

# **Molekulare Mechanismen der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-1 (TNF-R1)-vermittelten Apoptose**

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

vorgelegt von

Monika Weingärtner

aus München

Hauptberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Mitberichter: PD Dr. Harald Wajant

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2002

Institut für Zellbiologie und Immunologie der  
Universität Stuttgart

Oktober 2002

DANKE sagen möchte ich...

...Prof. Dr. Peter Scheurich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie sein stets offenes Ohr für große und kleine Probleme im Laboralltag.

...PD Dr. Harald Wajant für die ausdauernde Motivation zur Produktion guter Ergebnisse und die geduldige Beantwortung wissenschaftlicher Fragen.

...der gesamten AG Wajant für die kollegiale und nette Zusammenarbeit im Labor.

...Nathalie und Gudrun für die Hilfe in großen wie in kleinen Dingen.

...der AG Müller, die mich und mein Chaos in ihrem Labor aufgenommen hat, sowie für die vielen netten Diskussionen über die Wissenschaft und vieles mehr.

...meinem „Mentor“ Frank Mühlenbeck, der mir die Eingewöhnung im IZI durch viele gute und nützliche Ratschläge, sowie durch sein stets lustiges Wesen sehr leicht gemacht hat.

...Claudia für die Verbesserung meiner Englischkenntnisse

...Angelika für viele hilfreiche Ratschläge, sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit

...Anja, Lara und Frank für nette Kaffeepausen

...Claudia, Dafne, Melanie und Constance für die gute Freundschaft und Hilfe in allen Lebenslagen.

...meinen Eltern, sowie Gaby und Michi, die immer ein offenes Ohr und so manche Lösungen für alle meine Freuden und Sorgen hatten.

...ganz besonders meinem Mann Kai, der mir während der Promotion sehr geholfen hat durchzuhalten und die gute Laune nicht zu verlieren.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>4</b>
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>3. EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Die TNF-Ligandenfamilie und ihre Rezeptoren</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 TNF-induzierte Signalwege</b> .....	<b>11</b>
3.2.1 NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Apoptose-Induktion durch TNF .....	12
3.2.1.1 TNF-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	12
3.2.1.2 TNF-R1-vermittelte Apoptose.....	13
3.2.1.3 TNF-R2-vermittelte Apoptose.....	16
3.2.2 Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) durch TNF .....	18
3.2.2.1 Allgemeines über JNK.....	18
3.2.2.2 Die TNF-vermittelte JNK-Aktivierung .....	18
<b>3.3 TRAIL und FasL</b> .....	<b>20</b>
3.3.1 Grundlagen .....	20
3.3.2 Aktivierung der JNK durch TRAIL und FasL .....	21
<b>3.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>22</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Reagenzien</b> .....	<b>23</b>
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	23
4.1.2 Puffer und Lösungen.....	24
4.1.3 Antikörper und Antikörperkonstrukte .....	26
4.1.4 Expressionsvektoren.....	27
4.1.5 Zell-Linien .....	27
<b>4.2 Experimentalmethoden</b> .....	<b>28</b>
4.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	28
4.2.2 Einsatz von TRAIL, FasL und TWEAK.....	28

---

4.2.3	Zytotoxizitäts-Assays .....	29
4.2.4	Western-Blot-Analyse .....	29
4.2.4.1	Anzucht und Lyse der Zellen.....	29
4.2.4.2	Proteinbestimmung .....	29
4.2.4.3	SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf Nitrozellulose .....	30
4.2.4.4	Nachweis definierter Proteine durch Immunofärbung .....	30
4.2.5	RNase Protection Assay (RPA).....	31
4.2.5.1	Stimulation der Zellen und Isolierung der RNA .....	31
4.2.5.2	Durchführung des RPA .....	31
4.2.6	„pH 3-Wash“ zur Lösung der Liganden-Rezeptor Interaktion.....	32
4.2.7	ELISA.....	33
4.2.7.1	Nachweis von TNF .....	33
4.2.8	FACS-Analyse.....	34
4.2.9	JNK-Assay .....	34
4.2.10	Transienter Reporter-gen-Assay zur Bestimmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ...	35
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Blockierung der NF-<math>\kappa</math>B-Aktivierung inhibiert TNF- und TWEAK- vermittelte Apoptose .....</b>	<b>37</b>
5.1.1	Geldanamycin schützt Kym-1-Zellen vor TNF und TWEAK-induzierter Apoptose.....	37
5.1.2	Vergleich der Auswirkungen von GA und MG-132 auf die Apoptose in Kym-1- Zellen .....	39
5.1.3	Der TNF-induzierte Zelltod in Kym-1-Zellen ist abhängig von Caspasen.....	40
<b>5.2</b>	<b>Geldanamycin und MG-132 inhibieren die TNF-R1-vermittelte Induktion von endogenem TNF.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>Endogen produziertes TNF spielt eine wichtige Rolle für die schnelle Apoptose-Induktion in Kym-1-Zellen.....</b>	<b>45</b>
5.3.1	Nachweis von endogen produziertem TNF auf Proteinebene.....	45
5.3.2	Endogen produziertes TNF aktiviert TNF-R2 in Kym-1-Zellen .....	45
5.3.3	Ein kurzer TNF-Puls führt zu vollständiger Apoptose in Kym-1-Zellen.....	46
<b>5.4</b>	<b>Stimulation des TNF-R1 induziert Membran-TNF .....</b>	<b>48</b>

---

<b>5.5</b>	<b>HeLa-Zellen produzieren kein endogenes TNF nach TNF-R1-Stimulation und benötigen permanente TNF-Stimulation zur Apoptose-Induktion.....</b>	<b>50</b>
<b>5.6</b>	<b>JNK-Aktivierung und Apoptose .....</b>	<b>52</b>
<b>5.6.1</b>	<b>Die Aktivierung der JNK hat keinen signifikanten Einfluß auf die TNF-induzierte Apoptose in Kym-1- und KB-Zellen .....</b>	<b>52</b>
5.6.2	Mechanismen der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung .....	54
5.6.3	Die transiente TNF-vermittelte JNK-Aktivierung wird durch Vorstimulation mit NF- $\kappa$ B-induzierenden Liganden inhibiert.....	55
<b>5.7</b>	<b>Untersuchungen zur JNK-Aktivierung durch TRAIL und FasL.....</b>	<b>56</b>
5.7.1	Die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung kann Caspase-abhängig oder unabhängig sein.....	56
5.7.2	Caspase-Abhängigkeit der FasL-vermittelten JNK-Aktivierung.....	57
5.7.3	Die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung kann RIP-abhängig oder unabhängig sein. ....	60
<b>5.8</b>	<b>Einfluß von TRAF2 und Filamin auf die NF-<math>\kappa</math>B- und JNK-Aktivierung durch TNF, FasL und TRAIL.....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
<b>6.1</b>	<b>Endogenes Membran-TNF verstärkt die TNF-R1-vermittelte Apoptose. ...</b>	<b>65</b>
<b>6.2</b>	<b>Untersuchungen der JNK-Aktivierung durch TNF, TRAIL und FasL.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>

## 1. Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Akt	= protein kinase B (PKB)
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASK-1	apoptosis signal regulating kinase 1
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Rinderserum Albumin
Caspase	cysteine aspartic acid-specific protease
CHX	Cycloheximid
Daxx	death domain associated protein 6
DD	death domain
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI (=Smac)
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)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas-associating protein with a death domain (=MORT)
Fas	Apo1
FasL	Fas Ligand (=Apo1L)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE (=MACH, caspase-8)
GA	Geldanamycin
GCK	germinal center kinase
GST	Glutathion-S-Transferase

---

hiFCS	hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
Hsp	Heat-shock protein
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICE	interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B	Inhibitor kappa B
IKK $\alpha$ , $\beta$ ,	I $\kappa$ B Kinase $\alpha$ , $\beta$ , (=IKK-1, IKK-2)
IKK $\gamma$	I $\kappa$ B Kinase $\gamma$ (=NEMO, Fip-3 oder IKKAP)
IL	Interleukin
IKK-Komplex	I $\kappa$ B Kinase-Komplex
JNK kinase) kDa	c-Jun N-terminale Kinase (=SAPK, stress-activated protein Kilo-Dalton
LT	Lymphotoxin
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEKK1	MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase1
memTNF	membranständiges TNF
MLK	mixed-lineage kinase
mRNA	Boten-(messenger)-RNA
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NGF-R	nerve growth factor receptor
OPG	Osteoprotegerin (TR1)
pAK	polyklonaler Antikörper
PBA	PBS mit BSA und Azid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
RIP	receptor interacting protein
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffradikale (=reaktive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase (=Diablo)

---

SODD	silencer of death domain
sTNF	lösliches (=soluble) TNF
TACE	TNF-alpha converting enzyme
TAK-1	TGF-beta-activated kinase 1
tBid	truncated Bid
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R1	TNF-Rezeptor Typ 1 (=CD120a, p55/60)
TNF-R2	TNF-Rezeptor Typ 2 (=CD120b, p75/80)
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, Apo2)
TRAIL-R2	TRAIL receptor 2 (=DR5, TRICK2, KILLER)
TRAIL-R3	TRAIL receptor 3 (=DcR1, TRID, LIT)
TRAIL-R4	TRAIL receptor 4 (=DcR2, TRUNND)
TWEAK	Tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand /Überstände
Wt	Wildtyp
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
z-VAD-fmk	<i>N</i> -benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton

## 2. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen von TNF-, TRAIL- und FasL-induzierten Signalwegen. Schwerpunkt war hier insbesondere die TNF-R1-vermittelte Apoptose und die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) durch die genannten Zytokine.

Vor einiger Zeit wurde gezeigt, daß der Nicht-Todesrezeptor TNF-R2 in bestimmten Zelltypen Apoptose induzieren kann. Die Induktion der Apoptose durch diesen und einige andere TNF-Rezeptoren ohne Todesdomäne erfolgt über die Bildung von endogenem Membran-TNF. Dieses membranständige TNF aktiviert dann den Todesrezeptor TNF-R1. Interessanterweise ist auch der TNF-R1 selbst in der Lage, nach Stimulation endogenes TNF zu produzieren. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Geldanamycin, ein Inhibitor des Hitzeschock Protein 90 (Hsp 90), sowie der Proteasomeninhibitor MG-132, die beide den NF- $\kappa$ B-Signalweg blockieren, zwar die schnelle TNF-R1-vermittelte, nicht aber die TRAIL-vermittelte Apoptose in Kym-1-Zellen inhibieren. Auf die späte TNF-R1-vermittelte Apoptose war der Einfluß der Inhibitoren sehr viel schwächer (GA) bzw. nicht mehr beobachtbar (MG-132). Dies ist ein Hinweis darauf, daß der NF- $\kappa$ B-Signalweg eine Rolle für die schnelle TNF-R1-vermittelte Apoptose-Induktion spielt. Eine Stimulation des TNF-R1 durch agonistische Antikörper führte zur Induktion von endogenem TNF und Apoptose. Der Einsatz TNF-spezifischer Antikörper verhinderte die schnelle Apoptose-Induktion. Die TNF-R1-stimulierten Kym-1-Zellen exprimierten TNF nach TNF-R1-Aktivierung hauptsächlich in einer Zell-assoziierten Form, was vermuten läßt, daß es sich bei dem endogen produzierten TNF um Membran-TNF (memTNF) handelt. Es ist anzunehmen, daß dieses membranständige TNF den TNF-R2 aktiviert, da Membran-TNF im Vergleich zu TNF-R1 ein guter Aktivator dieses Rezeptors ist. Nach simultaner Stimulation beider TNF-Rezeptoren durch agonistische Antikörper war Geldanamycin nicht mehr in der Lage die Induktion der Apoptose zu inhibieren. Dies deutet auf eine Kooperation beider TNF-Rezeptoren bei der schnellen TNF-R1-vermittelten Apoptose in Kym-1-Zellen hin. Die Induktion von membranständigem TNF und der folgende „Crosstalk“ zwischen TNF-R1 und TNF-R2 bewirken so diese schnelle und starke TNF-R1-vermittelte apoptotische Antwort. Durch diesen Rezeptor-„Crosstalk“ wird die TNF-R1-vermittelte Apoptose zudem unabhängig von permanenter exogener TNF-Stimulation.

---

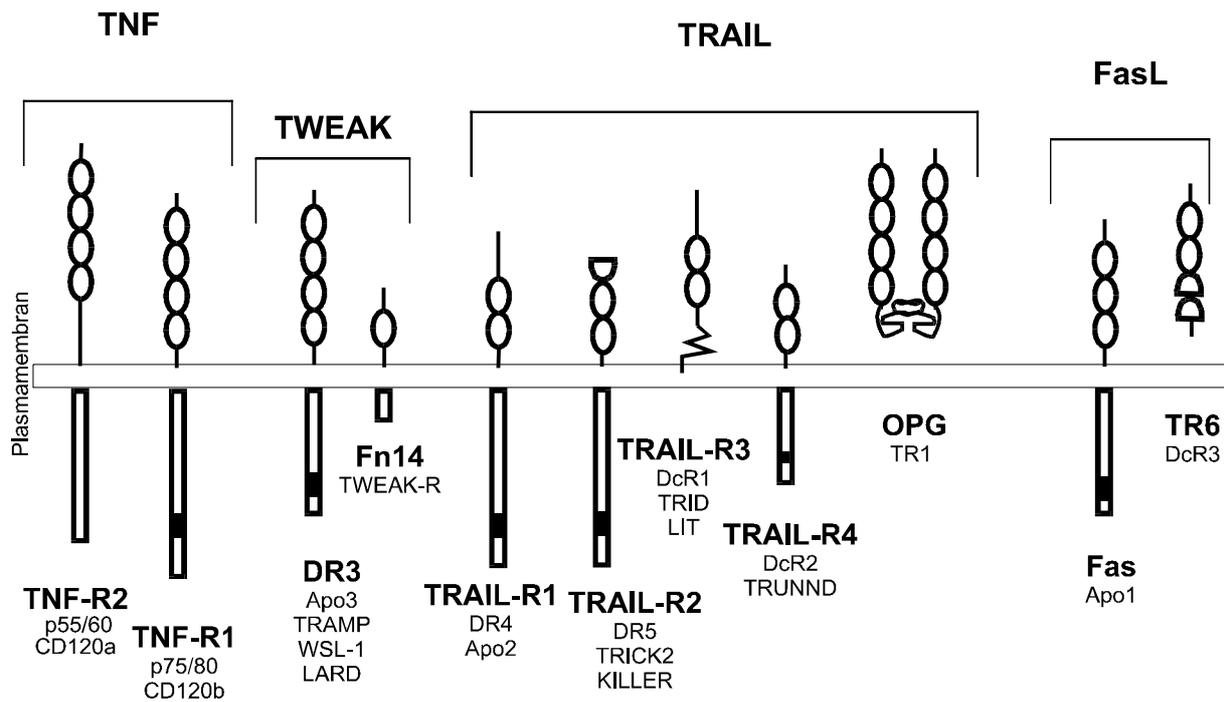
Untersuchungen der gegenseitigen Beeinflussung der TNF-R1-vermittelten JNK-Aktivierung und der TNF-R1-vermittelten Apoptose-Induktion ergaben, daß die TNF-R1-vermittelte JNK-Aktivierung nur eine untergeordnete Rolle für die TNF-R1-vermittelte Apoptose spielt. Es ergab sich weiter, daß zwei verschiedene Mechanismen für die TNF-R1-vermittelte JNK-Aktivierung existieren: ein transienter, Caspase-unabhängiger Mechanismus, der durch Vorstimulation mit NF- $\kappa$ B-induzierenden Liganden gehemmt werden kann und ein verzögert einsetzender Mechanismus, der Caspase-abhängig ist. Im Falle der TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung zeigte sich gleichfalls die Existenz zweier verschiedener Zelltyp-abhängiger Signalwege, die JNK aktivieren. Ein Caspase-abhängiger, aber RIP-unabhängiger und ein RIP-abhängiger aber Caspase-unabhängiger Signalweg. Es muß sich jedoch in der Zukunft erst zeigen, ob die JNK-Aktivierung tatsächlich eine Folge der Apoptose ist, oder ob die beteiligten Caspasen über einen getrennten Apoptose-unabhängigen Signalweg aktiviert werden.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Die TNF-Ligandenfamilie und ihre Rezeptoren

