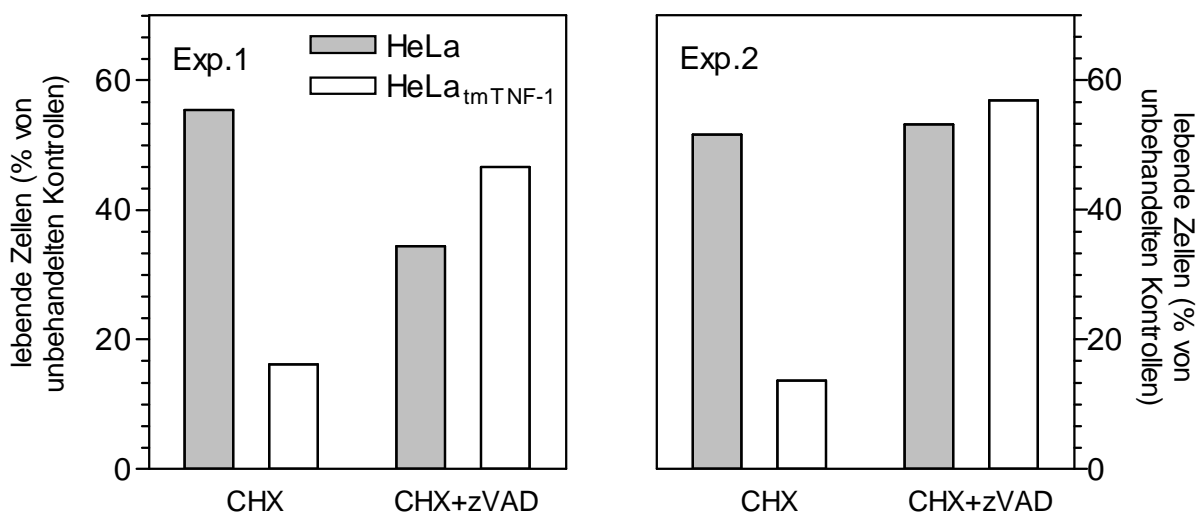


Abb. 16: Autotrope Stimulierung von HeLa-Zellen mit tmTNF. HeLa_{tmTNF-1}-Zellen und HeLa-Zellen wurden jeweils mit einer statistischen Dichte von 1 Zelle pro Well mit 192 Replikaten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit CHX (1 µg/ml), mit CHX + zVAD-fmk (20 µM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Das Volumen betrug 10 µl. Nach 18 h wurden 290 µl Zellkulturmedium in jedes Well pipettiert und die Wells wurden nach 14 Tagen Kultur mikroskopisch auf gewachsene Kolonien analysiert. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien in unbehandelten Kontrollgruppen lag mit 63% in dem aus der Poisson-Statistik erwarteten Rahmen. Bei HeLa-Zellen waren in 66% und 67% der Wells Kolonien gewachsen. Dies entsprach 126 bzw. 128 positiven Wells. Bei HeLa_{tmTNF-1}-Zellen waren in 49% und 77% positive Kulturen gewachsen. Dies entsprach 95 und 148 positiven Wells. Gezeigt sind die relativen CHX-Effekte in Abwesenheit und in Anwesenheit von zVAD-fmk (die unbehandelte Kontrollgruppe wurde 100% lebende Zellen gesetzt).

4 Diskussion

Endothelzellen, Monozyten und T-Lymphozyten exprimieren membranständiges TNF und TNF-Rezeptoren. Diese Zellen sind meist auch in der Lage, TNF-induzierte Signale zu vermitteln. TNF kann beispielsweise über juxta- bzw. autokrine Mechanismen die primäre T-Zell-Aktivierung (Mimetel-Muinos et al., 1994) oder die zytotoxische Aktivität von Monozyten (Smith et al., 1990) induzieren. Eine essentielle Beteiligung von membranständigen TNF wurde in einigen Immunreaktionen beschrieben (Schmid et al., 1995; Birkland et al., 1992; Aversa et al., 1993). Darüber hinaus ist membranständiges TNF ausreichend, um in einem murinen System einen pathologischen Phänotyp, ähnlich der rheumatoiden Arthritis im Menschen, zu induzieren (Alexopoulou et al., 1997). Auch in der Induktion einer experimentellen Hepatitis scheint der membranständige Ligand eine Rolle zu spielen (Solorzano et al., 1997; Küsters et al., 1997).

Welche Auswirkungen die Koexpression von Ligand und Rezeptor auf die TNF-R1-vermittelten intrazellulären Signalwege einer Zelle hat, ist bisher jedoch unklar. Verschiedene Möglichkeiten sind vorstellbar. Die Koexpression von Rezeptor und Ligand könnte zur Herunterregulation der TNF-Rezeptoren, Desensitivierung einzelner TNF-induzierten Signalwege bzw. zu einem kontinuierlichem TNF-Signal führen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Möglichkeiten anhand eines zellulären Modellsystems untersucht und die zu Grunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene näher beleuchtet. Die humane HeLa-Zell-Linie wurde zur Etablierung dieser tmTNF-exprimierenden Zell-Linien ausgewählt. Diese Zell-Linie exprimiert fast ausschließlich TNF-R1 (Heller et al., 1992; Weiss et al., 1997) und zeigt eine Reihe typischer TNF-Antworten wie z.B. NF- κ B-Aktivierung und IL-6 Produktion (Weiss et al., 1997).

Um ausschließlich die Effekte der membranständigen Form von TNF analysieren zu können, wurde ein Expressionskonstrukt, das für eine nicht spaltbare Form des TNF kodiert, zur Etablierung tmTNF-überexprimierender Zellen verwendet. In diesem Konstrukt sind die ersten 12 Aminosäuren C-terminal der Prozessierungsstelle von membranständiger zu löslicher Form deletiert. Dieses Molekül wird als nicht prozessierbares membranverankertes Molekül exprimiert (Perez et al., 1990). Das homologe murine Molekül, muTNF Δ (1-12), besitzt eine verringerte Bioaktivität, wie Versuche mit einer murinen Zell-Linie, die dieses Molekül konstitutiv exprimieren, zeigen (Decoster et al., 1995). Allerdings scheint es in Tiermodellen funktionell zu sein (Alexopoulou et al., 1997). Trotzdem ist es wichtig darauf hinzuweisen, daß die Δ (1-12) Mutante von humanem TNF uneingeschränkt bioaktiv ist. Stimulation des TNF-R1 mit TNF(Δ 1-12) resultiert in TNF-Antworten, die in Art und Intensität

der Stimulation mit sTNF vergleichbar sind (Grell, persönliche Mitteilung). In Bezug auf TNF-R2 konnte sogar eine verstärkte Signalkompetenz gezeigt werden (Grell et al., 1995). Die unterschiedliche Bioaktivität dieser TNF-Mutanten könnte aber auch auf die unterschiedlichen Spezies zurückzuführen sein.

In den Zellkulturüberständen von HeLa_{tmTNF}-Zellen war erwartungsgemäß kein bioaktives lösliches TNF nachweisbar (Kap. 3.1.3). so kann bei der Interpretation der Versuchsergebnisse davon ausgegangen werden, daß alle TNF-Antworten ausschließlich durch membranständiges TNF induziert werden.

4.1 Koexpression von TNF-R1 und membranständigem TNF auf HeLa_{tmTNF}-Zellen

Um klonale Artefakte durch die Selektion weitgehend auszuschließen, wurden drei unabhängige tmTNF-exprimierende HeLa-Zellpopulationen etabliert. Die durchflußzytometrischen Analysen zeigten, daß tmTNF auf der Zelloberfläche von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen exprimiert wird (Abb. 4A und B). Die Expression von TNF-R1 an der Zelloberfläche dieser Zellen war allerdings nur nachweisbar, wenn eine pH 3 Behandlung durchgeführt wurde. Dies deutet darauf hin, daß tmTNF-TNF-R1 Komplexe an der Zelloberfläche von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen vorliegen, die durch pH 3 Behandlung getrennt werden können.

In der durchflußzytometrischen Analyse war die Anzahl der detektierbaren TNF-R1-Moleküle, im Vergleich zu untransfizierten HeLa-Zellen, von der Koexpression des tmTNF weitgehend unbeeinflusst (Abb. 4B und 4D). In den Gleichgewichtsstudien bei 4°C war die Expression von TNF-R1 an der Zelloberfläche von HeLa_{tmTNF-1}-Zellen ebenfalls nur nach einer pH 3 Behandlung nachweisbar. Die Anzahl der TNF-R1-Moleküle, wie aus der spezifischen ¹²⁵I-TNF Bindung an HeLa_{tmTNF-1}-Zellen zu erkennen ist, war im Vergleich zu den HeLa-Zellen um ca. 50% verringert.

Ein nicht kompetierender TNF-R1-spezifischen Antikörper stand nicht zur Verfügung. Deshalb konnte die Effizienz einer pH 3 Behandlung nicht überprüft werden. Die vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, daß mindestens 50% der auf untransfizierten HeLa-Zellen exprimierten TNF-R1-Moleküle an der Zelloberfläche von HeLa_{tmTNF}-Zellen exprimiert werden (Abb. 4E) und diese mit TNF-R1 komplexiert vorliegen (Abb. 4B und E).

Assoziationsstudien bei 37°C mit ¹²⁵I-TNF zeigten, daß unter physiologischen Bedingungen ein Austausch zwischen tmTNF und TNF an TNF-R1 stattfinden kann. Die

spezifische Bindung von ^{125}I -TNF an HeLa_{tmTNF}-Zellen war im Vergleich zu HeLa-Zellen um ca. 70% reduziert. Hieraus kann nicht auf eine verringerte TNF-Rezeptorzahl geschlossen werden, vielmehr charakterisiert das spezifische ^{125}I -TNF-Bindung an HeLa_{tmTNF}-Zellen den Fließgleichgewichtszustand zwischen TNF-R1-gebundenem ^{125}I -TNF und tmTNF.