Im Jahr 1975 wurde aus Makrophagen-Überständen ein Endotoxin-induzierter Faktor isoliert (Carswell et al., 1975). Aufgrund der Fähigkeit in bestimmten Tumoren *in vivo* Nekrose zu verursachen, wurde dieser Faktor „Tumor Nekrose Faktor“ (TNF) genannt. Hauptsächlich Makrophagen, aber auch Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und viele andere Zellen exprimieren TNF als Antwort auf Entzündung, Infektion, Verletzung und Veränderungen des sie umgebenden Milieus (Baud et al., 2001). Dabei wird TNF nicht konstitutiv, sondern nur von aktivierten Zellen durch Stimuli wie LPS, IL-1, IL-3, GM-CSF, IFN- $\gamma$  und TNF selbst gebildet. TNF erwies sich als Prototyp der TNF-Ligandenfamilie, deren Mitglieder 20-25 % Sequenzhomologie in einem ca. 150 AS umfassenden Bereich ihrer extrazellulären Domäne aufweisen. Zu dieser Familie gehörende Zytokine sind neben TNF u. a. LT $\alpha$ , FasL, CD40L, CD27L, CD30L, LT $\beta$ , OX40L, 4-1BBL, TRAIL, TWEAK, RANKL, und GITRL (Leong et al., 2000). Die Liganden der TNF-Familie sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Tracey und Cerami, 1993; Vandenabeele et al., 1995). Mit Ausnahme von LT $\alpha$  werden alle Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie als Typ-II-Membranproteine exprimiert (Armitage et al., 1994). Jedoch können in einigen Fällen auch lösliche Liganden durch Metalloprotease-vermittelte Spaltung der membranständigen Form entstehen. (Perez et al., 1990; Tanaka et al., 1998). Über den zuvor beschriebenen homologen extrazellulären Bereich binden diese Zytokine an ihre Rezeptoren. Es handelt sich hierbei durchweg um Typ-I-Transmembranproteine. Die Rezeptoren weisen ebenfalls strukturelle Homologien auf und werden daher in der TNF-Rezeptorfamilie zusammengefaßt. In der extrazellulären Domäne tragen sie charakteristischerweise 1-6 cysteinreiche sich wiederholende Regionen, von denen jede typischerweise drei Cysteinbrücken aufweist (Naismith und Sprang, 1998). Da die TNF-Rezeptoren keine intrinsischen katalytischen Eigenschaften besitzen, benötigen sie Adaptermoleküle aus dem Zytoplasma um ihre Funktionen vermitteln zu können. Sequenzvergleiche der intrazellulären Domänen von Fas und TNF-R1 zeigten die Existenz eines homologen Abschnitts von ca. 80 AS. Diese Region erhielt die Bezeichnung Todesdomäne (DD), da durch sie die Vermittlung zytotoxischer Signale ermöglicht

wird (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Außer Fas und TNF-R1 besitzen auch TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R4, DR3, DR6 und der NGF-R eine solche Todesdomäne. Daher erfolgte eine weitere Unterteilung der Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie in Rezeptoren mit und ohne Todesdomäne (Locksley et al., 2001). Die Funktion der DD-Rezeptoren ist – abgesehen von TNF-R1 - vor allem die über DD-Adapterproteine vermittelte Übertragung apoptotischer Signale. Die Rezeptoren ohne DD, auch als Nicht-Todesrezeptoren oder TRAF-bindende Rezeptoren bezeichnet, nutzen Mitglieder der TRAF-Familie als Adapterproteine (Locksley et al., 2001). In dieser Untergruppe konnten keine Homologien im intrazellulären Bereich gefunden werden, ihre Funktionen sind ebenfalls unterschiedlich. Von vielen Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie ist bekannt, daß sie als Homotrimere vorliegen (Jones et al., 1989; Eck und Sprang, 1989; Bazan et al., 1993; Karpusas et al., 1995; Schneider et al., 1997b; Cha et al., 1999; Hymowitz et al., 1999). Man vermutete, daß Ligandenbindung zu einer Oligomerisierung der korrespondierenden Rezeptoren führt (Banner et al., 1993). Inzwischen konnte jedoch in Abwesenheit von Liganden bei einigen Rezeptoren Autoaggregation beobachtet werden. Nach Stimulation erfolgte hier also nur eine Neuordnung des vorgeformten Rezeptorkomplexes (Chan et al., 2000; Siegel et al., 2000). Dies läßt folgende Vermutungen zu: i) Durch Ligandenbindung wird ein latent funktionstüchtiger Rezeptor über Konformationsänderungen aktiviert, oder ii) die Ligandenbindung ermöglicht erst die Formation des funktionstüchtigen Rezeptorkomplexes. Im Fall von TNF-R1 ist bekannt, daß im inaktiven Zustand das Protein SODD eine Selbstaggregation der Todesdomänen verhindert. Dieses Protein dissoziiert nach Bindung von TNF vom Rezeptorkomplex und ermöglicht dadurch erst die Bindung von Adaptermolekülen (Jiang et al., 1999). In den folgenden Kapiteln werden die in dieser Arbeit untersuchten Mitglieder der TNF-Familie, ihre Rezeptoren (Abb. 1) und durch sie initiierte Signalwege näher beschrieben.



**Abbildung 1: Die Rezeptoren von TNF, TWEAK, TRAIL und FasL.** Cysteinreiche Regionen sind als Ellipsen dargestellt. Die intrazelluläre Todesdomäne der DD-Rezeptoren ist schwarz markiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Rezeptor-Bezeichnungen sind in Fettdruck geschrieben, zusätzlich gebräuchliche Rezeptor-Namen sind in kleinerer Schrift aufgeführt. Weitere Erklärungen siehe Text.

### 3.2 TNF-induzierte Signalwege

Es gibt zwei Formen von TNF: ein Typ-II-Membranprotein (memTNF) und eine lösliche Form (sTNF) (Wajant und Scheurich 2001). Dieses Prinzip wurde auch für viele andere Mitglieder der TNF-Familie gezeigt. Humanes lösliches TNF ist ein nicht-glykosyliertes Protein von 17 kDa und einer Länge von 157 AS. Es entsteht durch die Prozessierung der Membranform von 26 kDa. Diese Spaltung wird durch die Metalloprotease TACE (TNF-alpha converting enzyme) vermittelt (Moss et al., 1997; Black et al., 1997). TNF vermittelt seine Funktionen über zwei verschiedene Rezeptoren: TNF-R1 und TNF-R2. (Abb. 1). Neben seiner antitumoralen Aktivität weist TNF ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten auf: hohe TNF-Konzentrationen führen zu septischem Schock (Mannel und Echtenacher, 2000), permanente Einwirkung geringer Konzentrationen dieses Zytokins dagegen zur Kachexie, z. B. bei Tumorpatienten. TNF stellt einen Hauptmediator entzündlicher Reaktionen dar, der zudem apoptotisches Potential aufweist. Die apoptotische Wirkung von TNF ist zum Beispiel beim Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) von

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von Bedeutung (Sugarmann, et al., 1985; Zheng et al., 1995). Im Endothel induziert TNF die Freisetzung des „Plättchen-aktivierenden-Faktor“, die Sekretion verschiedener anderer Zytokine und die Expression von Adhäsionsmolekülen. In (patho)physiologischen Situationen zeigt TNF ausgeprägte funktionelle Dualität, indem es sowohl an der Regeneration und Expansion von Geweben beteiligt ist, als auch Gewebeschäden verursacht. TNF-Rezeptoren werden mit Ausnahme von Erythrozyten nahezu überall exprimiert, daher sind die meisten Zelltypen zumindest geringfügig TNF-responsibel, was das breite Wirkungsspektrum dieses Zytokins erklärt (Schulze-Osthoff et al., 1998).

### **3.2.1 NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Apoptose-Induktion durch TNF**

#### **3.2.1.1 TNF-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist eine der wichtigsten Funktionen von TNF. Unter dem Begriff NF- $\kappa$ B sind dimere Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie, die nach Zellstimulation vom Zytoplasma in den Kern wandern, vereinigt (Ghosh et al., 1998). Säugerzellen exprimieren fünf NF- $\kappa$ B-Proteine, die in zwei Klassen unterteilt sind: Die Mitglieder der ersten Klasse werden als reife Proteine synthetisiert und benötigen daher keine weitere Prozessierung. Hierzu zählen p65/RelA, c-Rel und RelB. Mitglieder der zweiten Klasse (p50 und p52) gehen aus Vorläuferformen durch proteolytische Spaltung hervor (Ghosh et al., 1998).

Nach Rezeptoroligomerisierung infolge Ligandenbindung wird, wie auch bei der Induktion der Apoptose (s. u.), das Adaptermolekül TRADD in den TNF-R1-Komplex rekrutiert (Hsu et al., 1996a). Über TRADD wird dann die Bindung von TRAF2 und RIP an den Rezeptorkomplex ermöglicht (Hsu et al., 1996a; Takeuchi et al., 1996; Hsu et al., 1996b). TRAF2 wiederum bewirkt die Rekrutierung des IKK-Komplexes in den Rezeptorkomplex (Devin et al., 2001). Der IKK-Komplex ist ein Multiproteinkomplex, der sich im Wesentlichen aus folgenden Komponenten zusammensetzt: Den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , zwei nahe verwandten Kinasen, die gemeinsam ein Heterodimer ausbilden (Mercurio et al., 1997; DiDonato et al., 1997; Zandi et al., 1997), IKK $\gamma$ , das die regulatorische Untereinheit darstellt (Yamaoka et al., 1998, Rothwarf et al., 1998, Li et al., 1999, Mercurio et al., 1999; Harhaj et al., 2000), sowie ein Homodimer des Hitzeschock Proteins 90 (Hsp90), dem zwei oder drei Moleküle des Hsp90-assoziierten Proteins

cdc37 angelagert sind (Chen et al., 2002). Das sich ebenfalls im TNF-Rezeptorkomplex befindende RIP scheint durch Interaktion mit TRAF2 und dem IKK-Komplex diesen zu stabilisieren, wodurch die Interaktion zwischen TRAF2 mit den Kinasen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  und deren folgende Aktivierung durch TRAF2 unterstützt wird (Devin et al., 2001). Jedoch wurde durch Resubstitution von RIP in RIP-defiziente Zellen erwiesen, daß die Kinase-Aktivität von RIP nicht unbedingt erforderlich für die IKK-Aktivierung ist (Devin et al., 2000; Ting et al., 1996). RIP interagiert ebenfalls mit MEKK3 und die TNF- und IL-1-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in MEKK3 defizienten Fibroblasten ist stark reduziert (Yang et al., 2001). Daher wäre es denkbar, daß RIP IKK indirekt über MEKK3 aktivieren kann. Die marginale NF- $\kappa$ B-Aktivierung die in den MEKK3-defizienten Zellen auftritt, rührt vermutlich von anderen Kinasen her, die die MEKK3-Funktion stellvertretend ausführen (Yang et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B liegt im nicht-aktivierten Zustand im Zytoplasma an seinen Inhibitor, ein Protein der I- $\kappa$ B-Familie, gebunden vor. Die aktivierten Kinasen IKK $\alpha$  und  $\beta$  phosphorylieren I- $\kappa$ B an zwei konservierten Serinresten, was dessen Ubiquitinylierung und nachfolgenden Abbau durch das 26S Proteasom bewirkt. NF- $\kappa$ B wird dadurch frei, transloziert in den Kern und bewirkt dort die Transkription seiner Zielgene (Maniatis, 1997; Stancovski und Baltimore, 1997). Unter diesen befinden sich auch Gene, die für Schutzproteine gegen die Apoptose kodieren, wie c-IAP1 und c-IAP2 (Wang et al., 1998; Chu et al., 1997), die gemeinsam mit TRAF2 und TRAF1 die TNF-R1-vermittelte Caspase-8-Aktivierung inhibieren können (Wang et al., 1998), sowie weitere anti-apoptotische Faktoren (siehe Wajant et al., 2002). Auch das TNF-Gen selbst gehört zu den Zielgenen von NF- $\kappa$ B. Dies ist u. a. für die Vermittlung der Apoptose durch die Nicht-Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Familienmitglieder von großer Bedeutung (s. Kapitel „TNF-R2-vermittelte Apoptose“).

### **3.2.1.2 TNF-R1-vermittelte Apoptose**

Da nur der TNF-R1 eine Todesdomäne enthält, der TNF-R2 dagegen nicht, ist es naheliegend, daß dieser Rezeptor die Hauptrolle bei der Induktion der Apoptose durch TNF spielt. Nach Trimerisierung des Rezeptors infolge Ligandenbindung (Smith et al., 1994) folgt die Rekrutierung des Adaptermoleküls TRADD. Dieses Molekül steht sowohl am Beginn der TNF-R1-vermittelten Apoptose wie auch der TNF-induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den IKK-Komplex (siehe oben). Eine

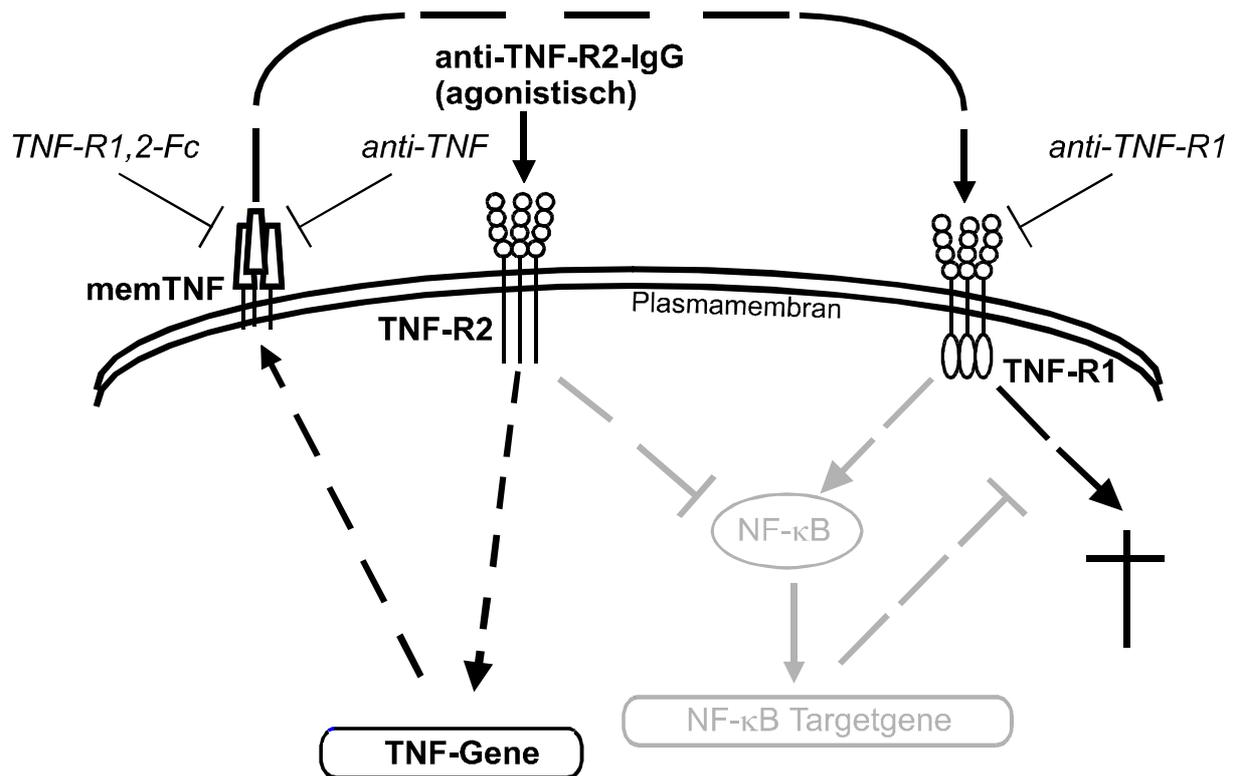
Depletion von TRAF2 aus dem Zytoplasma macht Zellen empfindlicher gegen die TNF-R1-vermittelte Apoptose, nicht aber gegen Fas- und TRAIL-vermittelte Apoptose (Weiß et al., 1997; Weiß et al., 1998; Duckett und Thompson, 1997; Chan und Lenardo, 2000a; Brown et al., 2002; Li et al., 2002; Fotin-Mleczek et al., 2002). Diese Depletion von TRAF2 sowie dessen folgender proteasomaler Abbau kann durch Stimulation von Nicht-Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie wie z. B. TNF-R2, CD30 und CD40 initiiert werden (Li et al., 2002; Fotin-Mleczek et al., 2002). Der endogene „TNF-R1-Apoptose-induzierende Komplex“ (DISC) konnte bisher nicht isoliert werden, dennoch ist aus Überexpressionsstudien bekannt, daß über TRADD auch FADD in diesen Komplex rekrutiert wird (Hsu et al., 1995). Dies wird über die Todesdomänen dieser Proteine vermittelt (Hsu et al., 1996a, Chinnaiyan et al., 1996; Boldin et al., 1996). Die Rekrutierung von FADD in den TNF-R1-DISC ist essentiell für die Induktion der Apoptose: in FADD-/- -Fibroblasten ist sowohl die TNF-R1- als auch die Fas-induzierte Apoptose blockiert (Zhang et al., 1998). Downstream der FADD-Rekrutierung erfolgt die TNF-R1-, Fas-, TRAIL-R1- und TRAIL-R2-vermittelte Apoptose über einen gemeinsamen Signalweg. Über Interaktion der sog. Todeseffektordomänen (DEDs) von FADD und der Initiator-Caspase Caspase-8 wird letztere in den DISC rekrutiert (Medema et al., 1997). Die dadurch induzierte Oligomerisierung von Caspase-8 führt zu deren autoproteolytischer Spaltung und Aktivierung (Muzio et al., 1998). Von aktiver Caspase-8 aus führen Zelltyp-abhängig zwei verschiedene Wege zum apoptotischen Zelltod: bei Typ-I-Zellen wird direkt die Effektor-Caspase-3 aktiviert, während bei Typ-II-Zellen eine Amplifikation des apoptotischen Caspase-8-Signals über einen Mitochondrien-abhängigen Mechanismus erfolgt. Bereits wenige Caspase-8 Moleküle bewirken eine Spaltung von Bid, einem Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie (Luo et al., 1998; Li et al., 1998). Das carboxyterminale Spaltprodukt von Bid (tBid) initiiert am Mitochondrium die Freisetzung von Cytochrom c (Luo et al., 1998; Li et al., 1998). Hierdurch wird ATP-abhängig die Bildung des sog. Apoptosoms induziert, das wiederum Caspase-3 aktiviert. Das Apoptosom besteht aus Cytochrom c, Apaf-1 sowie Caspase-9 (Wang 2001). Die aktivierte Caspase-3 aktiviert wiederum Caspase-8 und schließt auf diese Weise die apoptotische Amplifikationsschleife (Tang et al., 2000, Engels et al., 2000; Wieder et al., 2001). Das Mitochondrium setzt neben Cytochrom c auch Smac/DIABLO frei, ein Molekül, das anti-apoptotische Moleküle wie c-IAP1 und -2 sowie XIAP bindet und so die Apoptose unterstützt (Verhagen et al., 2000; Chai et

al., 2000). Da die Menge an prozessierter Caspase-8 dafür ausschlaggebend zu sein scheint, welcher Apoptosemechanismus abläuft und verschiedene Todesrezeptoren Caspase-8 unterschiedlich stark prozessieren, vermutet man, daß ein und dieselbe Zelle das Potential zur Aktivierung beider Apoptosewege in sich trägt. Welcher Mechanismus letztendlich abläuft scheint Zelltyp-spezifisch von dem jeweils stimulierten Todesrezeptor abzuhängen (Wajant et al., 2002).