4.2 Kontinuierliche IL-6 Produktion, NF- κ B- und p38 MAP-Kinase Aktivierung in HeLa_{tmTNF}-Zellen

Die Rezeptor-Ligand-Interaktionen an der Zelloberfläche von HeLa_{tmTNF}-Zellen resultieren in einem aktiven TNF-Rezeptorkomplex, wie aus der kontinuierlichen IL-6 Produktion dieser Zellen geschlossen werden konnte (Abb. 6A). Die Hemmstudien mit TNF-neutralisierenden Antikörpern resultierten trotz der hohen Antikörperkonzentrationen, die eingesetzt wurden, nur in einer partiellen Inhibition (konzentrationsabhängig bis zu 50%, Abb. 6B) der kontinuierlichen IL-6 Produktion in HeLa_{tmTNF}-Zellen. Sehr hohe Konzentrationen an Antikörper sind zur Konkurrenz der tmTNF-Bindung an TNF-R1 notwendig, da die Neutralisation von tmTNF- im Vergleich zu sTNF-Effekten generell sehr viel höhere Konzentrationen von TNF-spezifischen, neutralisierenden Antikörpern benötigt (Grell, unpublizierte Beobachtungen). Da keine vollständige Inhibition der kontinuierlichen IL-6 Produktion in HeLa_{tmTNF}-Zellen erreicht werden konnte, besteht die Möglichkeit, daß sich bereits intrazellulär signalisierungsfähige tmTNF/TNF-R1 Komplexe bilden. Tatsächlich legen die Ergebnisse von Tang und Kollegen den Schluß nahe, daß eine Trimerisierung der TNF-Moleküle bereits intrazellulär erfolgt (Tang et al., 1996). Im Kontext mit anderen experimentellen Befunden, die zeigen, daß TNF-R1 zum größten Teil in Kompartimenten des Golgi lokalisiert ist (Jones et al., 1999), könnte es möglich sein, daß bereits intrazellulär funktionelle tmTNF-TNF-R1 Komplexe vorliegen.

Die IL-6 Gen Expression ist unter der Kontrolle eines NF- κ B-abhängigen Promotors (Liebermann and Baltimore, 1990). Stimulation von Zellen mit löslichem TNF führt zur Phosphorylierung und Degradierung des Inhibitormoleküls I κ B und zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern, der nach Transaktivierung, Gen-spezifische Transkription aktiviert (Kap. 1.6.2).

In HeLa_{tmTNF}-Zellen war eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung im Sinne von Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern nachweisbar (Abb. 7A). Die NF- κ B-Aktivierung war aber im Vergleich zu den sTNF-stimulierten untransfizierten HeLa-Zellen deutlich geringer. Die Zusammensetzung des NF- κ B Dimers wurde mittels *Supershift* als p50/p65-Heterodimer-

Komplex identifiziert (Abb. 7B). Interessanterweise ist $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$, ein wichtiger molekularer Inhibitor der Translokation des NF- κB Moleküls, nicht konstitutiv degradiert. Die exprimierten Proteinmengen dieses Moleküls waren mit denen vergleichbar, die in untransfizierten, unstimulierten HeLa-Zellen nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Demnach kann NF- κB -Translokation ohne signifikante Degradation des Inhibitormoleküls $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ stattfinden. Ähnliche Ergebnisse wurden von Giri und Aggarwal erhalten. Diese Autoren konnten zeigen, daß in HuT-78 Zellen NF- κB konstitutiv aktiviert ist und gleichzeitig keine signifikante Degradation des Inhibitormoleküls $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ nachgewiesen werden konnte (Giri und Aggarwal, 1999). Der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings unklar.

Es stellt sich nun die Frage, warum eine signifikant niedrigere NF- κB -Aktivierung in $\text{HeLa}_{\text{tmTNF}}$ -Zellen im Vergleich zu TNF-stimulierten HeLa-Zellen ausreichend ist, IL-6 in vergleichbaren Mengen wie TNF-stimulierte untransfizierte HeLa-Zellen zu produzieren. Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten sind vorstellbar: Eine minimale NF- κB -Aktivierung ist notwendig, um überhaupt einen Transkriptionsstart des IL-6 Gens zu initiieren, aber die sich anschließende Proteinexpression wird auf verschiedenen Ebenen (Transkription, mRNA-Stabilität oder Translation) reguliert. So ist beispielsweise im Falle von IL-1-induzierter IL-6 Produktion gezeigt worden, daß die Aktivierung der JNK neben NF- κB einen essentiellen Beitrag zur IL-6 Gen Expression leistet (Krause et al., 1998). Diese Möglichkeit ist hier allerdings sehr unwahrscheinlich, da $\text{HeLa}_{\text{tmTNF}}$ -Zellen keine konstitutive JNK Aktivierung zeigen (Abb. 12). Eine weitere Möglichkeit könnte sein, daß andere Transkriptionsfaktoren (z.B. NF-IL-6 oder ATF-2) die Transkriptionseffizienz des IL-6 Gens beeinflussen. Der Transkriptionsfaktor ATF-2 kann beispielsweise mit NF- κB DNA-abhängig interagieren und somit zu verstärkter Transkription führen (Du et al., 1993; Kaszubska et al., 1993). Es gibt auch Hinweise, daß die p38 MAP Kinase Kaskade eine Rolle in der mRNA-Stabilität spielen könnte, wie in IL-1 β -stimulierten fibroblastenähnlichen Synoviozyten gezeigt wurde (Miyazawa et al., 1998). Eine ähnliche Funktion ist auch in der tmTNF-induzierten IL-6 Genexpression vorstellbar. So könnte es durch die p38 MAP Kinase Aktivierung zu einer im Vergleich zur NF- κB -Aktivierung verstärkten IL-6 Produktion über die Stabilisierung der IL-6 mRNA kommen. Der molekulare Mechanismus ist allerdings noch unklar.

Die p38 MAP Kinase Kaskade spielt nicht nur in der direkten Regulation der Transkriptionsstärke und mRNA-Stabilität eine Rolle, sondern ist auch an der Transkriptionsinitiation über die Transaktivierung der p65-Untereinheit des NF- κB -Moleküls involviert (Kap. 1.6.2.2). Deshalb wurde in $\text{HeLa}_{\text{tmTNF}}$ -Zellen die Aktivierung der p38 MAP Kinase untersucht. Der spezifische p38 MAP Kinase Inhibitor SB203580 (Cuenda et al.,

1995) reduzierte die konstitutive IL-6 Produktion in HeLa_{tmTNF}-Zellen bzw. die TNF-induzierte IL-6 Produktion in HeLa-Zellen um mehr als 50% (Abb. 9). Dies deutet auf einen Einfluß der p38 MAP Kinase in der konstitutiven IL-6 Produktion hin. Tatsächlich konnte auch auf molekularer Ebene mit Hilfe von spezifischen Antikörpern für die phosphorylierte und damit aktivierte Form der Kinase eine konstitutive p38 MAP Kinase Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 10). Ein Luciferase Reportergen, das unter der Kontrolle eines NF- κ B-abhängigen Promotors steht, war in transienten Reporter-Gen-Assays ebenfalls konstitutiv exprimiert (Abb. 7C). Auf welcher Ebene (RNA-Stabilität oder Transaktivierung von p65) die p38 MAP Kinase Kaskade im vorliegenden Experimentalsystem allerdings eingreift, ist unklar, da die Beteiligung weiterer Signalwege, die ebenfalls eine Transaktivierung von p65 vermitteln können (Kap. 1.6.2.2), nicht näher untersucht wurde. Die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung in HeLa-Zellen kann im Reporter-Gen-Assay mit dem p38 MAP Kinase Inhibitor SB203880 konzentrationsabhängig reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente sprechen für eine Beteiligung dieses Signalweges in der Transaktivierung von p65 in HeLa-Zellen. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß die p38 MAP Kinase Kaskade auch bei der tmTNF-induzierten Transaktivierung des p65-Moleküls beteiligt ist.

In der murinen L929-Zell-Linie wurde kürzlich von Decoster und Kollegen gezeigt, daß die Expression einer nicht prozessierbaren membranständigen Mutante des murinen TNF, muTNF(Δ 1-9, K11E) in einer vollständigen Herunterregulation der Rezeptoren resultiert und die Zellen daraufhin gegenüber TNF-Behandlung völlig resistent werden (Decoster et al, 1998). Die Desensitivierung der Zelle war von der Expression der membranständigen Form des TNF abhängig. Dies wurde mit Hilfe einer weiteren TNF-Mutante, die ausschließlich als lösliches Molekül von der Zelle sezerniert wird, gezeigt. Zellen, die diese ausschließlich lösliche Form des TNF exprimieren, zeigen keine Herunterregulation der TNF-Rezeptoren und damit auch keine Desensitivierung. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnisse. Aus folgenden Gründen ist anzunehmen, daß die hier vorgestellten Ergebnisse von physiologischer Relevanz sind:

- 1) Um Zelltyp-spezifische Artefakte auszuschließen, wurden tmTNF-exprimierende Populationen einer weiteren Zell-Linie etabliert: 293_{tmTNF-1} und 293_{tmTNF-2}. Diese Zell-Populationen zeigten ebenfalls eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung, wie in transienten Reporter Gen-Assays nachgewiesen werden konnte (Abb. 8). In dieser Zelle war die konstitutive NF- κ B-Aktivierung vergleichbar mit der TNF-induzierten NF- κ B-Aktivierung in untransfizierten Zellen.