Ein Großteil der biologischen Funktionen von TNF wie die Apoptose-Induktion oder Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird überwiegend durch den TNF-R1 vermittelt. Obwohl dieser Rezeptor zu den DD-Rezeptoren zählt, nimmt er eine Sonderstellung ein. Die Initiierung des apoptotischen Signals spielt hier im Vergleich zu der Funktion in der Regulierung inflammatorischer Prozesse eine untergeordnete Rolle (Wajant et al., 2002). Während bei anderen Todesrezeptoren wie Fas die Fähigkeit NF- $\kappa$ B zu aktivieren nur sichtbar wird, wenn die Apoptose-Induktion blockiert wird, liegt das Gleichgewicht bei TNF-R1 in den meisten Zell-Linien stark auf der Seite der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Wajant et al., 2000 und 2002). Es konnte gezeigt werden, daß NF- $\kappa$ B-abhängige Zielgene wie c-IAP1, c-IAP2, TRAF1 und TRAF2 die TNF-R1-vermittelte Apoptose inhibieren (Chu et al., 1997, Wang et al., 1998; Schwenzler et al., 1999). Passend dazu sterben Mäuse, die defizient für p65 oder andere Komponenten des NF- $\kappa$ B-Signalweges sind, früh an massivem Leberschaden durch TNF-induzierte Apoptose und Fibroblasten dieser Mäuse zeigen Sensitivität gegenüber TNF-induzierter Apoptose (Beg et al., 1995; Kelliher et al., 1998; Li et al., 1999; Tanaka et al., 1999; Makris et al., 2000; Rudolph et al., 2000; Schmidt-Supprian et al., 2000; Tada et al., 2001). Auch der durch TNF induzierte PI3K/Akt-Signalweg unterstützt die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF und hat zudem unabhängig davon noch weitere anti-apoptotische Eigenschaften (Pastorino et al., 1999; Osawa et al., 2001). Umgekehrt interferiert ablaufende Apoptose aber auch mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Dies geschieht, wie beispielsweise für die Kinasen RIP und IKK $\beta$  gezeigt wurde, durch Caspase-vermittelte Spaltung dieser für den NF- $\kappa$ B-Weg essentiellen Komponenten (Lin et al., 1999; Tang et al., 2001a). Durch diese Interaktionen apoptotischer und geninduzierender TNF-R1-vermittelter Signalwege entsteht ein regulatorisches Netzwerk, das eine hohe Flexibilität des TNF-R1 in der Antwort auf Stimulation möglich macht.

### 3.2.1.3 TNF-R2-vermittelte Apoptose

Die Expression des TNF-R2 ist im Vergleich zu TNF-R1 stark reguliert. Dieser Rezeptor wird überwiegend in Zellen des Immunsystems, wo er eine wichtige Rolle zu spielen scheint, exprimiert. Lösliches (sTNF) und membranständiges TNF (memTNF) weisen gegenüber den beiden TNF-Rezeptoren sehr verschiedene Aktivität auf. Während sTNF den TNF-R1 sehr gut stimuliert, aktiviert es den TNF-R2 nur schlecht. Membran-TNF hingegen ist ein starker Aktivator beider Rezeptoren (Grell et al., 1998; Grell et al., 1995). Beide Rezeptoren sind in der Lage NF- $\kappa$ B zu aktivieren. Da der TNF-R2 zu den Rezeptoren ohne DD bzw. Nicht-Todesrezeptoren zählt, wurde angenommen, daß Apoptose ausschließlich über TNF-R1 vermittelt wird. Inzwischen wurde jedoch gezeigt, daß alleinige Stimulation des TNF-R2 in einigen Zelltypen ebenfalls den programmierten Zelltod induzieren kann (Grell et al., 1999). Diese Initiierung der Apoptose geschieht hier jedoch indirekt über Bildung von endogenem memTNF (Abb. 2). Wird der TNF-R2 aktiviert, so wird über den NF- $\kappa$ B-Signalweg u. a. die Expression des TNF-Gens initiiert. Dieses endogen produzierte TNF wird jedoch nicht prozessiert, sondern ist als membranständiges TNF in der Membran verankert. Da memTNF, wie bereits erwähnt, ein potenter Aktivator beider TNF-Rezeptoren ist, kann auf diese Weise nun auch der TNF-R1 aktiviert werden und den Zelltod quasi stellvertretend für TNF-R2 einleiten. Durch Einsatz spezifischer Inhibitoren dieses Prozesses wie TNF-R1- und 2-Fc-Konstrukte, spezifisch gegen TNF gerichtete Ak, sowie antagonistische Ak gegen TNF-R1 wurde dieses Konzept bestätigt (Grell et al., 1999).



**Abbildung 2: Modell der TNF-R2-vermittelten Apoptose.** Schwarze Linien symbolisieren die Induktion der Apoptose durch TNF-R2. Die durch TNF-R2-Stimulation inhibierten Signalwege sind grau dargestellt. Inhibitoren sind kursiv gedruckt. Weitere Erläuterungen siehe Kapitel 3.2.1.3.

Auch für TWEAK, ein anderes Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, wurde in Kym-1-Zellen die Induktion von memTNF gefunden. TWEAK ist ebenfalls in der Lage Zelltod über endogenes TNF und mit Hilfe des TNF-R1 zu induzieren (Schneider et al., 1999). Allerdings ist noch unklar, über welchen Rezeptor die primäre TNF-Induktion abläuft. Obwohl der Todesrezeptor DR3/TRAMP einst als TWEAK-Rezeptor identifiziert wurde (Marsters et al. 1998), gibt es keine Hinweise auf dessen Existenz in Kym-1-Zellen. Ferner wurde mittels DR3-Knockout-Mäusen belegt, daß TWEAK zur Vermittlung seiner biologischen Aktivität keinesfalls den DR3-Rezeptor benötigt. Vermutlich existieren verschiedene Rezeptoren für diesen Liganden (Kaptein et al., 2000), darunter auch Nicht-Todesrezeptoren, die endogenes TNF zur Apoptose-Vermittlung über TNF-R1 nutzen. Erst kürzlich wurde mit Fn14 ein Rezeptor für TWEAK identifiziert, der möglicherweise hierfür in Frage käme. Fn14, das kleinste bisher bekannte Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, spielt eine Rolle in der Angiogenese, besitzt keine Todesdomäne und zählt daher zu den Nicht-Todesrezeptoren (Wiley et al., 2001).

### **3.2.2 Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) durch TNF**

#### **3.2.2.1 Allgemeines über JNK**

In Säugerzellen gibt es drei Hauptgruppen von Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). Diese sind die ERK-Gruppe, die JNK-Gruppe und Proteine der p38-Gruppe (Schaeffer und Weber, 1999). Die Aktivierungsmechanismen der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), auch als Streß-aktivierte MAP-Kinase (SAPK) bekannt, sind sehr komplex. Mindestens vier verschiedene MAPKK-Kinasen (MAPKKK) scheinen in ihre Aktivierung durch TNF einbezogen zu sein. Hierbei handelt es sich um ASK-1, TAK-1, MLK und MEKK1 (Chang und Karin 2001). Streß oder Zytokine wie TNF oder IL-1 führen zur Aktivierung der JNK (Ip und Davis, 1998). Nach ihrer Aktivierung wandern die JNK Kinasen in den Zellkern, wo sie ihrerseits Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und ATF2 aktivieren. So bindet die JNK die aminoterminalen Aktivierungsdomäne ihres Substrates c-Jun (Adler et al., 1992; Hibi et al., 1993) und phosphoryliert es an den Serinresten 63 und 73 (Pulverer et al., 1991). Diese Phosphorylierung des Aminoterminus ist ein genereller Mechanismus, über den die JNK Transkriptionsfaktoren aktivieren kann (Chang und Karin 2001). Bei c-Jun handelt es sich um ein Leucin-Zipper-Protein, das nach Dimerisierung Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie bildet (Chang und Karin 2001).

#### **3.2.2.2 Die TNF-vermittelte JNK-Aktivierung**

Obwohl die Bedeutung der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung noch unklar ist, ist der Mechanismus bereits gut untersucht: Nach Trimerisierung des TNF-R1 durch Ligandenbindung wird das Todesdomäne-Molekül TRADD in den Rezeptorkomplex rekrutiert. TRADD wiederum ist fähig zwei weitere Moleküle an den Rezeptorkomplex von TNF-R1 zu koppeln: Über homophile Interaktion der Todesdomänen kann zum einen die Kinase RIP rekrutiert werden (Liu et al., 1996), zum anderen bindet der N-terminale Teil von TRADD an die TRAF-Domäne von TRAF2 (Liu et al., 1996; Hsu et al., 1996a). Weiter ist bekannt, daß MKK4 und MKK7 eine Rolle in der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung spielen. Hierbei ist das Vorhandensein von MKK7 essentiell, wohingegen MKK4 alleine nicht in der Lage ist, die JNK nach TNF-Stimulation zu aktivieren (Tournier et al., 2001). Obwohl sicher ist, daß TRAF2 und MKK7 wichtig für die JNK-Aktivierung über TNF-R1 sind, wurde bisher das fehlende Bindeglied, vermutlich eine MAPKKK, noch nicht identifiziert. Da MEKK1 und ASK-1

mit TRAF2 interagieren können, wären sie potentielle Kandidaten (Nishitoh et al., 1998, Baud et al., 1999; Hoeflich et al., 1999), Bisher konnte aber mittels Knockout-Mäusen keine absolute Notwendigkeit für das Vorhandensein einer dieser Kinasen für die transiente TNF-vermittelte JNK-Aktivierung beobachtet werden (Yujiri et al., 2000; Tobiume et al., 2001). Jedoch konnte eine Beteiligung von ASK-1 bei der verlängerten JNK-Aktivierung durch TNF unter apoptotischen Bedingungen in Knockout-Mäusen nachgewiesen werden (Tobiume et al., 2001). Es gibt Forschungsergebnisse, die auf eine Beteiligung von Mitgliedern der Keimzentrum-Kinasen (GCK-Familie) an der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung hindeuten. Die GCK-Familie umfaßt eine Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen, die aufgrund von Unterschieden in ihrer carboxyterminalen, regulatorischen Domäne in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe-I-GCKs wirken als unmittelbare Aktivatoren von MAPK-Signalwegen bei der Phosphorylierung von MAPKK-Kinasen mit (Kyriakis, 1999). Einige Mitglieder der Gruppe-I-GCKs sind nachweislich an der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung beteiligt. Sie werden durch TNF aktiviert und interagieren mit TRAF2 (Shi et al., 1999). Ferner interferieren dominant-negative Mutanten dieser Kinasen mit der JNK-Aktivierung durch TNF (Nakano et al., 2000; Yao et al., 1999). Die GCKs scheinen das Signal von TNF-R1 mit der JNK-Kaskade zu verbinden, indem sie gleichzeitig mit TRAF2 und MEKK1 interagieren, wobei MEKK1 durch Phosphorylierung aktiviert wird (Yuasa et al., 1998; Chadee et al., 2002). Durch diese Aktivierung bildet MEKK1 vermehrt Oligomere aus, was wiederum zur Aktivierung MEKK1-vermittelter Signalwege führt (Chadee et al., 2002), darunter auch die JNK-Aktivierung. Andere Studien implizieren eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und ASK-1 an der TNF-R1-vermittelten JNK-Aktivierung. Dieser Signalweg ist unabhängig von GCKs. Anscheinend vermittelt TNF-R1 über TRAF2 einen Anstieg von ROS (Chandel et al., 2001), was zur Bindung von ASK-1 an TRAF2 führt (Gotoh et al., 1998). Diese Interaktion basiert auf der Oxidation des ASK-1-bindenden Inhibitors Thioredoxin durch ROS, so daß ASK-1 für die Bildung der JNK-aktivierenden ASK-1-TRAF2-Komplexe frei wird (Liu et al., 2000).

### 3.3 TRAIL und FasL

#### 3.3.1 Grundlagen

Zwei weitere interessante Mitglieder der TNF-Ligandenfamilie sind TRAIL und FasL. Diese beiden Liganden sind mit 28 % Homologie sehr nah miteinander verwandt (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996). Bei beiden Liganden existiert neben der membranständigen Form eine durch enzymatische Spaltung entstehende lösliche Form (Mariani et al., 1998; Tanaka et al., 1998). Röntgenstrukturanalysen und biochemische „Crosslink“-Experimente legen nahe, daß die biologisch aktive Form von TRAIL und FasL ebenfalls ein Trimer ist (Hymowitz et al., 1999, Mongkolsapaya et al., 1999, Cha et al., 1999; Schneider et al., 1997b). Im Gegensatz zu TNF liegt der Schwerpunkt bei TRAIL und FasL deutlich auf der Induktion apoptotischer Signalwege, obwohl sowohl TRAIL als auch FasL ebenfalls geninduzierende Funktionen wie NF- $\kappa$ B-Aktivierung und JNK-Aktivierung haben können. Im Falle von FasL ist bisher nur Fas als signalübertragender Rezeptor bekannt (Trauth et al., 1989; Nagata und Golstein 1995). Ferner existieren einige sog. „Decoy-Rezeptoren“, die der Negativ-Regulation von Fas dienen (Pitti et al., 1998; Jenkins et al., 2000) (Abb. 1). Für TRAIL hingegen sind fünf Rezeptoren bekannt, die alle Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie sind (Abb. 1): TRAIL-R1 (Pan et al., 1997a; Schneider et al., 1997a) und TRAIL-R2 (Walczak et al., 1997; Schneider et al., 1997a; MacFarlane et al., 1997) sind zu 53 % homolog und besitzen als einzige TRAIL-Rezeptoren eine funktionelle Todesdomäne zur Vermittlung der Apoptose. TRAIL-R3 besitzt keine intrazelluläre Domäne und ist nur über einen Glycophosphatidylinositol-Rest in der Zellmembran verankert (Pan et al., 1997b; Degli-Esposti et al., 1997a, Sheridan et al., 1997; MacFarlane et al., 1997), TRAIL-R4 besitzt ebenfalls eine DD, die jedoch nur unvollständig und daher nicht funktionell ist (Degli-Esposti et al., 1997b; Pan et al., 1998). Bei dem fünften TRAIL-Rezeptor handelt es sich um das lösliche Osteoprotegerin (OPG), das an der Differenzierung von Osteoklasten beteiligt ist und außer TRAIL auch RANKL bindet (Simonet et al., 1997; Emery et al., 1998). TRAIL-R4 Überexpression führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, was darauf hindeutet, daß die intrazelluläre Domäne dieses Rezeptors durchaus funktionell ist (Degli-Esposti et al., 1997b; Marsters et al., 1997). Für die TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 sowie für OPG wird außerdem eine Rolle als „Decoy“-Rezeptoren vermutet (Schulze-Osthoff et al., 1998).