- 2) Von Giri und Aggarwal wurde gezeigt, daß in der HUT-78 Zell-Linie über einen autokrinen Mechanismus NF- κ B konstitutiv und TNF-abhängig aktiviert ist (Giri and Aggarwal, 1998).
- 3) Es ist unwahrscheinlich, daß eine vollständige TNF-Desensitivierung eine typische Reaktion TNF-R1-positiver Zellen ist, die gleichzeitig auch TNF exprimieren. So kann beispielsweise über die Stimulation von CD30, CD40 und TNF-R2 TNF-Expression induziert werden. Das an der Zelloberfläche exprimierte TNF kann wiederum als Ligand von TNF-R1 fungieren und Apoptose induzieren (Grell et al., 1999). Es wurde auch gezeigt, daß nach Quervernetzung von Adhäsionsmolekülen in der beide TNF-Rezeptoren exprimierenden *human umbilical cord vein cell* über einen autokrinen/juxtakrinen TNF-vermittelten Mechanismus die Produktion von Gewebefaktor induziert wird (Schmid et al., 1995).

4.3 Pathophysiologisches Potential von tmTNF

Es wurde spekuliert, daß durch die Inhibition der Prozessierung des tmTNF die pathophysiologischen Eigenschaften von TNF unterdrückt werden könnten. Dies ist nicht der Fall wie die bereits erwähnten Befunde mit chronischen entzündlichen Krankheiten (experimenteller Hepatitis und Arthritis) zeigen (Solorzano et al., 1997; Alexopoulou et al., 1997). Auch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bestätigen nun auf molekularer Ebene, daß die Expression von tmTNF in der kontinuierlichen Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen, wie NF- κ B und p38 MAP Kinase Signalkaskade (Abb. 6, 7, 8, 9 und 10) resultiert.

Nach der Entdeckung und Klonierung der TNF-prozessierenden Disintegrin-Metalloprotease TACE (Black et al., 1997; Moss et al., 1997) sind beträchtliche Fortschritte in der Aufklärung des Wirkmechanismus dieser Proteasen gemacht wurden (Kap. 1.2). So konnte kürzlich gezeigt werden, daß TACE neben TNF weitere Substrate (TNF-R2, L-Selectin und TGF- β) prozessieren kann (Peschon et al., 1998). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß eine murine TNF-Deletionsmutante, der die ersten 9 Aminosäuren C-terminal der Prozessierungsstelle von membranständigem zu löslichem TNF fehlen, immer noch proteolytisch prozessiert werden kann (Decoster et al., 1995). Überraschenderweise gibt es keine einheitliche Erkennungssequenz für die Spaltung auf Aminosäureebene (Peschon et al., 1998). Es wird deshalb spekuliert, daß vielmehr die dreidimensionale Struktur für die Abspaltung der Ektodomänen ausschlaggebend ist (Peschon et al., 1998). Im Falle von TNF ist vorstellbar, daß die ersten neun Aminosäuren C-terminal der Prozessierungsstelle zu

keiner wesentlichen Konformationsänderung führen, da weiterhin eine proteolytische Spaltung der membranständigen TNF-Mutanten möglich ist, aber eine weitere Deletion oder Modifikation von den drei sich anschließenden Aminosäuren eine wesentliche Auswirkung auf die Raumstruktur des TNF-Moleküls hat, so daß eine Prozessierung nicht mehr stattfinden kann. Daß mehrere Substrate von einer Protease erkannt werden, stellt eine weitere Schwierigkeit in der Entwicklung hochspezifischer Inhibitormoleküle dar: Wie kann selektiv die Prozessierung eines Substrates inhibiert werden, um ungewollte Nebeneffekte zu vermeiden?

4.4 Expression TNF-induzierter Schutzgene

Stimulation von TNF-R1 führt normalerweise nicht zum apoptotischen Zelltod, obwohl dieser Rezeptor über TRADD-FADD die apoptotische Caspasen-Kaskade aktivieren kann (Kap. 1.6.1). Grund dafür ist, daß gleichzeitig durch TNF zytoprotektive Signale vermittelt werden. Physiologischer Hintergrund dafür ist, daß in verschiedenen pathologischen Konditionen (z.B. Entzündungen) die TNF-Sekretion verschiedener Zellen stimuliert wird und ein ungewollter Zelltod von TNF-exponierten Zellen verhindert werden soll. In den meisten Zellen kann die zytoprotektive Funktion des TNF vollständig durch Transkriptions- bzw. Translationsinhibitoren wie CHX oder Actinomycin D verhindert werden (Kap. 3.5). Dies deutet darauf hin, daß TNF-induzierte Genexpression für den Schutz vor TNF-induzierter Apoptose notwendig ist.

Die Expression NF- κ B-abhängiger Schutzgene ist ein wichtiger Bestandteil dieses Schutzsystems. Dafür spricht, daß embryonale Fibroblasten von p65-defizienten Mäusen sehr sensitiv gegenüber sTNF-induzierter Apoptose sind (Beg and Baltimore, 1996). Daneben zeigen auch Arbeiten mit dominant negativen Mutanten des NF- κ B-Inhibitor Moleküls I κ B, daß diese Zellen gegenüber sTNF-induzierter Apoptose sensitiviert sind (Van Antwerp et al., 1996; Brown et al., 1995).

In Analogie zur Stimulation mit sTNF scheint bei der Stimulation mit tmTNF ein ähnliches Repertoire an Schutzgenen exprimiert zu werden, wie sich aus der Tatsache ableiten läßt, daß sich tmTNF-TNF-R1 koexprimierende Zell-Linien etablieren lassen, die konstitutiv tmTNF-abhängig aktiviert sind.

cIAP1, cIAP2, TRAF1 und TRAF2 sind als NF- κ B-abhängige Schutzproteine identifiziert worden (Wang et al., 1998a). Die Moleküle cIAP1 und -2 können über TRAF1 und TRAF2 in den TNF-R1 Komplex rekrutiert werden und direkt die Aktivierung der Initiator-Caspase 8

hemmen (Wang et al., 1998a). Es ist wichtig zu erwähnen, daß der beste Schutz vor TNF-induzierter Apoptose durch die Koexpression von allen genannten Faktoren erhalten wurde. Untersuchungen zur Regulation von den Molekülen der IAP- und TRAF-Familie in untransfizierten HeLa-Zellen und tmTNF-exprimierenden HeLa-Zellen ergaben, daß die Transkription von TRAF1 und cIAP2-mRNA in untransfizierten HeLa-Zellen induziert bzw. verstärkt wird, wohingegen in HeLa_{tmTNF}-Zellen weder eine konstitutive noch eine durch TNF induzierbare verstärkte Transkription dieser Moleküle nachweisbar war (Abb. 11). Die Expression anderer TRAF- und IAP-Gene wird dagegen nicht durch TNF beeinflusst und ist in untransfizierten HeLa-Zellen und HeLa_{tmTNF}-Zellen gleich (Abb. 11). TRAF2-mRNA wird in beiden Zell-Linien konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert, wohingegen die Expression von cIAP1 nicht nachweisbar ist. Für TRAF1 und cIAP2 ist gezeigt worden, daß die Moleküle NF- κ B-abhängig induziert werden (Siemienski, 1998; Schwenzler et al., 1999; Chu et al., 1997).

In HeLa_{tmTNF}-Zellen ist eine konstitutiv schwache NF- κ B-Aktivierung nachweisbar (Abb. 7), die ausreichend ist, um IL-6 Genexpression zu induzieren (Abb. 6). Für die Expression von TRAF1 und cIAP2 könnten noch andere Faktoren zur Initiation einer effizienten Transkription notwendig zu sein. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß eine stärkere Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B notwendig ist.

Von Natoli und Kollegen wurde gezeigt, daß die Inhibition der Induktion NF- κ B-abhängiger Gene nur partiell für die TNF-induzierte Apoptose sensitiviert, wohingegen Zugabe von CHX zur vollständigen Apoptose in HeLa Zellen führen kann (Natoli et al., 1998). Dies bestätigt die Existenz anderer nicht NF- κ B-abhängiger Schutzgene. Diese Genprodukte und/oder andere NF- κ B-abhängige Moleküle wie z.B. A20 könnten den tmTNF-induzierte Schutz gegen das apoptotische Potential von tmTNF vermitteln.

Es gibt neben der Arbeit von Natoli und Kollegen weitere Hinweise in der Literatur, daß NF- κ B-unabhängige TNF-induzierte Schutzgene existieren. Die Aktivierung der p38 MAP Kinase scheint eine Rolle in der TNF-induzierten Expression anti-apoptotischer Moleküle zu spielen (Roulston et al., 1998). HeLa_{tmTNF}-Zellen zeigen eine konstitutive p38 MAP Kinase Aktivierung (Abb. 7). Die Aktivierung des p38 MAP Kinase Signalweges könnte die Expression anderer Schutzgene als TRAF1 und cIAP2 induzieren. In der genannten Arbeit wurde zwischen den verschiedenen Signalen, die durch die p38 MAP Kinase Kaskade induziert werden, nicht differenziert: Die Inhibition dieses Signalweges könnte entweder die Transaktivierung von NF- κ B stören und/oder die Expression anderer nicht NF- κ B-abhängiger Genprodukte inhibieren. Daneben wurde von den gleichen Autoren eine Beteiligung der JNK in den protektiven Prozessen gezeigt (Roulston et al., 1998). Diese Signalwege spielen in

HeLa_{tmTNF}-Zellen keine Rolle, da diese Zellen weder eine konstitutive noch induzierbare JNK-Aktivierung zeigen (Abb. 12).