### 3.3.2 Aktivierung der JNK durch TRAIL und FasL

Wie TNF können FasL oder TRAIL ebenfalls die JNK aktivieren (Cahill et al., 1996, Lenczowski et al., 1997, Yang et al., 1997; Mühlenbeck et al., 1998). Über die Mechanismen der Aktivierung der JNK durch TRAIL und FasL ist aber weitaus weniger bekannt als über die TNF-induzierte JNK-Aktivierung (s. o.). In der Regel findet man JNK-Aktivierung durch TRAIL und FasL in Verbindung mit Induktion von Apoptose. Dies ist nicht überraschend, da aktive Caspasen auch JNK aktivieren können, wie beispielsweise durch Spaltung und Aktivierung von MEKK1 (Deak et al., 1998, Cardone et al., 1997, Widmann et al., 1997; Widmann et al., 1998). Während die TRAIL-induzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B sowohl von TRAIL-R1, TRAIL-R2 sowie TRAIL-R4 vermittelt werden kann, konnte nach Einsatz spezifischer agonistischer Ak gegen die TRAIL-Rezeptoren eine Aktivierung der JNK bisher nur durch TRAIL-R2 gezeigt werden. TRAIL-R1 vermittelte dagegen keine JNK-Aktivierung (Mühlenbeck et al., 2000). Dennoch existieren Daten, die zeigen, daß eine transiente Überexpression von TRAIL-R1 und TRAIL-R4 ebenfalls JNK aktivieren kann (Hu et al., 1999). Daher kann eine Beteiligung dieser Rezeptoren unter bestimmten Umständen nicht völlig ausgeschlossen werden. Obwohl die Aktivierung der JNK durch TRAIL hauptsächlich im Zuge der Apoptose auftritt, wurde gezeigt, daß es zwei verschiedene Zelltyp-abhängige Aktivierungswege für die TRAIL-induzierte JNK gibt: die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung verläuft in Kym-1-Zellen Caspase-unabhängig, in HeLa-Zellen dagegen Caspase-abhängig. Dennoch sind die an der Caspase-abhängigen JNK-Aktivierung beteiligten Caspasen nicht in der Lage Apoptose zu induzieren. Es handelt sich also vermutlich um einen von der Apoptose getrennten Signalweg (Mühlenbeck et al., 1998). Weiter konnte auch eine Beteiligung von RIP und TRAF2 an der TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung nachgewiesen werden (Hu et al., 1999; Lin et al., 2000). Nur für die TRAIL-R1-vermittelte JNK-Aktivierung wurde außerdem eine Beteiligung von MEKK1 und MKK4 durch Überexpression dominant-negativer Konstrukte gezeigt (Hu et al., 1999). Über die FasL-vermittelte JNK-Aktivierung ist noch weniger bekannt als über die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung. Hier wird ebenfalls eine Aktivierung von MEKK1 vermutet, die dann über MKK4 und MKK7 zur Aktivierung der JNK führt. MEKK1 wird dabei durch Caspase-3-vermittelte Spaltung aktiviert (Deak et al., 1998). Durch Einsatz Fas-vernetzender Ak wurde eine Rekrutierung von Daxx in den Fas-Rezeptorkomplex bei der Fas-vermittelten JNK-Aktivierung nachgewiesen. Daxx

aktiviert in Folge ASK-1/MKK5, was zur Aktivierung der JNK führt (Yang et al., 1997; Chang et al., 1998). Dieser Signalweg ist unabhängig von Caspasen – obwohl die Apoptose-Induktion blockiert wird, läuft die Aktivierung der JNK ungehindert ab (Yang et al., 1997). Daxx und FADD scheinen unabhängig voneinander mit verschiedenen Regionen der Fas-Todesdomäne zu interagieren (Chang et al., 1999). Eine Mutante des murinen Fas, die kein FADD mehr binden konnte, aber immer noch zur Interaktion mit Daxx fähig war, konnte JNK noch aktivieren, Apoptose war jedoch inhibiert (Chang et al., 1999). Dies zeigt, daß auch Fas im Prinzip die Fähigkeit besitzt, JNK Apoptose-unabhängig zu aktivieren.

### **3.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Analog zu TNF-R2 kann auch durch Stimulation des TNF-R1 über Aktivierung von NF- $\kappa$ B endogene TNF-Produktion initiiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die TNF-R1-vermittelte Apoptose im Hinblick auf diese endogene TNF-Produktion zu untersuchen. Hier sollte insbesondere der „Cross-Talk“ zwischen TNF-R1 und TNF-R2 im Hinblick auf TNF-R1-vermittelte Apoptose analysiert werden. Neben der Wechselwirkung der beiden TNF-Rezeptoren sollte JNK, ein Zielgen des TNF-R1, insbesondere im Zusammenhang mit TNF-R1-vermittelter Apoptose näher charakterisiert werden. Ferner sollten neben der Aktivierung der JNK im TNF-R1-induzierten Signalweg die molekularen Mechanismen der TRAIL- und FasL-vermittelten JNK-Aktivierung in die Untersuchung miteinbezogen werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Reagenzien

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Plastikartikel für die Zellkultur	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Clicks/RPMI	Biochrom, Berlin
DMEM	GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA
Trypsin/EDTA	PAA-Lab. GmbH, Linz, Österreich
Neomycin-Analog (G418)	Calbiochem, San Diego, USA
ELISA-Platten	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
hiFCS	PAA-Lab. GmbH, Linz, Österreich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Geldanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (10mCi/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Blotting-Papier Whatman 3MM Chr	Whatman International, England
Nitrozellulose	Schleicher und Schuell, Pharmacia LKB, Freiburg
Protein-A-Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Gluthation Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Protease-Inhibitoren (=PMSF, Leupeptin, NaF, Na-orthovanadat)	Boeringer, Mannheim
z-VAD-fmk	Bachem, Heidelberg
NBT	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
BCIP	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

---

Acrylamid 1 : 30	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Multi Probe Template Set hCK-3	PharMingen, San Diego, USA
RNA-Insta-Pure	Eurogentech, Belgien
RiboQuant Multi-Probe RNase Protection Assay System	PharMingen, San Diego, USA
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München
Inhibitor SP00125	Calbiochem, San Diego, USA
MG-132	Calbiochem, San Diego, USA
Superfect	QIAGEN, Hilden
Protease-Inhibitoren	Roche, Mannheim

Humanes TNF mit einer spezifischen Aktivität von  $2 \times 10^7$  U/mg wurde von I.-M. von Broen, Knoll AG, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt.

FasL, TRAIL sowie TWEAK, je mit N-terminalem „Flag-tag“ wurden von Dr. P. Schneider, Institut für Biochemie, Universität Lausanne, Epalinges, Schweiz freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Humanes IFN- $\gamma$  wurde von R & D Systems GmbH, Wiesbaden bezogen.

Alle anderen Reagenzien wurden von Merck, Darmstadt erworben.

#### **4.1.2 Puffer und Lösungen**

##### Kristallviolett-Lösung

0,5 % Kristallviolett; 20 % Methanol

##### Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

20 mM Phosphat; 0,7 % NaCl; pH 7,2

##### PBS-T

1x PBS; 0,05 % (v/v) Tween 20

MTPBS

150 mM NaCl; 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4 mM NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3

TBE (10x)

0,9 M Tris; 0,9 M Borsäure; 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8,3

Zell-Lyse-Puffer (Western Blot)

50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA pH 7,4; 1 % Triton X-100; 1 % Nonidet P-40; Protease-Inhibitor-Cocktail (frisch zugegeben); pH 7,4

Zell-Lyse-Puffer (TNF-ELISA)

20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; Protease-Inhibitor-Cocktail (frisch zugegeben); pH 7,5

pH 3-Waschpuffer

50 mM Glycin; 125 mM NaCl; pH 3,0

Sammelgel-Lösung (SDS-PAGE)

6 % Polyacrylamid in 125 mM Tris; 3,75 mM SDS; pH 6,8

Trenngel-Lösung (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

5x Probenpuffer (SDS-PAGE, Laemmli-Puffer)

250 mM Tris-HCl; 20 % Glycerin; 8 % SDS; 0,04 % Bromphenolblau; 20 % β-Mercaptoethanol; pH 6,8

Western Blot Puffer

25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3

AP-Western-Blot-Färbepuffer (10x)

1 M Tris/HCl; 1 M NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5

Puffer A (für Zellaufschluß JNK-Assay)

20 mM Tris; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 % Triton X-100; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 1 mM Na-orthovanadat; 1 mM NaF; 10 µg/ml Leupeptin; pH 7,4

Phosphorylierungspuffer (für JNK-Assay)

20 mM Mops pH 7,2; 2 mM EGTA; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,1 % Triton X100

**4.1.3 Antikörper und Antikörperkonstrukte**

Anti-Flag mAk M2	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TNF-R1-spezifischer mAk Htr-1	W. Lesslauer, Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz (Brockhaus et al., 1990)
huTNF-spezifischer neutralisierender mAk (357 101-4)	A. Meager, National Institute for Biological Standard and Control, Potters Bar, England
Kaninchen anti-huJNK1 pAk	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
FITC-konjugierter Ziege anti-Maus-Ig Ak (IgG und IgM)	Dianova, Hamburg
Anti-TNF-mAk T1	Dr. H. Böttinger, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Stuttgart
TNF-R2-spezifisches IgG M80	Dr. M. Grell, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Stuttgart
Caspase-8-spezifischer mAk	K. Schulze-Osthoff, Institut für Immunologie und Zellbiologie, Universität Münster
Merettich-Peroxidase-gekoppeltes Ziege anti-Maus-IgG	Sigma, Deisenhofen
Anti-hu-TNF mAk MAB 201	R & D Systems GmbH, Wiesbaden
biotinylierter anti-hu-TNF-IgG	Pharmingen, San Diego, USA

#### 4.1.4 Expressionsvektoren

Das NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid wurde freundlicherweise von Dr. B. Baumann, Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ), Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Das  $\beta$ -Galactosidase-Reporterplasmid pCH110 ist von Amersham Pharmacia Biotech erworben. Es enthält das LacZ-Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40-Promotors. Das Konstrukt wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz bei den transienten Reporterassays zur Bestimmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B verwendet.

Das Plasmid pGex-c-Jun(5-89) zur Herstellung des GST-c-Jun-Fusionsproteins als Substrat für die c-Jun-N-terminale Kinase wurde von I. Berberich, Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt für dominant-negatives TRAF2, TRAF2(87-501) wurde von Rothe et al., 1995a beschrieben und von H. Engelmann, Institut für Immunologie, Universität München zur Verfügung gestellt.

Das Expressionskonstrukt für TRADD wurde freundlicherweise von D. Goedel, Tularik Ink., South San Francisco, CA, USA zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.5 Zell-Linien

Die Rhabdomyosarkom-Zell-Linie Kym-1 wurde von M. Sekiguchi, Universität Tokyo, Japan, zur Verfügung gestellt.

Die Adenokarzinom-Zell-Linie HT-29 wurde von Pascal Schneider, Institut für Biochemie, Universität Lausanne, Epalinges, Schweiz freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die aus einem Zervixkarzinom hervorgegangene epitheliale Zell-Linie HeLa wurde von der „American Type Culture Collection“ (ATCC), Rockville, MD, USA, bezogen.

Die TNF-R2-überexprimierende Zell-Linie HeLa80 wurde von T. Weiß am Institut für Zellbiologie und Immunologie etabliert (Weiß 1997 und Weiß et al., 1997)

Die Keratinozyten-Zell-Linie KB wurde von Dr. Michael Kracht, Institut für Molekulare Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover zur Verfügung gestellt.

Die CD40-überexprimierende Zell-Linie SV80-CD40 wurde von H. Engelmann, Institut für Immunologie, Universität München, zur Verfügung gestellt.

Die T-Zell-Linie Jurkat wurde von der „American Type Culture Collection“ (ATCC), Rockville, MD, USA, bezogen.

Die Caspase-8-defizienten-Jurkat Zellen wurden gemeinsam mit den zugehörigen Wildtyp-Jurkat-Zellen freundlicherweise von J. Blenis, Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, zur Verfügung gestellt.

## **4.2 Experimentalmethoden**

### **4.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Kym-1-Zellen wurden in Clicks/RPMI 1640-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (hiFCS) kultiviert. HeLa- und HT-29-Zellen bekamen RPMI 1640-Medium mit 5 % hiFCS, während für KB-, Jurkat- und SV80-Zellen das RPMI 1640-Medium mit 10 % hiFCS supplementiert wurde. Die Anzucht aller Zell-Linien wurde bei 37 °C bei 96 % Luftfeuchtigkeit und Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

Die adhärent wachsenden Zell-Linien Kym-1, HeLa, HT-29, KB und SV80 wurden zum Ernten durch Inkubation mit Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) für 5 Minuten bei 37 °C vom Plastik abgelöst. Die Zellzahl wurde in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit Eosin (0,4 % Eosin, 10 % FCS, 0,9 % NaCl und 0,05 % NaN<sub>3</sub>) angefärbt, wodurch gleichzeitig eine Vitalitätskontrolle ermöglicht wurde.

### **4.2.2 Einsatz von TRAIL, FasL und TWEAK**

Zur Stimulation der Zellen mit TRAIL, FasL oder TWEAK mußten diese zuvor über ihren „Flag-tag“ mit dem Flag-spezifischen mAk M2 (1 µg/ml Endkonzentration) vernetzt werden. Hierfür wurden TRAIL, FasL oder TWEAK zusammen mit M2 in zehnfacher Konzentration in Medium angesetzt und für mindestens zehn Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der konzentrierte Ansatz mit Zellkulturmedium 1 : 10 verdünnt, das Medium der Zellen abgesaugt und das frische, die nun quervernetzten Liganden enthaltende Medium zu den Zellen pipettiert.

### **4.2.3 Zytotoxizitäts-Assays**

$20 \times 10^3$  Zellen pro well wurden über Nacht in beschichteten 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37 °C kultiviert. Je nach Zell-Linie erfolgte die Induktion des Zelltodes mit oder ohne 30-minütiger Vorbehandlung mit Cycloheximid (CHX) in einer Konzentration von 2,5 µg/ml. Die Apoptose-induzierenden Substanzen (TNF, monoklonaler TNF-R1-spezifischer Antikörper Htr-1, TRAIL, anti-TNF-R2-spezifisches Kaninchen-IgG (M80) und TWEAK) wurden entweder acht Stunden (Kurzzeitstimulation) oder 24 Stunden (Langzeitstimulation) zugegeben. Danach wurden die Überstände verworfen und die verbleibenden Zellen 20 Minuten mit 100 µl Kristallviolettlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch H<sub>2</sub>O entfernt und die Platten an der Luft getrocknet. Zur Quantifizierung lebender Zellen wurde das Kristallviolett mit 100 µl Methanol gelöst und die Extinktion der Lösung im ELISA-Reader (Spektramax 340 PC, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

### **4.2.4 Western-Blot-Analyse**

#### **4.2.4.1 Anzucht und Lyse der Zellen**

Jeweils  $500 \times 10^3$  Zellen pro Gruppe wurden in einer 6-well-Platte bei 37 °C kultiviert. Nach der jeweils angegebenen Stimulation wurden die Zellen in je 100 µl Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Reste der lysierten Zellen wurden daraufhin durch zehnmündige Zentrifugation bei 13000 UpM entfernt.

#### **4.2.4.2 Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt der Lysate wurde mittels Bio-Rad-Protein-Assay ermittelt. Hierzu wurde 1 µl des Lysates mit 1 ml des nach Anleitung angesetzten Bestimmungsreagenz vermischt und fünf bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die OD bei 595 nm bestimmt. Mittels einer BSA-Eichreihe wurde die Proteinkonzentration berechnet.

#### **4.2.4.3 SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf Nitrozellulose**

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein diskontinuierliches Gel in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Phase, Lübeck) verwendet. Das Trenngel wurde mit 13,5 %-iger Acrylamidkonzentration hergestellt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Trennschicht auszubilden. Nach Verfestigung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und ein 3 %-iges Sammelgel angefügt. Die Polymerisierungsreaktionen der Gel-Lösungen wurden jeweils mit APS und TEMED (je 0,1 % Endkonzentration) gestartet und beschleunigt.

Die zu testenden Proben wurden zusammen mit 5x Probenpuffer für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, abzentrifugiert und anschließend für 90 Minuten durch Elektrophorese bei 45 mA aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine in einem Semi-Dry-Blot-System (Phase, Lübeck) auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schuell, Dassel) überführt (1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gel; 90 Minuten).

#### **4.2.4.4 Nachweis definierter Proteine durch Immunofärbung**

Die mit den Proteinen beladene Nitrozellulose wurde zuerst für eine Stunde in Blocklösung (3 % Magermilch in PBS-T) bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Nach Entfernen der Milch durch drei 5-minütige Waschschriffe mit PBS-T wurde die Nitrozellulose für ein bis zwei Stunden in der ersten Ak-Lösung inkubiert. Für diese Ak-Lösung wurde der Ak gegen das zu testende Ag 1:1000 in PBS-T mit 0,3 % BSA eingesetzt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde wiederum dreimal mit PBS-T gewaschen und die zweite Ak-Lösung zugegeben. Hierbei handelte es sich um einen AP-konjugierten Sekundär-Antikörper gegen den ersten Ak. Dieser zweite Ak wurde 1:10000 in PBS-T eingesetzt und eine Stunde auf der Membran belassen. Nach Entfernung der Ak-Lösung durch Waschen mit PBS-T wurde die Membran zur Detektion der gebundenen Antikörper mit AP-Substrat-Lösung (0,162 mg/ml BCIP und 0,324 mg/ml NBT in AP-Färbepuffer) inkubiert, bis die Banden klar zu erkennen waren. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Detektionslösung und waschen der Membran in H<sub>2</sub>O beendet.

## 4.2.5 RNase Protection Assay (RPA)

### 4.2.5.1 Stimulation der Zellen und Isolierung der RNA

Pro Gruppe wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen wie beschrieben stimuliert und durch Abschaben geerntet. Nach Zentrifugation bei 4 °C und Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets bis zur Fortsetzung des Versuchs bei –20 °C tiefgefroren oder sofort weiterverarbeitet. Zur Isolierung der RNA wurden die Zellpellets in je 1 ml peqGOLD RNA Pure™ resuspendiert und für fünf Minuten bei RT inkubiert, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Daraufhin wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben ca. 15 Sekunden gründlich gemischt. Durch Zentrifugation bei 13000 UpM wurden die Phasen getrennt und die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, in ein frisches Röhrchen überführt. Die RNA wurde für 15 Minuten mit Isopropanol bei 4 °C präzipitiert und anschließend abzentrifugiert. Anschließend wurden die Präzipitate zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die RNA wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die OD bei 260 nm zur Konzentrationsbestimmung der gelösten RNA im Photometer gemessen.