4.5 Apoptose-Induktion in HeLa_{tmTNF}-Zellen über juxta- und/oder autotrope Mechanismen

HeLa-Zellen sind gegen die zytotoxische Wirkung von TNF aufgrund der verschiedenen bereits erläuterten Schutzmechanismen resistent. Diese Zellen können aber durch Zugabe von CHX oder IFN- γ sensitiviert werden. Dies spiegelt die Situation von Zellen im Gewebeverband wieder; diese Zellen sind normalerweise gegenüber dem zytotoxischen Potential von TNF resistent, solange kein weiterer Stressfaktor vorliegt. Eine Virusinfektion kann beispielsweise einen solchen Stressfaktor darstellen (Wong et al, 1992). Abbildung 13A zeigt, daß Behandlung mit CHX in sehr geringen Konzentrationen, Apoptose in der Mehrheit der HeLa_{tmTNF}-Zellen induzieren kann, wohingegen die Lebensfähigkeit von untransfizierten Zellen nicht signifikant beeinträchtigt wird. Die tmTNF-induzierte Apoptose in Anwesenheit von CHX ist Caspasen-abhängig (Abb. 13C). Dies wurde mit Experimenten gezeigt, in denen der Caspaseninhibitor zVAD-fmk die CHX-induzierte Apoptose inhibierte (Abb. 13). Erwartungsgemäß war auch die Caspase-3 Prozessierung in HeLa_{tmTNF}-Zellen nach Behandlung mit CHX in Gegenwart von zVAD-fmk inhibiert (Abb. 15).

TNF-R1 ist im Gegensatz zu FasR, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 nicht als vorwiegend Apoptose-induzierender Rezeptor beschrieben worden, sondern er scheint eine zentrale Rolle in der unspezifischen Immunabwehr und proinflammatorischen Prozessen zu spielen (Kap. 1.1). IFN- γ , das ebenfalls in diesen Prozessen beteiligt ist, kann synergistisch mit tmTNF in HeLa_{tmTNF}-Zellen Apoptose induzieren. Apoptose ist allerdings erst nach drei Tagen nachweisbar. Dies könnte einen Mechanismus darstellen, wie aktivierte Zellen des Immunsystems (z.B. Makrophagen) nach Ausschaltung des Entzündungsherdes über juxta-/autotrope Signalschleifen eliminiert werden könnten. Die Hypothese, daß HeLa_{tmTNF}-Zellen einen konstitutiv aktivierten Status zeigen, wird durch diese Befunde bestätigt.

Einzelzell-Experimente (Abb. 16) weisen darauf hin, daß die in der durchflußzytometrischen Analyse (Abb. 4B) nachgewiesenen tmTNF-TNF-R1 Komplexe über einen autotropen Mechanismus signalisieren könnten: Membranständiges TNF kann über TNF-R1 CHX-abhängig auf der gleichen Zelle Apoptose induzieren (Abb.16). Rezeptor und Ligand auf einer Zelle bilden also einen aktiven Ligand-Rezeptor Komplex. Ob die Expression der tmTNF-TNF-R1 Komplexe auf der Zelloberfläche notwendig ist oder ob es ausreicht, daß sich bereits intrazellulär Komplexe bilden, ist unklar.

Inwiefern könnte eine autotrope Signalschleife für zelluläre Antworten in nicht überexprimierenden Systemen relevant sein? Von Grell und Kollegen wurde kürzlich gezeigt, daß Stimulation von CD30, CD40 und TNF-R2 in der Expression von tmTNF resultiert, das wiederum über TNF-R1 Apoptose induzieren kann (Grell et al., 1999). Möglicherweise wird die tmTNF-TNF-R1 Interaktion über einen autotropen Signalmechanismus vermittelt.

Im Blutkreislauf sind die zirkulierenden Lymphozyten normalerweise ohne direkten Zellkontakt. Für die Hochregulation der tmTNF-Expression in Monozyten sind geringe Mengen von LPS ausreichend. Diese Zellen könnten über einen autotropen Signalmechanismus von tmTNF über TNF-R1 zusätzlich aktiviert werden.

4.6 Differentielle Regulation TNF-induzierter Signalwege nach Langzeit-Stimulation

Die IL-6 Produktion, p38 MAP Kinase Aktivierung und die Kinetik der Apoptose Induktion in Gegenwart von CHX entsprechen sich bei HeLa_{tmTNF}-Zellen und TNF-stimulierten HeLa-Zellen. Die konstitutive NF- κ B-Aktivierung war allerdings um ca. 50% im Vergleich zu der sTNF-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in HeLa-Zellen reduziert. Eine Langzeitstimulation von HeLa-Zellen mit sTNF resultiert auch in einer kontinuierlichen, aber schwachen NF- κ B Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß eine kontinuierlich stimulierte Zelle ihre Signalwege differentiell reguliert.

Untersuchungen der JNK-Kinase-Aktivierung bestätigen diese Vermutung. HeLa_{tmTNF}-Zellen zeigen weder eine konstitutive noch einen sTNF-induzierbare JNK-Aktivierung, wohingegen in sTNF-stimulierten HeLa-Zellen JNK-Aktivierung in einem Zeitraum von 10-60 min nach Stimulation nachweisbar ist (Abb. 12 und Daten nicht gezeigt).

4.7 Retrograde Signale über tmTNF

In den Integrin-Signalwegen wird schon seit längerem ein bidirektionales *Signaling* diskutiert. Neuere Erkenntnisse stellen auch im Bereich der TNF-Liganden-Familie das herkömmliche Verständnis von Rezeptor-Liganden-Interaktionen in Frage. So können einige Liganden der TNF-Familie nach Stimulation mit ihren komplementären Rezeptoren über ihre zytoplasmatische Domäne Signale weiterleiten: Neutrophile Granulozyten können beispielsweise über CD30L zur Zytokin-Sekretion angeregt werden (Wiley et al., 1996). Für das membranständige TNF wurde eine Rezeptor-abhängige Dephosphorylierung von

Serinresten an Aminosäureposition 2 und/oder 5 beschrieben (Watts et al., 1999). Als Mediator der initialen Phosphorylierung wurde die Casein-Kinase 1 identifiziert, die Proteine selektiv an STES-Motiven phosphoryliert. Desweiteren wurde eine von löslichen Rezeptoren abhängige Ca-Oszillation beschrieben (Watts et al., 1999).

Weitere TNF-abhängige Signale sind nicht bekannt. Alle hier von tmTNF via TNF-R1-induzierten Signale sind typische TNF-R1-Antworten, die auch nach Stimulation mit dem löslichen Liganden beobachtet werden können (Weiss et al., 1997; 1998). Es ist daher unwahrscheinlich, daß retrograde TNF-Signale in dem hier vorgestellten Experimental-System eine Rolle spielen. Darüber hinaus wurde auch durch die Klonierung der membranständigen TNF-Mutante, TNF Δ (1-12) das Serin an Aminosäureposition 2 durch Glycin ersetzt (Grell et al., 1995). Dies könnte in einer Störung der intrazellulären Signalweiterleitung resultieren.

5 Literaturverzeichnis

- Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A., and Krönke, M. (1996). A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway *J. Biol. Chem.* 271, 14617-14622.
- Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., and Krönke, M. (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* 86, 937-947.
- Adolf, R.A., Grell, M., and Scheurich, P. (1994). Tumor necrosis factor. In „*Epidermal Growth Factors and Cytokines*“, T. A. Luger, and T. Schwarz, eds., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 63-88.
- Aggarwal B.B., Kohr W.J., Haas P.E., Moffat B., Spencer S.A., Henzel W.J., Bringman T.S., Nedwin G.E., Goeddel D.V., and Harkins R.N. (1985). Human tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem* 260: 2345-2354.
- Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes-Alnemeri, T., and Alnemeri, E.S. (1997). CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* 57, 615-619.
- Aicher B., Lerch M.M., Müller T., Schilling J., Ullrich A. (1997). Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTPsigma by inducible proteolytic processing. *J. Cell. Biol.* 138(3), 681-696.
- Akkassoglou, K., Probert, L., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. (1997). A role for astrocyte-specific transmembrane TNF in the triggering of inflammation, demyelination and neuronal degeneration in the CNS of transgenic mice. *J. Immunol.* 158, 438-445.
- Alexopoulou, L., M. Pasparakis, and G. Kollias. (1997). A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur. J. Immunol.* 27: 2588-2592.
- Amour A., Slocombe P.M., Webster A., Butler M., Knight C.G., Smith B.J., Stephens P.E., Shelley C., Hutton M., Knauper V., Docherty A.J., Murphy G. (1998). TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* 435(1):39-44.
- Anderson, D.M., Marakovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., and Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390: 175-179.
- Arch, R.H. and Thompson, C.B. (1998). 4-1BB and OX40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor κ B. *Mol. Cell. Biol.* 18, 558-565.
- Arribas J., Lopez-Casillas F., Massague J. (1997). Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* 272(27), 17160-17165.
- Aversa, G., J. Punnonen, and J. E. de Vries. (1993). The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated CD4⁺ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J. Exp. Med.* 177, 1575-1585.
- Baker, E., L. Z. Chen, C. A. Smith, D. F. Callen, R. Goodwin, and G. R. Sutherland. (1991). Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenetics & Cell Genetics* 57, 117-8.
- Banner, D.W., Arcy, A.D., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.-J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.
- Baud V., Liu Z.G., 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(10), 1297-1308
- Bazan, J.F. (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 A.A. and Baldwin A.S. Jr. (1994). Activation of multiple NF-kappa B/Rel DNA-binding complexes by tumor necrosis factor. *Oncogene* 9(5), 1487-1492
- Beg A.A., Finco T.S., Nantermet P.V., and Baldwin A.S. 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.
- Beg, A.A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Bergmann M., Hart L., Lindsay M., Barnes P.J., 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.
- Beutler B. and Cerami A (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 505-518.
- Beutler B. and Cerami A (1989). The biology of cachectin/TNF-a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 625-655.
- Beutler B., Greenwald D., Hulmes J.D., Chang M., Pan Y.-C.E., Mathison J., Ulvetich R., and Cerami A. (1985 b). Identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. *Nature* 316, 584-588.
- Beutler B., Mahoney J., Le Trang N., Pekala P., and Cerami A. (1985a). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.* 161, 984-995.
- Beyaert R., Cuenda A., Vanden Berghe W., Plaisance S., Lee J.C., Haegeman G., Cohen P., Fiers W. (1996). The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 15(8), 1914-1923.
- Bigda, L., Beletsky, I., Brakebusch, C., Varfolomeev, Y., Engelmann, H., Bigda, J., Holtmann, H., and Wallach, D. (1994). Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 180, 445-460.
- Birkland, T. P., J. P. Sypek, and D. J. Wyler. (1992). Soluble TNF and membrane TNF expressed on CD4+ T lymphocytes differ in their ability to activate macrophage anti-leishmanial defense. *J. Leukocyte Biol.* 51, 296-299.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J. Virol.* 68, 2521-2528.
- Black R.A., White J.M. (1998) ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10(5), 654-659.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., and Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Blobel C.P. (1997). Metalloproteinase-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNFa and Notch. *Cell* 90, 589-592.
- Bodmer, J.-L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schröter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L.E., Browning, J.L., MacDonald, H.R., 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, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Boldin, M.P., Mett, I.L., and Wallach, D. (1995c). A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. *FEBS Lett.* 367, 39-44.