### 4.2.5.2 Durchführung des RPA

Die Analyse der RNA wurde unter Verwendung des RiboQuant™ Multi-Probe Protection Assay System (Pharmingen, San Diego, USA) im wesentlichen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Präparation radioaktiver Sonden für die Detektion der TNF mRNA wurde das Multi Probe Template Set hCK-3 (LT $\alpha$ , LT $\beta$ , TNF, IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 sowie als interne Kontrollen L32 und GAPDH) in *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen radioaktiv markiert.

Dazu wurden 10 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP (10 mCi/ml), 1 µl GACU Nukleotid Pool, 2 µl DTT, 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 1 µl Template-Set, 1 µl RNasin und 1 µl T7-Polymerase vermischt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Zur Entfernung der Template-DNA wurde das Gemisch bei 37 °C für 30 Minuten mit 2 µl DNase verdaut. Danach wurde mit Phenol-Chloroform (26 µl 20 mM EDTA, 25 µl Tris-gesättigtes Phenol, 25 ml Chloroform : Isoamylalkohol (50 : 1) und 2 µl Hefe-tRNA) und anschließend mit Chloroform (50 µl Chloroform : Isoamylalkohol (50 : 1)) extrahiert, um die RNA zu reinigen. Anschließend wurde die RNA präzipitiert. Dazu wurden 50 µl

Ammoniumacetat (4 M) sowie 250 µl eiskaltes Ethanol (100 %) zugegeben und 45 Minuten bei –80 °C inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde die RNA mit Ethanol (90 %) gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen. 1 µl wurde in 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe) im Szintillationsmeßgerät (Cannberra-Packard, Dreieich) gemessen, um die Effizienz der radioaktiven Markierung zu bestimmen. Nach Einstellung mit Hybridisierungspuffer auf  $2-4 \times 10^6$  cpm/µl war das markierte Template Set verwendungsfertig.

Zur Analyse wurden je 10 µg RNA 30 Minuten bei –80 °C tiefgefroren, eine Stunde in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 8 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und mit 2 µl der radioaktiven Sonde vermischt. Die Hybridisierung erfolgte durch Erhitzen der Proben auf 90 °C und anschließender Inkubation bei 56 °C für 12-16 Stunden. Nachdem die RNA auf 37 °C abgekühlt war, wurde, um nicht-hybridisierte RNA zu entfernen, 0,25 µl RNase A + T1-Mix in 100 µl RNase-Puffer zugegeben und 45 Minuten bei 30 °C inkubiert. Durch Verdau mit Proteinase K wurde die RNase anschließend wieder entfernt. Hierfür wurden 1,2 µl Proteinase K und 1,2 µl Hefe-RNA in Proteinase K-Puffer zugegeben und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion (65 µl Tris-gesättigtes Phenol, 65 µl Chloroform : Isoamylalkohol (1 : 50)) gereinigt und mittels Ammoniumacetat gefällt (120 µl Ammoniumacetat (4 M) und 650 µl eiskaltes Ethanol (100 %), 45-minütige Inkubation bei –80 °C, Zentrifugation bei 4 °C). Nach Waschen in Ethanol (90 %) und Trocknung (30 Minuten, 37 °C) wurde die RNA in 5 µl Probenpuffer aufgenommen und drei Minuten bei 90 °C denaturiert. Anschließend 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 TBE; 0,1 % (v/v) APS) aufgetragen und 75 Minuten bei 50 W aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Nach Trocknung auf Whatman Papier (eine Stunde bei 80 °C im Geltdrockner) wurde das Gel mit Hilfe eines Phosphoimagers (STORM, Molecular Dynamics) analysiert.

#### **4.2.6 „pH 3-Wash“ zur Lösung der Liganden-Rezeptor Interaktion**

Nach Entfernung des TNF-haltigen Mediums sind TNF-Moleküle noch am Rezeptor gebunden. Für die Puls-Experimente, war es wichtig, das lösliche TNF vollständig zu

entfernen. Durch Austausch des TNF-haltigen Mediums gegen Medium ohne TNF können TNF-Moleküle, die an ihren Rezeptor gebunden vorliegen jedoch nicht entfernt werden. Diese Moleküle dissoziieren zu einem späteren Zeitpunkt von ihrem Rezeptor und stehen so wieder für eine neuerliche Stimulation zur Verfügung. Auf diese Weise wäre das Ergebnis des Puls-Experimentes verfälscht. Um auch die gerade gebundenen TNF-Moleküle vollständig zu entfernen, mußten daher die Rezeptor-Liganden-Bindungen zerstört werden. Dies geschah durch drei Waschschriffe mit eiskaltem pH 3-Waschpuffer für 90 Sekunden. Um die Zellen zu schonen, wurde zwischen den Waschschriffen kurz mit Medium inkubiert.

Da die TNF-Moleküle nicht irreversibel an ihre Rezeptoren gebunden bleiben sondern ständig langsam von den Rezeptoren dissoziieren und wieder an sie binden, bestand auch die Möglichkeit das TNF durch mehrere Waschschriffe, denen jeweils eine fünfminütige Pause folgen mußte, damit sich neues TNF vom Rezeptor lösen konnte, zu entfernen.

## **4.2.7 ELISA**

### **4.2.7.1 Nachweis von TNF**

$2 \times 10^6$  Zellen wurden in 10-cm-Zellkulturschalen bei 37 °C über Nacht kultiviert und am folgenden Tag in Gegenwart von z-VAD-fmk (20 µM) acht Stunden mit dem monoklonalen TNF-R1-spezifischen agonistischen Antikörper Htr-1 (250 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit z-VAD-fmk behandelt. Anschließend wurden die ÜS abgenommen und ein Teil durch Dialyse mit PEG 6000 ca. 15-fach ankonzentriert. Die Zellpellets wurden in 300 µl TNF-ELISA-Lyse-Puffer für 30 Minuten auf Eis aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (zehn Minuten 14000 UpM) wurden die Zellreste abgetrennt. Die Lysate wurden nach Proteinmessung (siehe Kapitel Proteinbestimmung) auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt. Einfache und ankonzentrierte Überstände sowie lysierte Zellen wurden in einem TNF-spezifischen ELISA (PharMingen, Hamburg, Germany) auf ihren TNF-Gehalt hin untersucht. Hierfür wurden die ELISA-Platten zuerst über Nacht mit dem TNF-spezifischen mAk MAB 201 (100 ng/well) über Nacht beschichtet und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen anschließend mit einer 10 %-igen hiFCS-Lösung in PBS-T behandelt. Nach zweimaligem Waschen wurden 100 µl der Proben zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Standard wurde eine Eichreihe mit

TNF in serieller Verdünnung aufgetragen. Daraufhin wurde viermal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurde ein biotinylierter anti-hu-TNF-mAk in einer Konzentration von 100 ng/well zugegeben und für 45 Minuten inkubiert. Die Platte wurde sechsmal gewaschen und für 30 Minuten bei RT mit Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (1 U/ml) inkubiert. Nach achtmaligem Waschen wurde 10 mg/ml NPP in ELISA-Substrat-Puffer zugegeben und die sich entwickelnde Gelbfärbung am ELISA-Reader (Spektramax 340 PC, Molecular Devices) bei 405 nm gemessen.

#### 4.2.8 FACS-Analyse

Zum Nachweis der Expression von Membran-TNF wurden  $1 \times 10^6$  Zellen 24 Stunden mit z-VAD-fmk mit oder ohne TNF (30 ng/ml) bei 37 °C kultiviert. Das induzierte membranständige TNF wurde dann durch Immunfluoreszenz-Färbung und „fluorescence-activated cell sorter“ (FACS) -Analyse detektiert. Um Komplexe aus Membran-TNF und TNF-Rezeptoren zu trennen, wurde zuvor ein „pH 3-Wash“ durchgeführt (siehe Kapitel „pH 3-Wash“ zur Lösung der Liganden-Rezeptor Interaktion). Nach Abschabung und Zentrifugation wurden die Zellen mit PBA gewaschen und in einem Gesamtvolumen von 100 µl in einer Spitzboden-Mikrotiterplatte mit 10 µg/ml des TNF-spezifischem Ak T1 eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBA wurde als zweiter Ak FITC-konjugierter Ziege anti-Maus-Ig (1:64) zugegeben und 30 Minuten bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 400 µl PBA aufgenommen und in einem FACStar<sup>Plus</sup> (Becton Dickinson, San Jose, Ca, USA) durchflußzytometrisch analysiert.

#### 4.2.9 JNK-Assay

Pro Gruppe wurden  $1 \times 10^6$  adhärenente Zellen oder  $7-10 \times 10^6$  Suspensionszellen in 6-cm-Zellkulturschalen mit 3 ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen stimuliert. Zum exakten Abstoppen der Stimulation wurden 5 ml eiskaltes PBS zu den Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets bis zur Fortsetzung des Versuchs bei -20 °C tiefgefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Der Zellaufschluß erfolgte nach Zugabe von 1 ml eiskaltem Puffer A mit Ultraschall (15 Pulse, Sonoplus HD2000, Bandelin, Berlin). Nachdem die Zellreste durch zehnmünütige Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C) vom Lysat abgetrennt waren, wurde der ÜS in ein frisches Röhrchen überführt und zur Immunpräzipitation der JNK 1 µg polyklonales Kaninchen anti-JNK-1 IgG zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei 4 °C mindestens eine Stunde gerollt. Anschließend wurde 25 µl Protein A-Sepharose zugegeben und wiederum 30 Minuten bis zwei Stunden gerollt. Danach konnten die Komplexe aus JNK und Ak, die durch die Protein A-Sepharose gebunden wurden, durch Zentrifugation (1 Minute, 13000 UpM, 4 °C) sedimentiert werden. Nach vorsichtigem Absaugen der ÜS wurde zweimal mit Puffer A gewaschen. Zur Herstellung der für die Kinase-Reaktion notwendigen Bedingungen wurde daraufhin nochmals mit Phosphorylierungspuffer gewaschen. Der Puffer wurde bis auf ca. 30 µl abgesaugt. Zu den verbleibenden JNK-Ak-Protein-A-Sepharose-Komplexen wurden 4 µl GST-c-Jun(5-89)-Fusionsprotein (ca. 4 µg) als Substrat für die JNK sowie 0,2 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (10 mCi/ml) zugegeben. Die Reaktion lief über 20 Minuten bei 37 °C. Danach wurde sie durch Zugabe von 10 µl 5x Probenpuffer beendet, die Proteine drei Minuten bei 95 °C denaturiert und auf einem 13,5 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel SDS-PAGE). Das Gel wurde für eine Stunde bei 80 °C auf Whatman Papier getrocknet und die Phosphorylierung des GST-c-Jun am Phosphoimager (STORM, Molecular Dynamics, Krefeld) mit der ImageQuant Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca., USA) bestimmt.

#### **4.2.10 Transienter Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung der NF-κB-Aktivierung**

13x10<sup>3</sup> Zellen wurden in beschichteten Flachboden-Mikrotiterplatten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die transiente Transfektion erfolgte mit Superfect (QIAGEN, Niederlande). Es handelt sich bei dieser Reagenz um ein Polykation, das die DNA komplexieren kann. Die so entstehenden positiv geladenen DNA-Komplexe werden über negativ geladene Oberflächenrezeptoren in die Zelle geschleust. Pro well wurde eine Gesamtmenge von 0,25 µg DNA folgender Zusammensetzung zugegeben: 0,15 µg Leervektor oder zu untersuchende DNA, 0,06 µg NF-κB-Reporter-DNA und 0,04 µg β-Galactosidase-DNA. Die DNAs wurden in 15 µl serumfreies Medium pipettiert und pro well 1 µl Superfect zugegeben. Nach gründlichem Mischen der Ansätze wurde 10 Minuten bei RT inkubiert, damit sich die DNA-Superfect-Komplexe

ausbilden konnten. Dann wurden 75  $\mu$ l Medium mit Serum beigefügt und diese Mischung für drei Stunden auf die Zellen gegeben. Nach einem Mediumswechsel wurden die Zellen über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen falls gewünscht noch stimuliert. Die ÜS wurden verworfen und die Zellen durch Zugabe von Lysispuffer (Galactolight-Kit, Tropix, Bedford, USA) (50  $\mu$ l/well) 10 Minuten auf dem Schüttler bei RT aufgeschlossen. Je 25  $\mu$ l wurden anschließend für die Messung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase und der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Galactosidase verwendet. Die Messung der Aktivität der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase erfolgte luminometrisch durch automatisierte Zugabe von 50  $\mu$ l verdünntem Luciferase Substrat (Luciferase Assay System, Promega GmbH, Mannheim) (1:5 in Wasser) direkt im Luminometer (lucy2, anthos Microsysteme GmbH). Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zur Normierung der Messung erfolgte durch Zugabe von 25  $\mu$ l „Reaction buffer“ (Galactolight-Kit, Tropix, Bedford, USA). Nach 40 Minuten Inkubation bei RT wurden durch das Luminometer 100  $\mu$ l 1:1 mit Wasser verdünnter „Accelerator“ (Galactolight-Kit, Tropix, Bedford, USA) hinzupipettiert und das entstehende Licht gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten ließ sich der Quotient aus NF- $\kappa$ B-Luciferase-Aktivität und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität für jede Probe ermitteln. Dieser Quotient ergibt die normierte relative NF- $\kappa$ B-Aktivierung in diesem well.

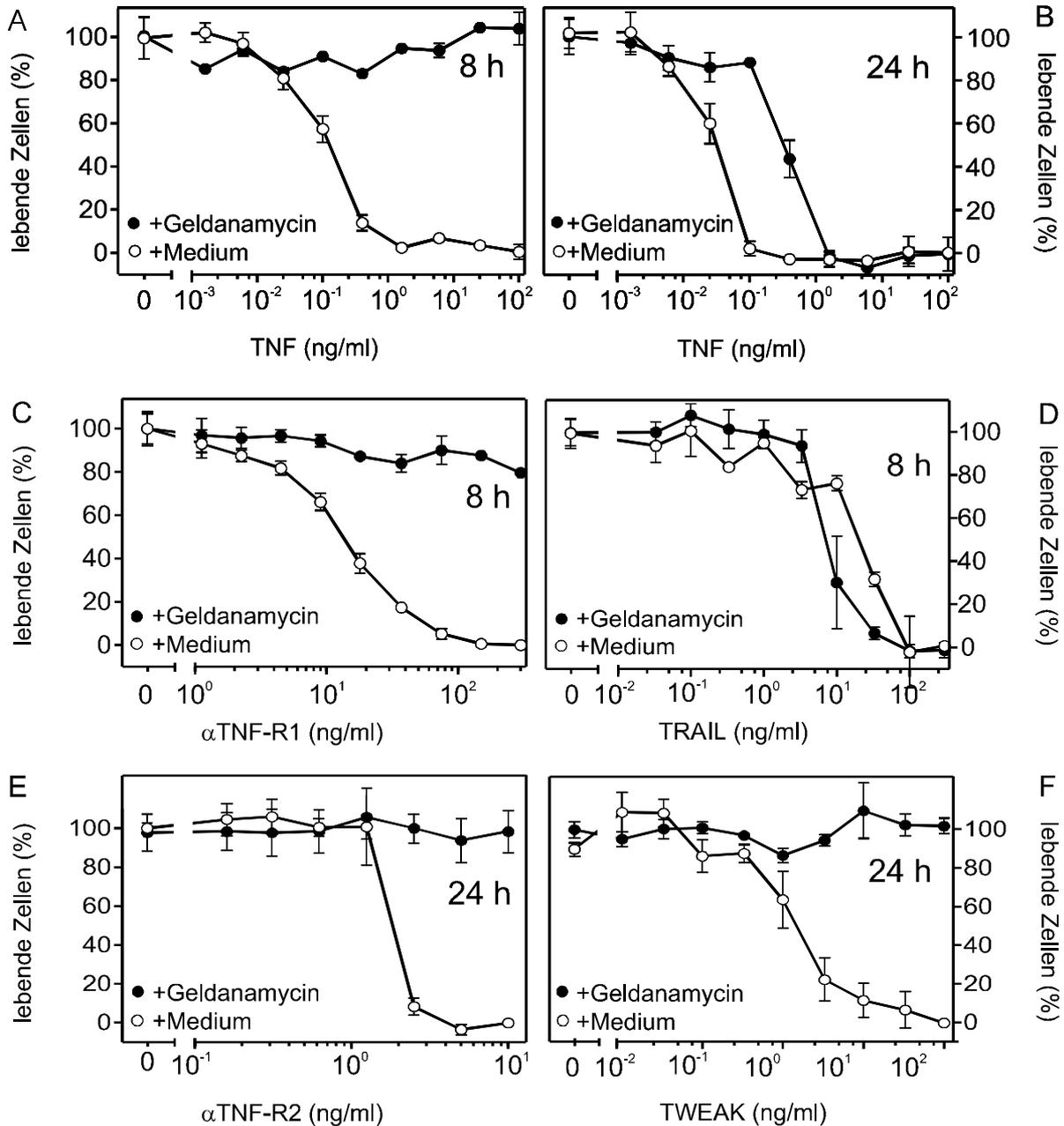
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Die Blockierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert TNF- und TWEAK-vermittelte Apoptose

#### 5.1.1 Geldanamycin schützt Kym-1-Zellen vor TNF und TWEAK-induzierter Apoptose

Zur Induktion der Apoptose benötigen die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie normalerweise eine Todesdomäne (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993; Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley et al., 2001). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der TNF-R2, der keine Todesdomäne besitzt, in Kym-1-Zellen ebenfalls Apoptose induzieren kann. Hierbei spielt die Induktion von endogenem TNF und die nachfolgende Stimulierung des Todesrezeptors TNF-R1 eine essentielle Rolle (Grell et al., 1999). In ähnlicher Weise induziert auch TWEAK, ein weiteres Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, das keinen Todesrezeptor aktiviert, Apoptose (Schneider et al., 1999). Eventuell spielt hierbei der TWEAK-bindende Nicht-Todesrezeptor Fn14 (Wiley et al., 2001) eine Rolle. Da der TNF-R1 selbst in der Lage ist endogenes TNF zu produzieren (Grell et al., 1999), sollte untersucht werden, ob dieses endogene TNF auch die TNF-R1-vermittelte Apoptose beeinflusst. Hierzu wurden Experimente mit Geldanamycin (GA) durchgeführt. Bei GA handelt es sich um eine Substanz, die das Hitzeschockprotein Hsp90 inhibiert (Whitesell et al., 1994). Die TNF-R1-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B kann durch diese Hsp90-Fehlfunktion auf mindestens zwei verschiedene Arten blockiert werden. Zum einen wird RIP, eine Hsp90-assoziierte Kinase, die eine essentielle Rolle für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch den TNF-R1 spielt (Ting et al., 1996; Kelliher et al., 1998), degradiert (Lewis et al., 2000) und zum anderen kann der IKK-Komplex nicht mehr zum TNF-R1 rekrutiert werden (Chen et al., 2002). In Kym-1-Zellen kann mit löslichem TNF (sTNF) sowie mit dem agonistischem TNF-R1-spezifischen mAk Htr-1 innerhalb von acht Stunden vollständiger Zelltod induziert werden. Im Vergleich dazu benötigt die TNF-R2- und TWEAK-induzierte Apoptose in Kym-1-Zellen 24 Stunden (Daten nicht gezeigt und Schneider et al., 1999). Diese Befunde stehen im Einklang mit der Tatsache, daß in diesen Fällen zuerst die Bildung von endogenem TNF induziert werden muß (Grell et al., 1999; Schneider et al., 1999). Abbildung 3 zeigt

die Wirkung von GA auf die TNF-, TRAIL- und TWEAK-induzierte Apoptose in Kym-1-Zellen:

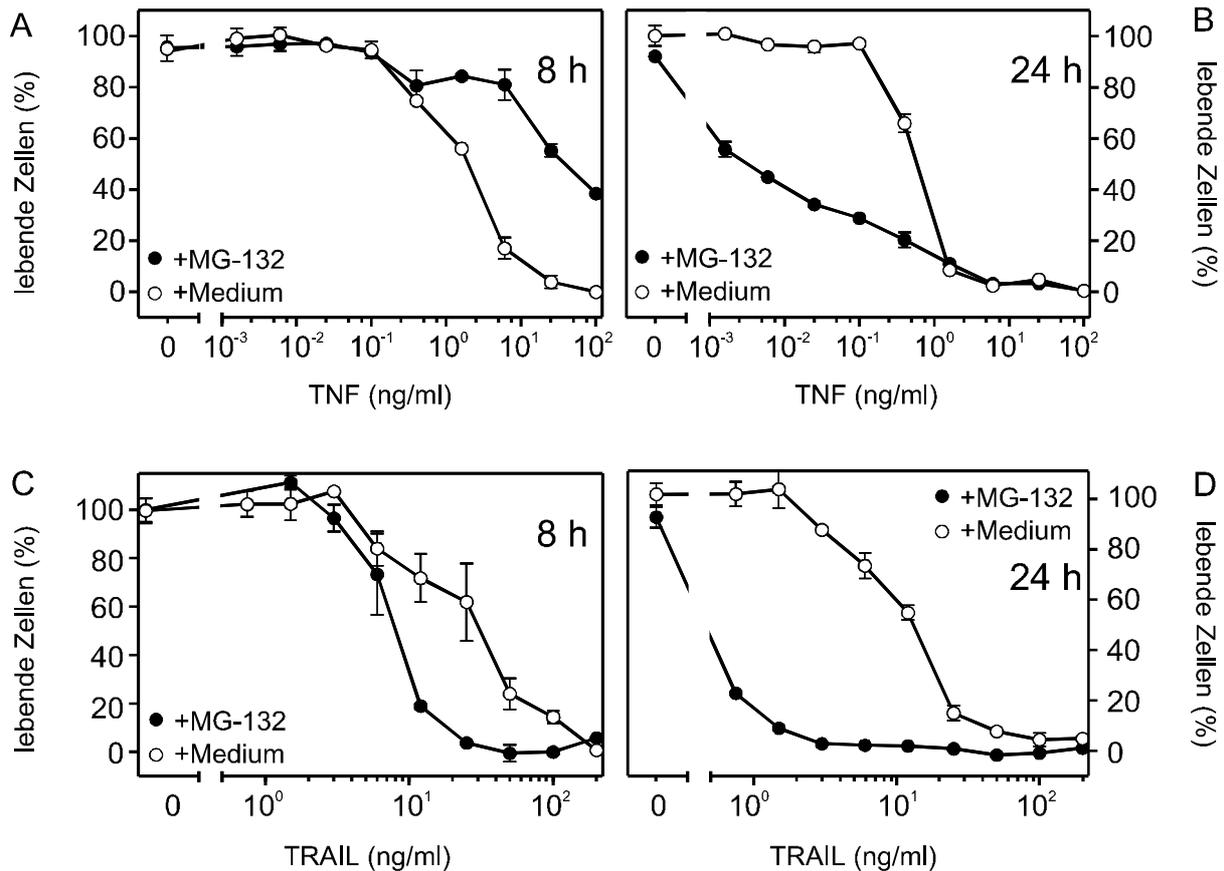


**Abbildung 3: Geldanamycin inhibiert die TNF-R1-, TNF-R2- und TWEAK-R-vermittelte Apoptose in Kym-1-Zellen.**  $20 \times 10^3$  Zellen pro well wurden  $\text{in } \text{in}$  in einer 96-well-Platte in mit Geldanamycin ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert (gefüllte Messpunkte) oder blieben unbehandelt (offene Messpunkte). Am nächsten Tag wurden folgende Apoptose-induzierende Substanzen für die angegebenen Zeiten in ansteigenden Konzentrationen zugegeben: TNF (A,B), monoklonaler TNF-R1-spezifischer Antikörper Htr-1 (C), TRAIL-Flag-M2-Komplex (D), anti-TNF-R2-spezifisches Kaninchen-IgG (E) und TWEAK-Flag-M2-Komplex (F). Abschließend wurden lebende Zellen mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

Bei nur achtstündiger Behandlung mit TNF oder dem TNF-R1-spezifischen mAk Htr-1 vermittelte GA einen nahezu vollständigen Schutz vor Apoptose (Abb. 3A und C). Wurden die Zellen dagegen 24 Stunden stimuliert, war nur noch ein geringfügiger anti-apoptotischer Effekt zu erkennen (Abb. 3B und Daten nicht gezeigt). Die TRAIL-vermittelte Apoptose jedoch konnte durch GA nicht blockiert werden, sondern wurde vielmehr noch verstärkt (Abb. 3D). Die durch Stimulation mit agonistischem TNF-R2-spezifischen IgG- oder TWEAK induzierte Apoptose, die nur indirekt über endogenes TNF und TNF-R1 erfolgt, konnte ebenfalls durch Vorstimulation mit GA verhindert werden (Abb. 3E und F). Da GA wie oben beschrieben die Kinase RIP degradiert und die Rekrutierung des IKK-Komplexes an den TNF-R1 verhindert, zeigen diese Ergebnisse, daß RIP und der IKK-Komplex für die Apoptose in Kym-1-Zellen wichtig sind.

### **5.1.2 Vergleich der Auswirkungen von GA und MG-132 auf die Apoptose in Kym-1-Zellen**

Die Inkubation mit GA kann noch viele andere z. T. unbekannte Auswirkungen auf eine Zelle haben. Daher sollte durch Einsatz eines zweiten Inhibitors gezeigt werden, daß die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges für den Schutz vor TNF-R1-induzierter Apoptose verantwortlich war. Abbildung 4 zeigt den Einfluß des Proteasomeninhibitors MG-132 auf die TNF- und TRAIL-vermittelte Apoptose. MG-132 verhindert die Degradation des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B, so daß der Transkriptionsfaktor nicht aktiviert werden kann. MG-132 konnte zwar Schutz gegen die durch lösliches TNF-induzierte Apoptose im acht-Stunden-Versuch vermitteln (Abb. 4A), verstärkte den Zelltod aber nach 24-stündiger TNF-Stimulation (Abb. 4B). Im Fall der TRAIL-induzierten Apoptose sensitivierte MG-132 die Kym-1-Zellen jedoch (Abb. 4C und D). Der protektive Effekt von GA auf die TNF-vermittelte Apoptose im Kurzzeit-Experiment ist im Vergleich zu MG-132 wesentlich ausgeprägter. Überdies hat MG-132 im 24-Stunden-Apoptose-Experiment sogar pro-apoptotische Aktivität, wohingegen GA noch immer einen leichten protektiven Effekt zeigt.

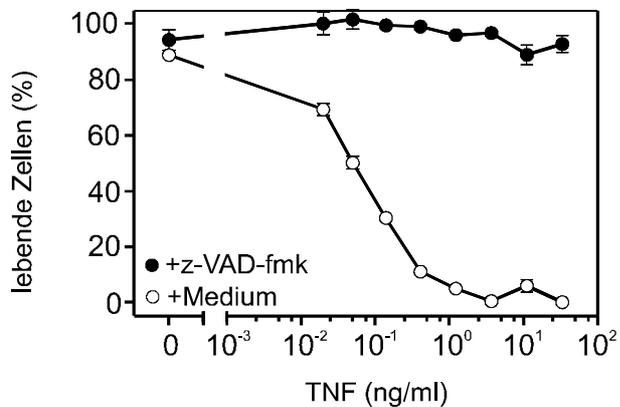


**Abbildung 4: Wirkung des Proteasomeninhibitors MG-132 auf die TNF- und TRAIL-induzierte Apoptose.**  $20 \times 10^3$  Zellen pro well wurden  $\ddot{u}N$  in einer 96-well-Platte bei  $37^\circ C$  kultiviert. Anschließend wurden folgende Apoptose-induzierende Substanzen für die angegebenen Zeiten in ansteigenden Konzentrationen zugegeben: TNF (A,B) und TRAIL-Flag-M2-Komplex (C,D). Ein Teil der Zellen wurde zuvor 15 Minuten mit  $10 \mu M$  MG-132 vorinkubiert (gefüllte Messpunkte), der andere Teil blieb unbehandelt (offene Messpunkte). Lebende Zellen wurden abschließend mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

### 5.1.3 Der TNF-induzierte Zelltod in Kym-1-Zellen ist abhängig von Caspasen

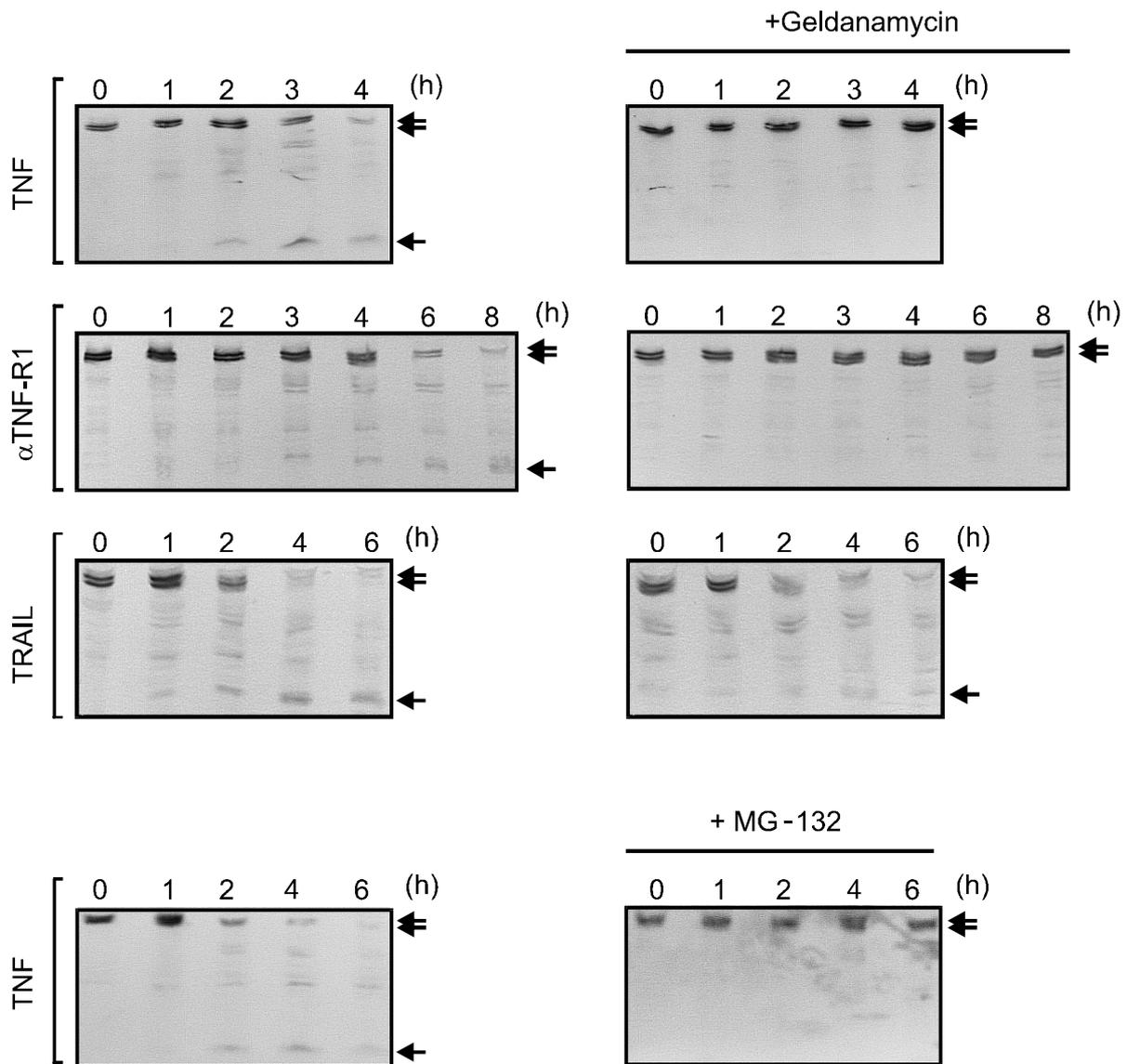
RIP spielt eine essentielle Rolle für die TNF-R1-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa B$  (Ting et al., 1996; Kelliher et al., 1998). Jedoch verläuft auch die TNF-induzierte Nekrose RIP abhängig (Holler et al., 2000). Daher könnte eine Vorbehandlung mit dem Inhibitor GA, der RIP degradiert (s. Kapitel 5.1.1.), auch Schutz gegen Nekrose vermitteln. Um festzustellen, ob bei den beobachteten TNF-R1-vermittelten zytotoxischen Effekten in Kym-1-Zellen Nekrose eine Rolle spielt, wurden die Zellen mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk vorbehandelt und daraufhin mit TNF, Htr-1 und TRAIL stimuliert. Z-VAD-fmk vermittelt vollständigen Schutz gegen die apoptotischen Effekte von Todesrezeptoren, inhibiert den Zelltod durch Nekrose jedoch nicht. Wie in Abbildung 5 gezeigt ist, inhibiert z-VAD-fmk die zytotoxische Wirkung aller verwendeten Stimuli (Abb.5). Es handelt sich hier also um Apoptose. Die protektive

Wirkung von GA kann folglich nicht auf der Inhibition von Nekrose beruhen. Die naheliegende Erklärung ist also, daß GA durch Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges ebenfalls die TNF-R1-vermittelte Apoptose inhibiert.