- Boldin, M.P., Mett, I.L., Varfolomeev, E.E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J.H., and Wallach, D. (1995a). 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.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., and Wallach, D. (1995b). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270, 7795-7798.
- Boucher, L. M., L. E. Marengere, Y. Lu, S. Thukral, and T. W. Mak. (1997). Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 592-600.
- Brennan, F. M., and M. Feldmann. (1996). Cytokines in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 872-77.
- Brockhaus M., Schoenfeld H.J., Schlaeger E.J., Hunziker W., Lesslauer W., and Loetscher H. (1990). Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 3127-3131.
- Brown K., Gerstberger S., Carlson L., Franzoso G., and Siebenlist U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267, 1485-1488.
- Browning, J.L., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E.P., Hession, C., O'Brien-Greco, B., Foley, S.F., and Ware, C.F., (1993). Lymphotoxin β , a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72, 847-856.
- Carpentier I., Declercq W., Malinin N.L., Wallach D., Fiers W., and Beyaert R. (1998). TRAF2 plays a dual role in NF-kappaB-dependent gene activation by mediating the TNF-induced activation of p38 MAPK and IkappaB kinase pathways. *FEBS Lett.* 425(2), 195-198.
- Carroll, M. C., P. Katzman, E. M. Alicot, B. H. Koller, D. E. Geraghty, H. T. Orr, J. L. Strominger, and T. Spies. (1987). Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8535-85359.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Castellino, A.M., Parker, G.J., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., and Chao, M.V. (1997). A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and Phosphatidylinositol-4-phosphate-5-Kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 5861-5870.
- Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. *Immunity* 7, 821-830.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.-L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., and Dixit, V.M. (1996a). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.
- Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996b). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 4961-4965.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.L., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H., and Ballard, D.W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10057-10062.
- Cohen L., Henzel W.J., and Baeuerle P.A. (1998). IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395, 292-296.
- Cuenda A., Rouse J., Doza Y.N., Meier R., Cohen P., Gallagher T.F., Young P.R., Lee J.C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364(2), 229-233.
- Darnay B.G., Haridas V., Ni J., Moore P.A., Aggarwal B.B. (1998) Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 273(32):20551-20555.

- Decoster E., Vanhaesebroeck B., Boone E., Plaisance S., De Vos K., Haegeman G., Grooten J., Fiers W. (1998). Induction of unresponsiveness to tumor necrosis factor (TNF) after autocrine TNF expression requires TNF membrane retention. *J. Biol. Chem.* 273(6), 3271-3277.
- Decoster E., Vanhaesebroeck B., Vandenameele P., Grooten J., and Fiers W. (1995). Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 270(31), 18473-18478.
- Del Prete, G., M. De Carli, M. M. D'Elia, I. M. Fleckenstein, H. Fickenscher, B. Fleckenstein, F. Almerigogna, and S. Romagnani. (1994) Polyclonal B cell activation induced by herpesvirus saimiri-transformed human CD4+ T cell clones. Role for membrane TNF-alpha/TNF-alpha receptors and CD2/CD58 interactions. *J. Immunol.* 153, 4872-4879.
- Delhase M., Hayakawa M., Chen Y., and Karin M. (1999). Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284, 309-313.
- Derijard B., Raingeaud J., Barrett T., Wu I.H., Han J., Ulevitch R.J., and Davis R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.
- Dethlefsen S.M., Raab G., Moses M.A., Adam R.M., Klagsbrun M., and Freeman M.R. (1998). Extracellular calcium influx stimulates metalloproteinase cleavage and secretion of heparin-binding EGF-like growth factor independently of protein kinase C. *J. Cell. Biochem.* 69(2), 143-153.
- Devereaux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.
- DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., 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.
- Du W., Thanos D., and Maniatis T. (1993). Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74(5), 887-898.
- Duan, H., and Dixit, V.M. (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385, 86-89.
- Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M., and Thompson, C.B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus *iap* gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15, 2685-2694.
- Eck, M. J., B. Beutler, G. Kuo, J. P. Merryweather, and S. R. Sprang. (1988) Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin). *J. Biol. Chem.* 263, 12816-1289.
- 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.
- Eigler, A., B. Sinha, G. Hartmann, and S. Endres. (1997) Taming TNF - strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol. Today* 18, 487-492.
- Enari, M., Hug, H., and Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375, 78-81.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W., and Nagata, S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380, 723-726.
- Engelmann H., Aderka D., Rubinstein M., Rotman D., and Wallach D. (1989). A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* 264(20), 11974-11980.
- Engelmann, H., Holtmann, H., Brakebusch, C., Avni, S.Y., Sarov, I., Nophar, Y., Hadas, E., Leitner, O., and Wallach, D. (1990). Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF like activity. *J. Biol. Chem.* 265, 14497-14504.
- Force, W.R., Cheung, T.C., and Ware, C.F. (1997). Dominant negative mutants of TRAF3 reveal an important role for the coiled coil domains in cell death signaling by the lymphotoxin-beta receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 30835-30840.
- Fraker P.J. and Speck J.C. Jr. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 80(4), 849-857.
- Fuchs, P., S. Strehl, M. Dworzak, A. Himmler, and P. F. Ambros. (1992). Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13. *Genomics* 13, 219-24.
- Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., and Dougall, W.C. (1998). The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* 273, 34120-34127.
- Giri D.K. and Aggarwal B.B. (1998). Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.* 273(22), 14008-14014.
- Goltsev, I.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M., and Wallach, D. (1997). CASH a novel caspase homologue with death effector domains. *J. Biol. Chem.* 272, 19641-19644.
- Goodwin, R. G., D. Anderson, R. Jerzy, T. Davis, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and C. A. Smith. (1991). Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Molecular & Cellular Biology* 11, 3020-6.
- Grell M., Zimmermann G., Gottfried E., Chen C.M., Grunwald U., Huang D.C., Lee Y.H., Durkop H., Engelmann H., Scheurich P., Wajant H., Strasser A. (1999) Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 18(11), 3034-3043.
- Grell, M., and Clauss, M. (1999). TNF and TNFR superfamily. *Int. Func. Res.*, in Press.
- Grell, M., and Scheurich, P. (1997). Tumor necrosis factor. In „Growth factors and cytokines in health and disease“, Vol. 2B., *JAI Press Inc.*, pp. 669-726.
- Grell, M., Becke, F.M., Wajant, H., Männel, D.N., and Scheurich, P. (1998a). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur. J. Immunol.* 28, 257-263.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., 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., G. Zimmermann, D. Hülser, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. (1994b). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J. Immunol.* 153, 1963-72.
- Grell, M., Scheurich, P., Meager, A., and Pfizenmaier, K. (1993). TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytolysis. *Lymphokine Cytokine Res.* 12, 143-148.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. (1998b). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 570-575.
- Grell, M., Zimmermann, G., Hülser, D., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (1994a). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J. Immunol.* 153, 1963-1972.
- Grimm, S., Stanger, B.Z., and Leder, P. (1996). RIP and FADD: Two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10923-10927.
- Gullberg U., Lantz M., Lindvall L., Olsson I., and Himmler A. (1992). Involvement of an Asn/Val cleavage site in the production of a soluble form of a human tumor necrosis factor (TNF) receptor. Site-directed mutagenesis of a putative cleavage site in the p55 TNF receptor chain. *Eur. J. Cell Biol.* 58(2), 307-312.
- Han, D.K., Chaudhary, P.M., Wright, M.E., Friedman, C., Trask., B.J., Riedel, R.T., Baskin, D.G., Schwartz, S.M., and Hood, L. (1997). MRIT a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11333-11338.
- Hawkins, C. J., A. G. Uren, G. Hacker, R. L. Medcalf, and D. L. Vaux. (1996). Inhibition of interleukin 1-beta-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13786-13790.