**Abbildung 5: Der TNF-induzierte Zelltod in Kym-1-Zellen erfolgt Caspase-abhängig.**  $20 \times 10^3$  Zellen pro well wurden in einer 96-well-Platte bei 37 °C kultiviert. Nach einer 30-minütigen Vorinkubation mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk (20  $\mu$ M) (gefüllte Messpunkte) oder zur Kontrolle Medium (offene Messpunkte) wurden die Zellen mit der angegebenen Konzentration TNF behandelt. Nach 24 h wurden lebende Zellen mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

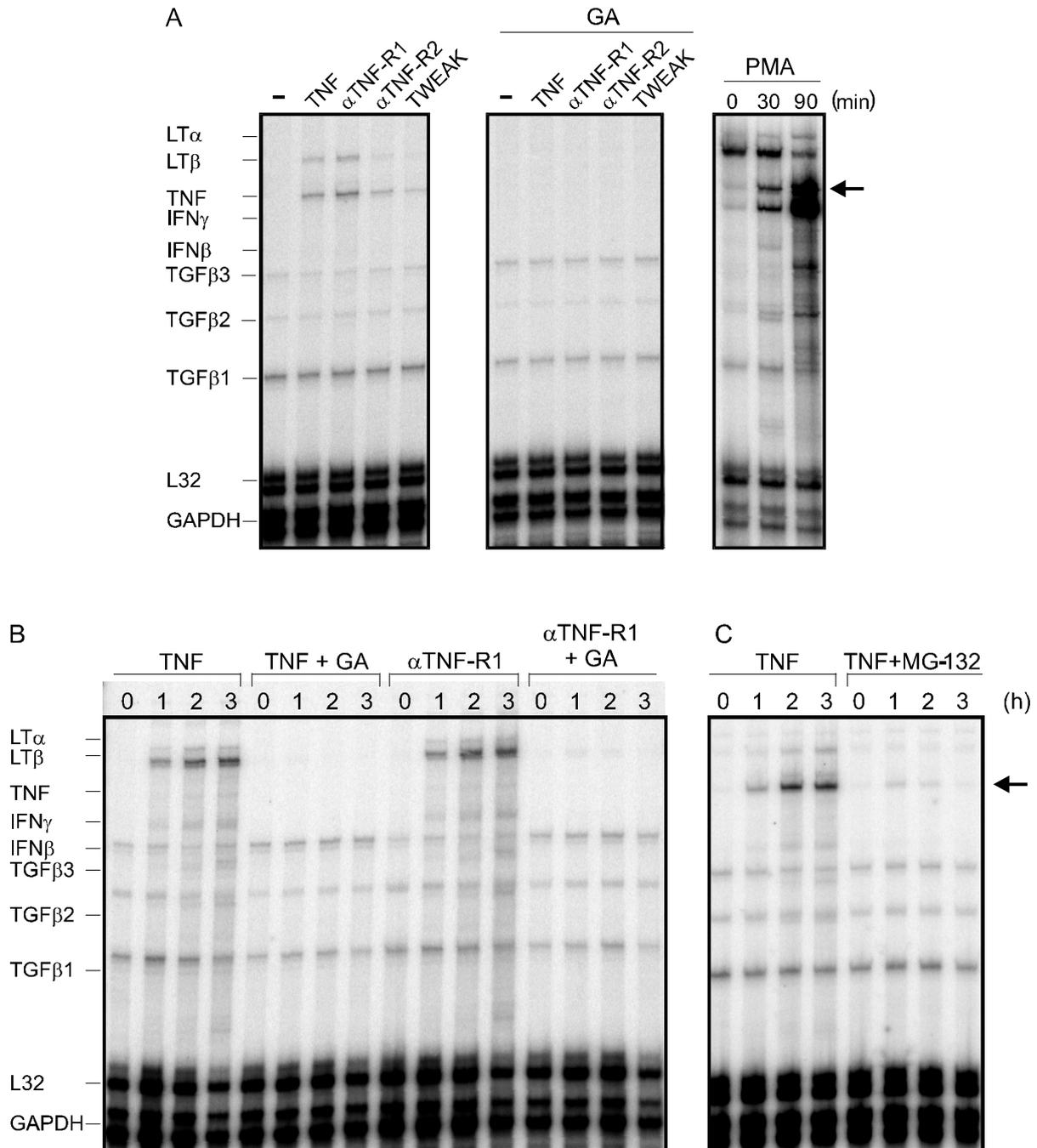
Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in Western-Blot-Experimenten gezeigt werden, daß Vorbehandlung der Zellen mit GA oder MG-132 die Aktivierung der Caspase-8 durch TNF oder Htr-1 inhibiert, nicht aber die TRAIL-induzierte Caspase-8-Prozessierung (Abb.6 und Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß TNF-R1-abhängige Geninduktion über NF- $\kappa$ B in Kym-1-Zellen einen wichtigen Beitrag zur TNF-R1-vermittelten Apoptose leistet.



**Abbildung 6: Die TNF-R1-induzierte Prozessierung der Caspase-8 wird sowohl durch Geldanamycin als auch durch MG-132 inhibiert.**  $500 \times 10^3$  Kym-1-Zellen pro Gruppe wurden in einer 6-well-Platte in An- oder Abwesenheit von  $0,5 \mu\text{M}$  Geldanamycin üN bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit TNF ( $20 \text{ ng/ml}$ ), dem TNF-R1-spezifischem mAk Htr-1 ( $250 \text{ ng/ml}$ ) oder TRAIL-Flag-M2-Komplex ( $100 \text{ ng/ml}$ ) für die angegebenen Zeiten behandelt. Den Gruppen, die mit MG-132 vorbehandelt wurden, wurde dieser Inhibitor 15 Minuten vor den apoptotischen Reagenzien in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  verabreicht. Abschließend wurden die Zellen lysiert und mittels eines Caspase-8-spezifischen mAk und einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundär-Antikörper im Western-Blot hinsichtlich Caspase-8-Prozessierung analysiert.

## **5.2 Geldanamycin und MG-132 inhibieren die TNF-R1-vermittelte Induktion von endogenem TNF.**

Im Folgenden wurde die Auswirkung von GA und MG-132 auf die TNF-R1-vermittelte Geninduktion untersucht. Zur Detektion von endogenem TNF wurde (mit freundlicher Unterstützung von Daniela Siegmund) ein „RNase protection assay“ mit einem Sonden-Set durchgeführt, das verschiedene humane Zytokine erfaßt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 7 gezeigt: Die Stimulation von Kym-1-Zellen mit TNF oder dem agonistischen TNF-R1-spezifischen mAk Htr-1 induzierte die Transkription von TNF-mRNA deutlich. Eine etwas schwächere Induktion ließ sich nach Stimulation der Zellen mit TNF-R2-spezifischen Antikörpern und TWEAK nachweisen (Abb. 7A). Eine erhöhte Transkription konnte auch bei bekannten NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen wie TRAF2 und c-IAP2 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vorbehandlung mit GA oder MG-132 inhibierte die Induktion von endogenem TNF in allen Fällen vollständig (Abb. 7A und C). Ferner erwies sich die TNF-R1-vermittelte Induktion des endogenen TNF als ein schneller Vorgang; innerhalb einer Stunde nach Stimulation war die halbmaximale Induktion erreicht (Abb. 7B und C).

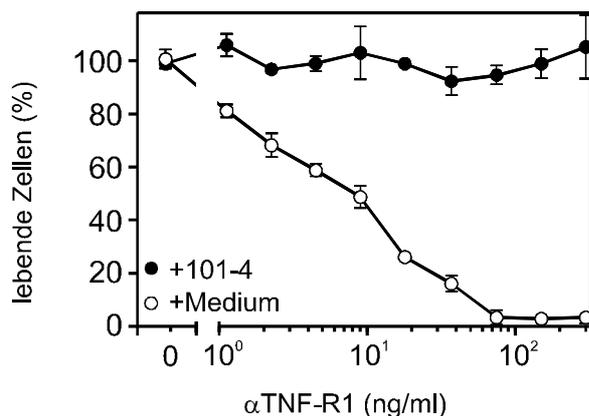


**Abbildung 7: Die TNF-R1-, TNF-R2- und TWEAK-R vermittelte Induktion von endogenem TNF kann durch Geldanamycin (GA) und MG-132 inhibiert werden.**  $2 \times 10^6$  Kym-1-Zellen wurden  $\dot{u}$ N in 10 cm-Zellkulturschalen in An- oder Abwesenheit von 0,5  $\mu$ M Geldanamycin kultiviert. (A) Anschließend wurden die Zellen für 8 h mit TNF (20 ng/ml), dem TNF-R1-spezifischen mAk Htr-1 (250 ng/ml), TNF-R2-spezifischem Kaninchen-IgG (5  $\mu$ g/ml) oder TWEAK-Flag-M2-Komplex (100 ng/ml) stimuliert. Um die Apoptose zu unterdrücken, wurden außerdem jeweils 20  $\mu$ M z-VAD-fmk zugegeben. Als Kontrolle für die TNF-Induktion wurde eine Gruppe PMA stimulierter primärer T-Zellen (siehe rechtes Bild) mitgeführt. (B) In einem parallelen Versuch ohne z-VAD-fmk wurde mit TNF (20 ng/ml) oder Htr-1 (250 ng/ml) für so kurze Zeiten (0-3 h) behandelt, daß der Großteil (90 %) der Zellen noch keine apoptotischen Symptome zeigte. (C) Ferner wurde auch nach 15-minütiger Inkubation mit MG-132 (10  $\mu$ M) wie in (B) beschrieben stimuliert. Abschließend wurde in allen Fällen die Gesamt-RNA isoliert und mittels „RNAse Protection Assay“ untersucht.

### 5.3 Endogen produziertes TNF spielt eine wichtige Rolle für die schnelle Apoptose-Induktion in Kym-1-Zellen

#### 5.3.1 Nachweis von endogen produziertem TNF auf Proteinebene

Bisher konnte endogenes TNF nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Als nächster Schritt wurde der Nachweis auf Proteinebene angestrebt. Hierfür wurde ein TNF-spezifischer mAk (357 101-4) mit neutralisierender Wirkung eingesetzt. Wie Abbildung 8 zeigt, ist in einem achtstündigen Apoptose-Experiment nach Einsatz des Antikörpers ein vollständiger Schutz der Kym-1-Zellen gegen die TNF-R1-vermittelte Apoptose beobachtbar. Da die Stimulation mit dem agonistischen TNF-R1-spezifischen mAk Htr-1 durchgeführt wurde, war sichergestellt, daß der neutralisierende Ak ausschließlich endogen produziertes TNF binden konnte. Dieses Experiment zeigt, daß endogenes TNF in der Tat eine ausschlaggebende Rolle für die TNF-R1-vermittelte Apoptose in Kym-1-Zellen spielt.

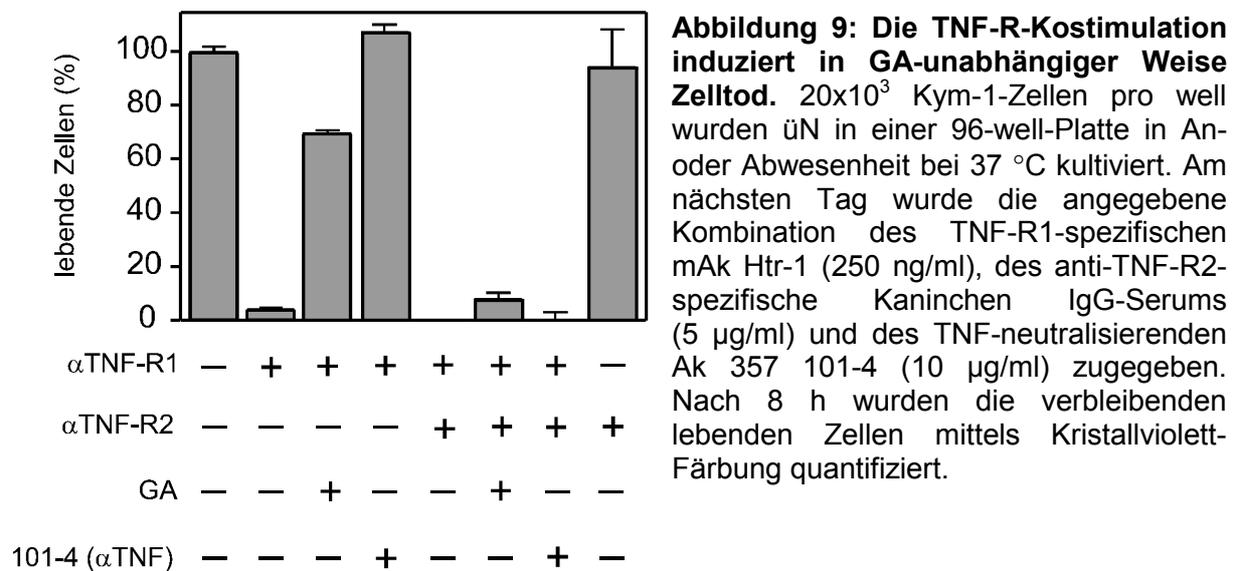


**Abbildung 8: Der neutralisierende TNF-spezifische Antikörper 357 101-4 blockiert den Zelltod durch TNF in Kym-1-Zellen.**  $20 \times 10^3$  Kym-1-Zellen pro well wurden  $\mu$ N in einer 96-well-Platte bei 37 °C kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen für 8 h mit dem TNF-R1-spezifischen mAk Htr-1 (250 ng/ml) in An- (gefüllte Messpunkte) oder Abwesenheit (offene Messpunkte) des neutralisierenden TNF-spezifischen Antikörpers 357 101-4 (10  $\mu$ g/ml) behandelt. Lebende Zellen wurden mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

#### 5.3.2 Endogen produziertes TNF aktiviert TNF-R2 in Kym-1-Zellen

Nachdem die Induktion von endogenem TNF nachgewiesen war, stellte sich die Frage, wie dieses endogene TNF pro-apoptotisch wirkt. Die in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzten TNF-Konzentrationen lagen im Sättigungsbereich, d. h. alle TNF-Rezeptoren sollten statistisch gesehen mit dem Liganden besetzt sein. Aufgrund dessen schien es unwahrscheinlich, daß die beobachtete Verstärkung der Apoptose auf eine effizientere Aktivierung des TNF-R1 zurückzuführen ist. Endogen produziertes TNF sollte vielmehr eine Funktion erfüllen, die das reichlich vorhandene lösliche TNF nicht erfüllen kann. Diese Überlegungen führten zu der Annahme, daß endogenes TNF in seiner membranständigen Form (memTNF) exprimiert wird. Aus

der Literatur ist bekannt, daß die Bioaktivität von löslichem und membranständigem TNF sehr verschieden ist. Während lösliches TNF den TNF-R1 sehr gut zu stimulieren vermag, hat es am TNF-R2 keine oder nur sehr begrenzte Aktivität. Membran-TNF hingegen ist ein potenter Aktivator beider TNF-Rezeptoren (Grell et al., 1995). Daher liegt die Vermutung nahe, daß das nach TNF-R1-Stimulation produzierte endogene TNF als memTNF gebildet wird und so den TNF-R2 stimulieren könnte. Um zu überprüfen, ob TNF-R2 an der TNF-R1-vermittelten Apoptose in Kym-1-Zellen beteiligt ist, wurden beide TNF-Rezeptoren nach GA-Behandlung gleichzeitig stimuliert. Tatsächlich gingen die Zellen infolge dieser Kostimulation trotz Inhibition des NF- $\kappa$ B-Weges durch GA, d. h. unabhängig von endogenem memTNF in die Apoptose (Abb. 9).

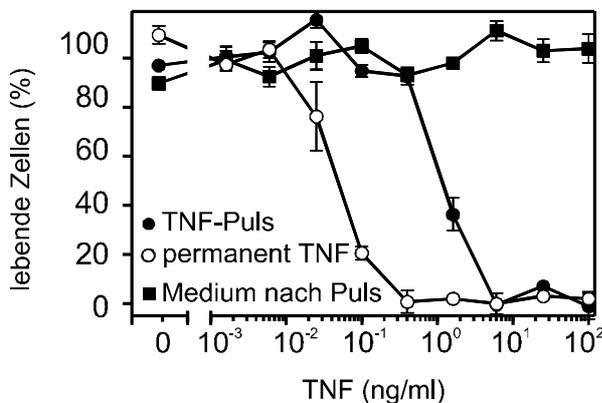


Das ist ein Hinweis darauf, daß die Aktivierung des TNF-R1 NF- $\kappa$ B-abhängig einen Stimulus für TNF-R2 induziert, der jedoch nicht mehr notwendig ist, wenn dieser Rezeptor bereits anderweitig aktiviert wird. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich bei diesem Stimulus um das endogen produzierte memTNF handelt.

### 5.3.3 Ein kurzer TNF-Puls führt zu vollständiger Apoptose in Kym-1-Zellen

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wieviel endogenes TNF durch Stimulierung des TNF-R1 produziert wird, wurden Puls-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die Kym-1-Zellen für ca. 30 Minuten mit TNF inkubiert, das TNF

anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Medium entfernt und die Zellen wie zuvor weiter kultiviert. Trotz diesem nur kurzen Kontakt mit dem TNF-Stimulus lief die Apoptose ungehindert ab (Abb. 10). Nur eine leichte Zeitverzögerung im Vergleich mit einer permanenten TNF-Behandlung war zu erkennen. Das gleiche Resultat ergab sich nach Abstoppen der TNF-Stimulation durch pH-3-haltigen Waschpuffer, durch welchen die Ligand-Rezeptorbindung zerstört wird (Daten nicht gezeigt). sTNF scheint nur einen kurzen Impuls an den Rezeptor zu geben und für die späteren Reaktionen nicht mehr zwingend nötig zu sein.