- Heller, R. A., K. Song, M. A. Onasch, W. H. Fischer, D. Chang, and G. M. Ringold. (1990). Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6151-6155.
- Heller, R.A., and Krönke, M. (1994). Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell. Biol.* 126, 5-9
- Heller, R.A., Song, K., Fan, N., and Chang, D.J. (1992). The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* 70, 47-56.
- Henkart P.A. (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* 4(3):195-201.
- Hess, S., and Engelmann, H. (1996). A novel function of CD40: Induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* 183, 159-167.
- Higuchi M. and Aggarwal B.B. (1994). TNF induces internalization of p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J. Immunol.* 152, 3550-3558.
- Higuchi M., Higashi N., Taki H., and Osawa T. (1990). Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* 144, 1425-1431.
- Himmler, A., I. Maurer-Fogy, M. Krönke, P. Scheurich, K. Pfizenmaier, M. Lantz, I. Olsson, R. Hauptmann, C. Stratowa, and G. R. Adolf. (1990). Molecular cloning and expression of human and rat tumor necrosis factor receptor chain (p60) and its soluble derivative, tumor necrosis factor-binding protein. *DNA & Cell Biology* 9, 705-715.
- Hsu H.L., Solovyev I., Colombero A., Elliott R., Kelley M., Boyle W.J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J. Biol. Chem.* 272, 13471-13474.
- Hsu HL, Solovyev I, Colombero A, Elliott R, Kelley M, Boyle WJ (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J. Biol. Chem.* 272: 13471-13474.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.
- Hsu, H.L., Huang, J.N., Shu, H.B., Baichwal, V., and Goeddel, D.V. (1996b). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.
- Hsu, H.L., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V. (1996a). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
- Hu Y., Baud V., Delhase M., Zhang P., Deerinck T., Ellisman M., Johnson R., and Karin M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkkappaB kinase. *Science* 284, 316-320.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17255-17257.
- Huovila A.P.J., Almeida E.A., and White J.M. (1996). ADAMs and cell fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8(5), 692-699.
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, Tendijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, and Gotoh Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.
- Ichijo H., Nishida E., Irie K., ten Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K., and Gotoh Y (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Nunez, G. (1997). Clarp, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10717-10722.
- Irmmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., and Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Ishida, T., Mizushima, S.-I., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T., and Inoue, J.-I. (1996b). Identification of TRAF6, a novel tumor

- necrosis factor receptor-associated factor that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* 271, 28745-28748.
- Ishida, T., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., and Inoue, J.-I. (1996a). TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9437-9442.
- 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.
- Jäättelä, M., Mouritzen, H., Elling, F., and Bastholm, L. (1996). A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J. Immunol.* 156, 1166-1173.
- Jäättelä, M., Wissing, D., Bauer, P.A., and Li, G.C. (1992). Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.* 11, 3507-3512.
- Janicke R.U., Sprengart M.L., Wati M.R., Porter A.G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273(16), 9357-60
- Jiang Y., Woronicz J.D., Liu W., Goeddel D.V. (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
- Jones S.J., Ledgerwood E.C., Prins J.B., Galbraith J., Johnson D.R., Pober J.S., Bradley J.R. (1999) TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J. Immunol.* 1999 162(2),1042-1048.
- Jones, E.Y., Stuart, D.I., and Walker N.P.C. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338, 225-228.
- Kahn J., Walcheck B., Migaki G.I., Jutila M.A., and Kishimoto T.K. (1998). Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 92(6), 809-818.
- Karin M., Liu Zg., and Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9(2), 240-6
- Karpusas, M., Hsu, Y.M., Wang, J.H., 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.
- Kaszubska W., Hooft van Huijsduijnen R., Ghersa P., DeRaemy-Schenk A.M., Chen B.P., Hai T., DeLamarter J.F., and Whelan J. (1993). Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF-kappa B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol. Cell. Biol.* 13(11), 7180-7190
- Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis, and G. Kollias. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10, 4025-4031.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., and Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* 8, 297-303.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P., and Peter, M. (1995). Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588.
- Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.-P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.-T., Grinham, C.J., Brown, R., and Farrow, S.N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.
- Krause A., Holtmann H., Eickemeier S., Winzen R., Szamel M., Resch K., Saklatvala J., and Kracht M. (1998). Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J. Biol. Chem.* 273(37), 23681-23689.
- Kriegler M., Perez C., Defay K., Albert T., and Lu S.D. (1988). A novel form TNF-cachectin in a cell-surface cytotoxic transmembrane protein. Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45-53.
- Krikos, A., Laherty, C.D., and Dixit, V.M. (1992). Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements.

J. Biol. Chem. 267, 17971-17976.

- Kumar, S., and Baglioni, C. (1991). Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by overexpression of plasminogen activator inhibitor type-2. *J. Biol. Chem.* 266, 20960-20964.
- Küstners S., Tiegs G., Alexopoulou L., Pasparakis M., Douni E., Kunstle G., Bluethmann H., Wendel A., Pfizenmaier K., Kollias G., and Grell M. (1997). In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur. J. Immunol.* 27(11), 2870-2875.
- Lawton, P., J. Nelson, R. Tizard, and J. L. Browning. (1995) Characterization of the mouse lymphotoxin-beta gene. *J. Immunol.* 154, 239-246.
- Lee F.S., Peters R.T., Dang L.C., Maniatis T. (1998). MEKK1 activates both I κ B kinase alpha and I κ B kinase beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(16):9319-9324.
- Lee, S.Y., and Choi, Y. (1997b). TRAF interacting protein (TRIP): A novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)- and CD30 TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF- κ B activation. *J. Exp. Med.* 185, 1275-1283.
- Lee, S.Y., Kandala, G., Liou, M.-L., Liou, H.-C., and Choi, Y. (1996b). CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF- κ B activation and binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9699-9703.
- Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C., and Choi, Y. (1997a). TRAF2 is essential for JNK but not NF- κ B activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7, 703-713.
- Li H. and Yuan J. (1999) Deciphering the pathways of life and death *Curr Opin Cell Biol* 11(2), 261-266
- Libermann T.A., Baltimore D. (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 10(5):2327-2334.
- Lindemann, A., Riedel, D., Oster, W., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Mertelsmann, R., and Herrmann, F. (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 83, 1308-1312.
- Ling L., Cao Z., and Goeddel D.V. (1998) NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(7), 3792-3797.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.-E., MacKenzie, A., and Korneluk, R.G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379, 349-353.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of Caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Liu, Z.-G., Hsu, H., Goeddel, D.V., 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.
- Loetscher H., Pan Y. C., Lahm H.W., Grentz R., Brockhaus M., Tabuchi H., and Lesslauer W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61: 351-359.
- Loetscher, H., R. Gentz, M. Zulauf, A. Lustig, H. Tabuchi, E. J. Schlaeger, M. Brockhaus, H. Gallati, M. Manneberg, and W. Lesslauer. (1991). Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity. *J. Biol. Chem.* 266, 18324-18329.
- Luettig, B., T. Decker, and M. L. Lohmann-Matthes. (1989) Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J. Immunol.* 143: 4034-4038.
- Lum L., Wong B.R., Josien R., Becherer J.D., Erdjument-Bromage H., Schlondorff J., Tempst P., Choi Y, Blobel C.P. (1999) Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* 274(19), 13613-13618.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G.M., and Alnemri, E.S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 272, 25417-25420.

- Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V., 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 κ B kinase complex. *Science* 278, 818-819.
- Männel, D.N., Moore, R.N., and Mergenhagen, S.E. (1990). Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect. Imm.* 30, 523-530.
- Marino, M. W., A. Dunn, D. Grail, M. Inglese, Y. Noguchi, E. Richards, A. Jungbluth, H. Wada, M. Moore, B. Williamson, S. Basu, and L. J. Old. (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8093-8098.
- Marsters, S. A., J. P. Sheridan, C. J. Donahue, R. M. Pitti, C. L. Gray, A. D. Goddard, K. D. Bauer, and A. Ashkenazi. 1996. Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa-B. *Current Biology* 6, 1669-16676.
- Marsters, S.A., Ayres, T.M., Skubatch, M., Gray, C.L., Rothe, M., and Ashkenazi, A. (1997b). 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, S.A., Pitti, R.M., Donahue, C.J., Ruppert, S., Bauer, K.D., 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, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D., 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, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997a). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 7, 1003-1006.
- Maskos K., Fernandez-Catalan C., Huber R., Bourenkov G.P., Bartunik H., Ellestad G.A., Reddy P., Wolfson M.F., Rauch C.T., Castner B.J., Davis R., Clarke H.R., Petersen M., Fitzner J.N., Cerretti D.P., March C.J., Paxton R.J., Black R.A., and Bode W. (1998). Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(7), 3408-3412.
- McDermott M.F., Aksentijevich I., Galon J., McDermott E.M., Ogunkolade B.W., Centola M., Mansfield E., Gadina M., Karenko L., Pettersson T., McCarthy J., Frucht D.M., Aringer M., Torosyan Y., Teppo A.M., Wilson M., Karaarslan H.M., Wan Y., Todd I., Wood G., Schlimgen R., Kumarajeewa T.R., Cooper S.M., Vella J.P., Kastner D.L., et al. (1999). Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97(1), 133-144.
- Meager A. (1989). A cytotoxicity assay for tumour necrosis factor using a human rhabdomyosarcoma cell line. *J. Immunol. Methods* 116(1), 1-17.
- Medvedev, A.E., Sundan, A., and Espevik, T. (1994). Involvement of the tumor necrosis factor receptor p75 in mediating cytotoxicity and gene regulating activities. *Eur. J. Immunol.* 24, 2842-2849.
- Mehlen, P., Mehlen, A., Guillet, D., Preville, X., and Arrigo, A.P. (1995). Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J. Cell. Biochem.* 58, 248-259.
- Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., and Arrigo, A.P. (1996). Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 16510-16514.
- Mercurio F., Zhu H., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Li J., Young D.B., Barbosa M., Mann M., Manning A., and Rao A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278, 860-866.
- Merlos-Suarez A., Fernandez-Larrea J., Reddy P., Baselga J., Arribas J. (1998) Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *J. Biol. Chem.* 273(38), 24955-24962.