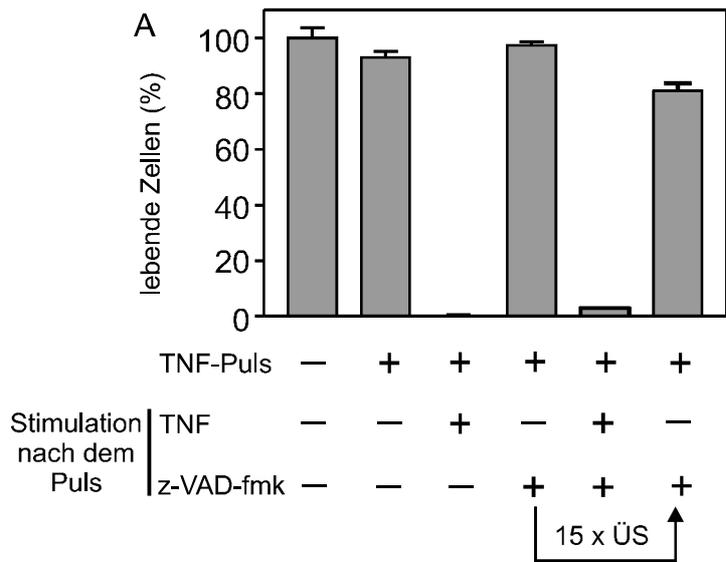


**Abbildung 10: Ein TNF-Puls reicht in Kym-1-Zellen zur Induktion der Apoptose aus.**  $20 \times 10^3$  Zellen pro well wurden  $\bar{u}N$  in einer 96-well-Platte bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen TNF stimuliert. Nach 30 Minuten wurde das TNF durch dreimaliges Waschen mit Medium entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde den Zellen entweder Medium (gefüllte Messpunkte, 30-minütiger „Puls“) oder dieselben TNF-Konzentrationen wie vor dem Waschen (offene Messpunkte, Kontrolle) zugegeben

und weiter  $\bar{u}N$  inkubiert. Zusätzlich wurde danach von den Gruppen mit TNF-Puls nach 30 Minuten Einwirkzeit ein Teil des neu zugegebenen Mediums entnommen und auf noch unbehandelte Kym-1-Zellen gegeben (quadratische Messpunkte) und ebenfalls  $\bar{u}N$  inkubiert, um evtl. nicht abgewaschenes TNF nachzuweisen.

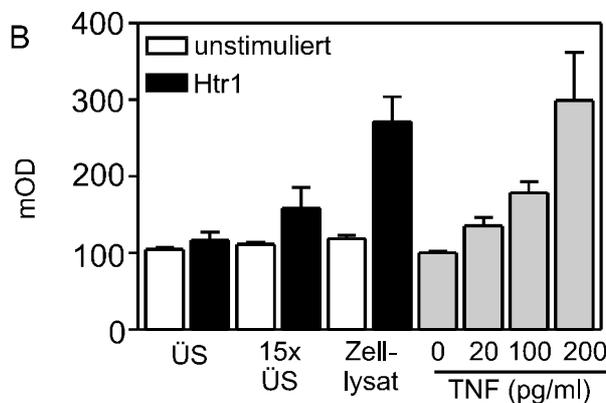
#### 5.4 Stimulation des TNF-R1 induziert Membran-TNF

Einige Umstände wiesen darauf hin, daß es sich bei dem durch TNF-R1-Aktivierung neu gebildeten TNF um die membranständige Form dieses Zytokins handeln könnte. Um dies zu verifizieren, wurden Kym-1-Zellen in Gegenwart von z-VAD-fmk mit einem TNF-Puls stimuliert. Der Caspase-Inhibitor sollte die Apoptose blockieren und zu einer Anreicherung von memTNF in der Zellmembran, bzw. sTNF in den Überständen führen. Nach acht Stunden wurden die Überstände der Kym-1-Zellen zusammen mit IFN- $\gamma$  auf HT-29-Zellen übertragen. Lösliches TNF induziert in diesen Zellen in Kombination mit IFN- $\gamma$  Nekrose (Nakayama et al., 2002 und Daten nicht gezeigt). Z-VAD-fmk und andere Caspase-Inhibitoren haben auf diese Art des Zelltodes keinen Einfluß (Vercammen et al., 1998a und 1998b). Daher eignen sich die sehr TNF-empfindlichen HT-29-Zellen hervorragend als „Biosensor“ um geringste TNF-Konzentrationen im Medium z-VAD-fmk-behandelter Zellen zu detektieren. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden die ÜS zusätzlich in 15-fach ankonzentrierter Form analysiert. In keinem Fall konnte Nekrose mit ÜS aus Htr1-stimulierten Kym-1-Zellen gemessen werden, d. h. bioaktives lösliches TNF konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 11A). Die ÜS der Kym-1-Zellen enthielten kein sTNF, dennoch wurde Apoptose der Kym-1-Zellen beobachtet, die durch Einsatz des TNF-spezifischen mAk (357 101-4) verhindert werden konnte (siehe 5.3.1). Folglich scheint memTNF die Apoptose in den Kym-1-Zellen zu induzieren. Um memTNF in Kym-1-Zellen direkt nachzuweisen, folgten weitere Analysen von ÜS und Zell-Lysaten, die aus Htr-1/z-VAD-fmk behandelten Zellen gewonnen wurden. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels Detergenz-haltigem Puffer, d. h. in den Lysaten war u. a. die Zellmembran enthalten, in der memTNF zu finden sein sollte. Da TNF nachgewiesen werden sollte, mußte der mAk Htr-1 zur Stimulation des TNF-R1 verwendet werden. Wie in Versuch 11A konnten auch mit Hilfe des ELISA nur äußerst geringe Spuren TNF in den einfachen sowie in ankonzentrierten ÜS nachgewiesen werden. In den Membran-haltigen Zell-Lysaten konnten jedoch signifikante Mengen TNF detektiert werden (Abb. 11B).

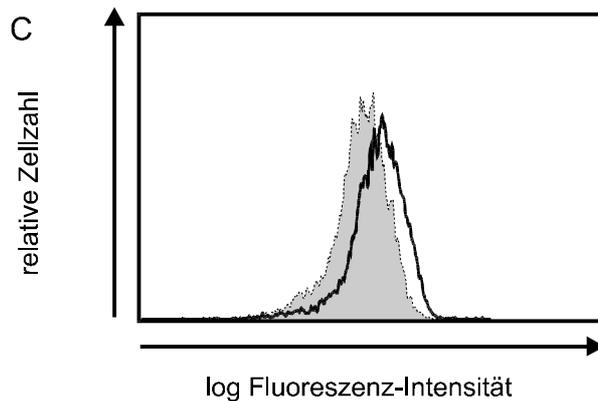


**Abbildung 11: Die Stimulation des TNF-R1 induziert die Expression von membranständigem TNF in Kym-1-Zellen.**

(A)  $20 \times 10^3$  Kym-1-Zellen wurden wie bereits in Abbildung 10 beschrieben kultiviert und mit einem 30-minütigen TNF-Puls (10 ng/ml) in Anwesenheit von z-VAD-fmk induziert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit der angegebenen Kombination von TNF (10 ng/ml) und z-VAD-fmk (20  $\mu$ M) supplementiert und  $\ddot{u}$ N inkubiert. Am nachsten Tag wurde ein Teil der  $\ddot{U}$ berstande gemeinsam mit IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) auf ebenfalls in 96-well-Platten ausgesate HT-29-Zellen  $\ddot{u}$ berfuhrt. Ferner wurde jeweils ein Teil der  $\ddot{U}$ berstande, die nach dem TNF-Puls nur z-VAD-fmk erhalten hatten, 15-fach durch Dialyse mit PEG 6000 ankonzentriert und ebenfalls zusammen mit IFN- $\gamma$  auf HT-29-Zellen gegeben. Nach 36 h Kultivierung bei 37  $^{\circ}$ C wurde die Vitalitat der HT-29-Zellen mittels Kristallviolett-Farbung bestimmt.



(B)  $2 \times 10^6$  Kym-1-Zellen wurden in 10-cm-Zellkulturschalen bei 37  $^{\circ}$ C  $\ddot{u}$ N kultiviert und am folgenden Tag in Gegenwart von z-VAD-fmk (20  $\mu$ M) 8 h mit dem TNF-R1-spezifischen agonistischen mAk Htr-1 (250 ng/ml) stimuliert. Zur Kontrolle wurde eine Schale Zellen nur mit z-VAD-fmk behandelt (offene Balken). Anschließend wurde die TNF-Konzentration in den einfachen  $\ddot{U}$ berstanden, 15-fach ankonzentrierten  $\ddot{U}$ berstanden sowie in Zell-Lysaten ( $10^7$  Zellaquivalente/ml) mittels eines TNF-spezifischen ELISAs bestimmt.



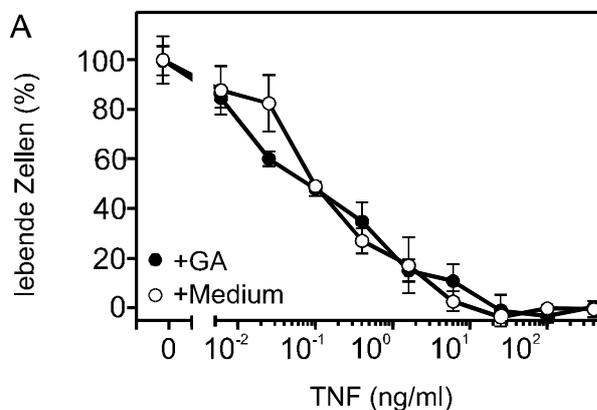
(C)  $1 \times 10^6$  Kym-1-Zellen wurden fur 24 h mit z-VAD-fmk (20  $\mu$ M) allein (graue Flache, gestrichelte Linie) oder einer Kombination aus z-VAD-fmk und TNF (30 ng/ml) (durchgehende Linie) bei 37  $^{\circ}$ C kultiviert. Membranstandiges TNF wurde dann durch FACS-Analyse nachgewiesen. Um mogliche Komplexe aus Membran-TNF und TNF-Rezeptoren zu trennen, wurden die Zellen bei der FACS-Analyse vor der Inkubation mit TNF-spezifischem Antikorper 90 sec bei pH 3 gewaschen.

Mittels verschiedener Konzentrationen an sTNF, die als Kontrolle ebenfalls im ELISA analysiert wurden, konnte eine TNF-Eichkurve erstellt werden. Ausgehend von einem Molekulargewicht von 55000 g/mol für das aktive TNF-Trimer (Smith et al., 1987) konnte die Zahl der memTNF-Moleküle pro Zelle folgendermaßen abgeschätzt werden:

Mittels Loschmidtscher Zahl wurde das Gewicht eines TNF-Trimers von  $9,13 \times 10^{-20}$  g ermittelt. Wenn angenommen wird, daß 200 pg TNF etwa der Menge des Zytokins in einer Million stimulierter Kym-1-Zellen entspricht (die eingesetzten 100 µl Lysat entsprachen ca. einer Million Zellen), so sind das ca.  $2,19 \times 10^9$  Trimere. Rein rechnerisch ergeben sich so 2190 TNF-Trimere pro Zelle. Nach über-Nacht-Behandlung mit TNF und z-VAD-fmk wurden die Zellen außerdem einer FACS-Analyse unterzogen. Passend zum ELISA konnte auch auf diese Weise eine signifikante, schwache Expression von membranständigem TNF nachgewiesen werden (Abb. 11C).

### 5.5 HeLa-Zellen produzieren kein endogenes TNF nach TNF-R1-Stimulation und benötigen permanente TNF-Stimulation zur Apoptose-Induktion

Die beschriebene Verstärkung der TNF-R1-vermittelten Apoptose durch endogenes TNF und TNF-R2 ist nicht in jedem Zelltyp zu finden. Abbildung 12 zeigt, daß eine Behandlung von HeLa-Zellen mit GA keinerlei Schutz gegen die TNF-induzierte Apoptose bewirkte. Dies korreliert mit dem Unvermögen dieser Zellen, Membran-TNF nach TNF-R1-Stimulation zu bilden (Weiss et al., 1997 und Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 12: Die TNF-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen kann durch Geldanamycin nicht inhibiert werden und benötigt einen permanenten TNF-Stimulus.**  $20 \times 10^3$  HeLa-Zellen pro well wurden in einer 96-well-Platte für 9 h mit 0,5 µg/ml Geldanamycin (gefüllte Messpunkte) bei 37 °C kultiviert oder blieben unbehandelt (offene Messpunkte). Anschließend wurde nach 30-minütiger Vorstimulation mit CHX (2,5 µg/ml) TNF in ansteigenden Konzentrationen zugegeben und üN inkubiert. Danach wurden lebende Zellen mittels Kristallviolett-Färbung quantifiziert.

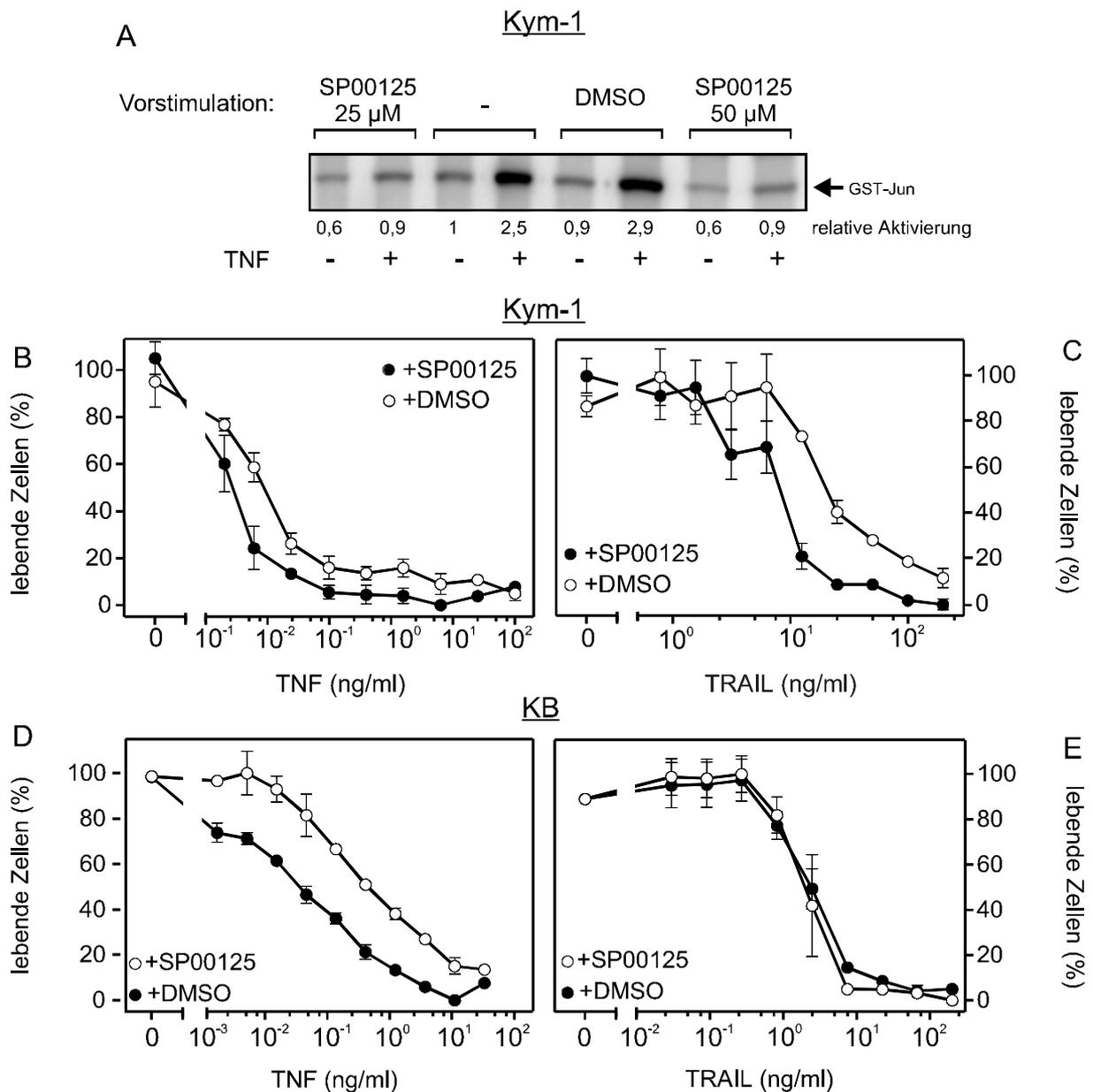
---

Ein TNF-Puls reicht in HeLa-Zellen zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges und der IL-6-Produktion aus. Die Apoptose-Induktion benötigt jedoch die permanente Stimulation mit TNF (persönliche Mitteilung von Mariola Fotin-Mleczek). Dies spricht dafür, daß in HeLa-Zellen auch eine schnelle Induktion von anti-apoptotischen NF- $\kappa$ B-abhängigen Faktoren erfolgt. Für apoptotische Reaktionen ist aber ein längerer Kontakt zwischen Rezeptor und Ligand notwendig, da die Zellen nicht in der Lage sind, die TNF-R1-Stimulation durch selbstproduziertes TNF aufrechtzuerhalten.

## 5.6 JNK-Aktivierung und Apoptose

### 5.6.1 Die Aktivierung der JNK hat keinen signifikanten Einfluß auf die TNF-induzierte Apoptose in Kym-1- und KB-Zellen