- Miller W.E., Cheshire J.L., and Raab-Traub N. (1998). Interaction of tumor necrosis factor receptor-associated factor signaling proteins with the latent membrane protein 1 PXQXT motif is essential for induction of epidermal growth factor receptor expression. *Mol. Cell. Biol.* 18(5), 2835-2844.
- Miura, M., Friedlander, R.M., and Yuan, J.Y. (1995). Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8318-8322.
- Miyazawa K., Mori A., Miyata H., Akahane M., Ajsawa Y., Okudaira H. (1998). Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 24832-2438.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., and Pahel, G. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385, 733-736.
- Müllberg, J., F. H. Durie, C. Otten-Evans, M. R. Alderson, S. Rose-John, D. Cosman, R. A. Black, and K. M. Mohler. (1995). A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J. Immunol.* 155, 5198-5205.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peters, M.E., and Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The fas death factor. *Nature* 267, 1449-1456.
- Nakano H., Shindo M., Sakon S., Nishinaka S., Mihara M., Yagita H., and Okumura K. (1998). Differential regulation of I κ B kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(7), 3537-3542.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C., and Levrero, M. (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a nontoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* 275, 200-203.
- Nedwin G.E., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Smith D. Jarett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D.V., and Gray P. (1985). Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure homology and chromosomal location. *Nucleic Acids. Res.* 13, 6361-6373.
- Nishitoh H., Saitoh M., Mochida Y., Takeda K., Nakano H., Rothe M., Miyazono K., Ichijo H. (1998). ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell.* 2(3), 389-395.
- Nophar, Y., O. Kemper, C. Brakebusch, H. Englemann, R. Zwang, D. Aderka, H. Holtmann, and D. Wallach. (1990). Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J.* 9, 3269-3278.
- Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wadai, T., Okurai, I., Weii, C.-F., Chang, H.-M., and Yeh, E.T.H. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, Sentrin. *J. Immunol.* 157, 4277-4281.
- Opiari, A.W. Jr., Hu, H.M., Yabkowitz, R., and Dixit, V.M. (1992). The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 267, 12424-12427.
- Pan D. and Rubin G.M. (1997). Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90(2), 271-280.
- Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J, Dixit VM. (1998) Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 431(3), 351-356.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.-F., Yu, G.-L., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997b). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V.M. (1997a). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

- Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Seeburg P.H., Derynck R., Palladino M.A., Kohr W.J.A., Aggarwal B.B., and Goeddel D.V. (1984). Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.
- 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.
- Peschon J.J., Slack J.L., Reddy P., Stocking K.L., Sunnarborg S.W., Lee D.C., Russell W.E., Castner B.J., Johnson R.S., Fitzner J.N., Boyce R.W., Nelson N., Kozlosky C.J., Wolfson M.F., Rauch C.T., Cerretti D.P., Paxton R.J., March C.J., Black R.A. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281-1284.
- Pimentel-Muinos F.X., Mazana J., Fresno M. (1994). Regulation of interleukin-2 receptor alpha chain expression and nuclear factor.kappa B activation by protein kinase C in T lymphocytes. Autocrine role of tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* 269(39), 24424-24429.
- Porteu F. and Hieblot C. (1994). Tumor necrosis factor induces selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 4, 2834-2840.
- Pytel, B.A., Peppel, K., and Baglioni, C. (1990). Plasminogen activator type-2 is a major protein induced in human fibroblasts and SK-MEL-109 melanoma cells by tumor necrosis factor. *J. Cell. Physiol.* 144, 416-422.
- Raingaud J., Whitmarsh A.J., Barrett T., Derijard B., and Davis R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16(3), 1247-1255.
- Rasper, D. M., J. P. Vaillancourt, S. Hadano, V. M. Houtzager, I. Seiden, S. L. C. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B. F. Koop, E. P. Peterson, N. A. Thornberry, J. Q. Huang, D. P. MacPherson, S. C. Black, F. Hornung, M. J. Lenardo, M. R. Hayden, S. Roy, and D. W. Nicholson. (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death and Differentiation* 5, 271-288.
- Regnier C.H., Song H.Y., Gao X., Goeddel D.V., Cao Z., and Rothe M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90(2), 373-383.
- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V., and Williams, L.T. (1997). Tumor necrosis factor α -induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J.* 16, 1080-1092
- Relaix F., Wei X.J., Wu X.W., and Sassoon D.A. (1998). Peg3/pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NF-kappa-B signal transduction pathway. *Nat. Genet.* 18, 287-291.
- Rosendahl, M. S., S. C. Ko, D. L. Long, M. T. Brewer, B. Rosenzweig, E. Hedl, L. Anderson, S. M. Pyle, J. Moreland, M. A. Meyers, T. Kohno, D. Lyons, and H. S. Lichenstein. (1997) Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor- alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 272, 24588-24593.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Löttscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Köntgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., and Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumor necrosis factor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 364, 798-802.
- Rothe, M., Pan, M.-G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., and Goeddel, D.V. (1995b). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.W., and Goeddel, D.V. (1995a). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269, 1424-1427.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., and Goeddel, D.V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.
- Rothe, M., Xiong, J., Shu, H.B., Williamson, K., Goddard, A., and Goeddel, D.V. (1996). I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8241-8246.

- Rothwarf D.M., Zandi E., Natoli G., and Karin M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkkappaB kinase complex. *Nature* 395, 297-300.
- Roulston A., Reinhard C., Amiri P., and Williams L.T. (1998). Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* 273(17), 10232-10329.
- Rouse J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A., Zamanillo D., Hunt T., and Nebreda A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78(6), 1027-1037.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-25.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Sanz L., Sanchez P., Lallena M.J., Diaz-Meco M.T., and Moscat J. (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J.* 18(11), 3044-3053.
- Sato, N., Goto, T., Haranaka, K., Satomi, N., Nariuchi, H., Mano-Hirano, Y., and Sawasaki, Y. (1986). Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition and cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 1113-1121.
- Schall, T. J., M. Lewis, K. J. Koller, A. Lee, G. C. Rice, G. H. Wong, T. Gatanaga, G. A. Granger, R. Lentz, H. Raab. et al. (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61, 361-370.
- Scheurich P., Ucer U., Krönke M., and Pfizenmaier K. (1986). Quantification and characterization of high-affinity membrane receptors for tumor necrosis factor on human leukemic cell lines. *Int. J. Cancer* 38(1), 127-133
- Schievella, A.R., Chen, J.H., Graham, J.R., and Lin, L.-L. (1997) MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 12069-12074.
- Schmid E.F., Binder K., Grell M., Scheurich P., Pfizenmaier K. (1995). Both tumor necrosis factor receptors, TNFR60 and TNFR80, are involved in signaling endothelial tissue factor expression by juxtacrine tumor necrosis factor alpha. *Blood* 86(5), 1836-1841.
- 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 NFkB. *Immunity* 7, 831-836.
- Schütze, S., D. Berkovic, O. Tomsing, C. Unger, and M. Krönke. (1991) Tumor necrosis factor induces rapid production of 1'2'diacylglycerol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J. Exp. Med.* 174: 975-988.
- Schütze, S., T. Machleidt, and M. Krönke. (1994) The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J. Leukocyte Biol.* 56: 533-541.
- Schwandner, R., K. Wiegmann, K. Bernardo, D. Kreder, and M. Krönke. (1998) TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem* 273, 5916-5922.
- Schwenzer R., Siemiński K., Liptay S., Schubert G., Peters N., Scheurich P., Schmid R., and Wajant H. (1999). The human Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-associated Factor 1 Gene (TRAF1) is upregulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-jun N-terminal kinase. accepted by *J. Biol. Chem.*
- Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.-N., Cowper, A.E., McMichael, A.J., and Bell, J.I. (1997b). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol.* 7, 693-696.
- Screaton, G.R., Xu, X.-N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A., and Bell, J.I. (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, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.
- Shi, C.-S. and Kehrl, J.H. (1997). Activation of Stress-Activated Protein Kinase/ c-Jun N-Terminal Kinase, but not NF κ B, 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.
- Shu, H.B., Halpin, D.R., and Goeddel, D.V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-763.
- Shu, H.-B., Takeuchi, M., and Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor 1 signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13973-13978.
- Siemienski K. (1998). Molekulare Mechanismen der Kooperation der beiden Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptoren. Shaker Verlag, Aachen. Dissertation Universität Stuttgart, D93.
- Smith, C. A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M. P. Beckmann, R. Jerzy, S. K. Dower, D. Cosman, and R. G. Goodwin. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-1023.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Smith, R.A., and Baglioni, C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* 262, 6951-6954.
- Solorzano C.C. Ksontini R., Pruitt J.H., Hess P.J., Edwards P.D., Kaibara A., Abouhamze A., Auffenberg T., Galardy R.E., Vauthey J.N., Copeland E.M., Edwards C.K., Lauwers G.Y., Clare-Salzler M., MacKay S.L., Moldawer L.L., Lazarus D.D. (1997). Involvement of 26-kDa cell-associated TNF-alpha in experimental hepatitis and exacerbation of liver injury with a matrix metalloproteinase inhibitor. *J. Immunol.* 158(1), 414-419.
- Song, H.Y., Dunbar, J.D., and Donner, D.B. (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, H.Y., Régnier, C.H., Kirschning, C.J., Goeddel, D.V., and Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9792-9796.
- Song, H.Y., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996a). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappa B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6721-6725.
- Speiser, D.E., Lee, S.Y., Wong, B., Arron, J., Santana, A., Kong, Y.-Y., Ohashi, P.S., and Choi, Y. (1997). A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells. *J. Exp. Med.* 185, 1777-1783.
- Spies, T., G. Blanck, M. Bresnahan, J. Sands, and J. L. Strominger. (1989). A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243: 214-217.
- Srinivasula, S.M., Ahamad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C., and Alnemri, E.S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 18542-18545.
- Stancovski, I., and Baltimore, D. (1997). NF- κ B activation: The I κ B kinase revealed? *Cell* 91, 299-302.
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., 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.
- Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A. Jr., and Shepard, H.M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* 230, 943-945.
- Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1996). Anatomy of TRAF2. *J. Biol. Chem.* 271, 19935-19942.

- Tanaka M., Fuentes M.E., Yamaguchi K., Durnin M.H., Dalrymple S.A., Hardy K.L., and Goeddel D.V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* 10(4), 421-429.
- Tanaka M., Itai T., Adachi M., and Nagata S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* 4(1), 31-36.
- Tang P., Hung M-C., Klostergaard J. (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35(25), 8216-8225.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W., and Goeddel, D.V. (1993a). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.
- Tartaglia, L.A., Goeddel, D.V., Reynolds, C., Figari, I.S., Weber, R.F., Fendly, B.M., and Pallandino, M.A. Jr. (1993b). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Immunol.* 151, 4637-4641.
- Tartaglia, L.A., Pennica, D., and Goeddel, D.V. (1993c). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 18542-18548.
- Tartaglia, L.A., Weber, R.F., Figari, I.S., Reynolds, C., Pallandino, M.A. Jr., and Goeddel, D.V. (1991). The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9292-9296.
- Testi, R. (1996). Sphingomyelin-breakdown and cell fate. *TIBS* 21, 468-471.
- Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 270, 3255-3260.
- Thoma B., Grell M., Pfizenmaier K., and Scheurich P. (1990) Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *J. Exp. Med.* 172: 1019-1023
- 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.
- Van Ostade, X., J. Tavernier, T. Prange, and W. Fiers. (1991). Localization of the active site of human tumour necrosis factor (hTNF) by mutational analysis. *EMBO J.* 10: 827-836.
- VanAntwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappa B. *Science* 274, 787-789.
- VanArsdale, T.L., VanArsdale, S.L., Force, W.R., Walter, B.N., Mosialos, G., Kieff, E., Reed, J.C., and Ware, C.F. (1997). Lymphotoxin- β receptor signaling complex: Role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2460-2465.
- Vanden Berghe W., Plaisance S., Boone E., De Bosscher K., Schmitz M.L., 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.
- Vandenabeele, P., W. Declercq, R. Beyaert, and W. Fiers. (1995) Two tumour necrosis factor receptors: Structure and function. *Trends in Cell Biology* 5, 329-399.
- Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 411-452.
- Vaux, D. L., and A. Strasser. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2239-2244.
- Vercammen, D., Vandenabeele, P., Declercq, W., Van de Craen, M., Grooten, J., and Fiers, W. (1995). Cytotoxicity in L929 murine fibrosarcoma cells after triggering of transfected human p75 tumour necrosis factor (TNF) receptor is mediated by endogenous murine TNF. *Cytokine* 7, 463-470.
- Wajant, H., Grell, M. and Scheurich, P. (1999) TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine and growth factors review.*

- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., and Rauch C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16, 5386-5397.
- Wallach D., Holtmann H., Engelmann H., and Nophar Y. (1988). Sensitization and desensitization to lethal effects of tumor necrosis factor and IL-1. *J. Immunol.* 140(9), 2994-2999.
- Wang C.Y., Mayo M.W., Korneluk R.G., Goeddel D.V., Baldwin A.S. Jr. (1998a) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang D. and Baldwin A.S. Jr. (1998b). Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J. Biol. Chem.* 273(45), 29411-29416.
- Wang, A. M., A. A. Creasey, M. B. Ladner, L. S. Lin, J. Strickler, J. N. Van Arsdell, R. Yamamoto, and D. F. Mark. (1985) Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228, 149-154.
- Wang, B., S. Kondo, G. M. Shivji, H. Fujisawa, T. W. Mak, and D. N. Sauder. (1996b). Tumour necrosis factor receptor 2 (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology* 88, 284-288.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF-kappa B. *Science* 274, 784-787.
- Watts A.D., Hunt N.H., Wanigasekara Y., Bloomfield G., Wallach D., Roufogalis B.D., Chaudhri G.A. (1999). Casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J.* 18(8), 2119-26
- Weiss T., Grell M., Siemienski K., Muhlenbeck F., Durkop H., Pfizenmaier K., Scheurich, P., and Wajant H. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60 (1998). *J. Immunol.* 161(6), 3136-3142.
- Wei, T. Kooperation der beiden Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren bei der Induktion zytotoxischer Effekte. (1997). *Shaker Verlag, Aachen* Dissertation Universität Stuttgart, D93
- Wei, T., Grell, M., Hessabi, B., Bourteele, S., Mller, G., Scheurich, P., and Wajant, H. (1997). Enhancement of TNFR60-mediated cytotoxicity by TNFR80 - Requirement of the TRAF2 binding site. *J. Immunol.* 158, 2398-2404.
- Wen C., Metzstein M.M., and Greenwald I. (1997). SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* 124(23), 4759-4767.
- Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D., and Krönke, M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78, 1005-1015.
- Wolfsberg T.G. and White J.M. (1996). ADAMs in fertilization and development. *Dev. Biol.* 180, 389-401.
- Wolfsberg T.G., Primakoff P., Myles D.G., White J.M. (1995). ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell. Biol.* 131(2), 275-278.
- Wolfsberg T.G., Straight P.D., Gerena R.L., Huovila A.P., Primakoff P., Myles D.G., and White J.M. (1995). ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev. Biol.* 169(1), 378-383.
- Wong G.H., Tartaglia L.A., Lee M.S., Goeddel D.V. (1992) Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type I TNF receptor. *J. Immunol.* 149(10), 3350-3353.
- Wong, G.H.W., and Goeddel, D.V. (1988). Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242, 941-944.
- Wong, G.H.W., Elwell, J.H., Oberley, L.W., and Goeddel, D.V. (1989). Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58, 923-931.
- Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., and Goeddel, D.V. (1997). κ B Kinase- β : NF κ B activation and complex formation with I κ B Kinase- α and NIK. *Nature* 278, 866-869.

- Wu, M., Lee, H., Bellas, R.E., Schauer, S.L., Arsura, M., Katz, D., FitzGerald, M.J., Rothstein, T.L., Sherr, D.H., and Sonenshein, G.E. (1996). Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* 15, 4682-4690.
- Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S.T., Weil R., Agou F., Kirk H.E., Kay R.J., and Israel A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93(7), 1231-1240.
- Yao Z., Zhou G., Wang X.S., Brown A., Diener K., Gan H., and Tan T.H. (1999). A novel human STE20-related protein kinase, HGK, that specifically activates the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274(4), 2118-2125.
- Yeh, W. C., A. Shahinian, D. Speiser, J. Kraunus, F. Billia, A. Wakeham, J. L. de la Pompa, D. Ferrick, B. Hum, N. Iscove, P. Ohashi, M. Rothe, D. V. Goeddel, and T. W. Mak. (1997). Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715-25.
- Yeh, W-C., de la Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.-B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V., and Mak, T. (1998). FADD: Essential for embryo development and signaling in some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954-1958.
- Yuasa T., Ohno S., Kehrl J.H., and Kyriakis J.M. (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), 22681-22689.
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakawa M., and Karin M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91(2), 243-252.
- Zechner D, Craig R, Hanford DS, McDonough PM, Sabbadini RA, Glembotski CC. (1998). MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 273(14), 8232-8239.
- Zhang X.P., Kamata T., Yokoyama K., Puzon-McLaughlin W., and Takada Y. (1998). Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3. *J. Biol. Chem.* 273(13), 7345-7350.
- Zhang, J., D. Cado, A. Chen, N. H. Kabra, and A. Winoto. (1998) Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H., and Lenardo, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.
- Zhong H., Voll R.E., and Ghosh S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* 1(5), 661-671.

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Publikationen:

Haas E., Grell M., Wajant H., and Scheurich P. (1999). Continuous autotropic signaling by membrane-expressed tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 274(25), 18107-18112

Posterpräsentationen:

Haas, E., Grell, M., Wajant, H., Scheurich, P.
Cellular suicide: Autotropic signaling via TNF-R1.
29 Annual Meeting of the German Society of Immunology in Freiburg,
September, 23-26, 1998.

daneben wurden verwandte Themen bearbeitet und wie folgt veröffentlicht:

Mühlenbeck, F., Haas, E., Schwenzler, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P., and Wajant, H. (1998). TRAIL/Apo2L activates c-jun NH₂-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 273 (49), 33091-33098.

Schneider, P., Schwenzler, R., Haas, E., Mühlenbeck, F., Schubert, G., Scheurich, P., Tschopp, J., and Wajant, H. (1999). TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF-R1. accepted by *Eur. J. Biochem.* 29, 1785-1792.

Wajant, H., Johannes, F.-J., Haas E., Siemiemiski, K., Schwenzler, R., Schubert, G., Weiss, T., Grell, M., and Scheurich, P., (1998). Dominant-negative FADD inhibits TNF-R60-, Fas/Apo1- and TRAIL-R/Apo2-mediated cell death but not gene induction. *Current Biology* 8: 113-116.

Johannes, F.-J., Horn, J., Link, G., Haas, E., Siemienski K., Wajant, H., and Pfizenmaier K. (1998). Protein kinase μ downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor κ B-dependent protective genes. *Eur. J. Biochem.* 257, 47-54.

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

Stuttgart, den 24. Juni 1999

Herzlichen Dank!

.....an Peter Scheurich, Matthias Grell, Harald Wajant und Klaus Pfizenmaier für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und Ideen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

.....an die Angehörigen der Arbeitsgruppe Scheurich, insbesondere Ralph und Gudrun, für die freundliche Atmosphäre und die Mithilfe bei der Bewältigung der Unwegsamkeiten im Laboralltag.

.....an Frank für die Unterstützung bei computertechnischen Fragen.

.....an Matthias Grell als immer hilfsbereiter Ansprechpartner.

.....an Angelika, Ralph und Ines für das Korrekturlesen.

.....für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit ganz besonders an Peter Scheurich.

.....für die Motivation und Geduld an Christoph.

.....für die Unterstützung meiner Familie.

Diese Arbeit wurde gefördert durch Mittel der Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sche 349/5-1) und der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg.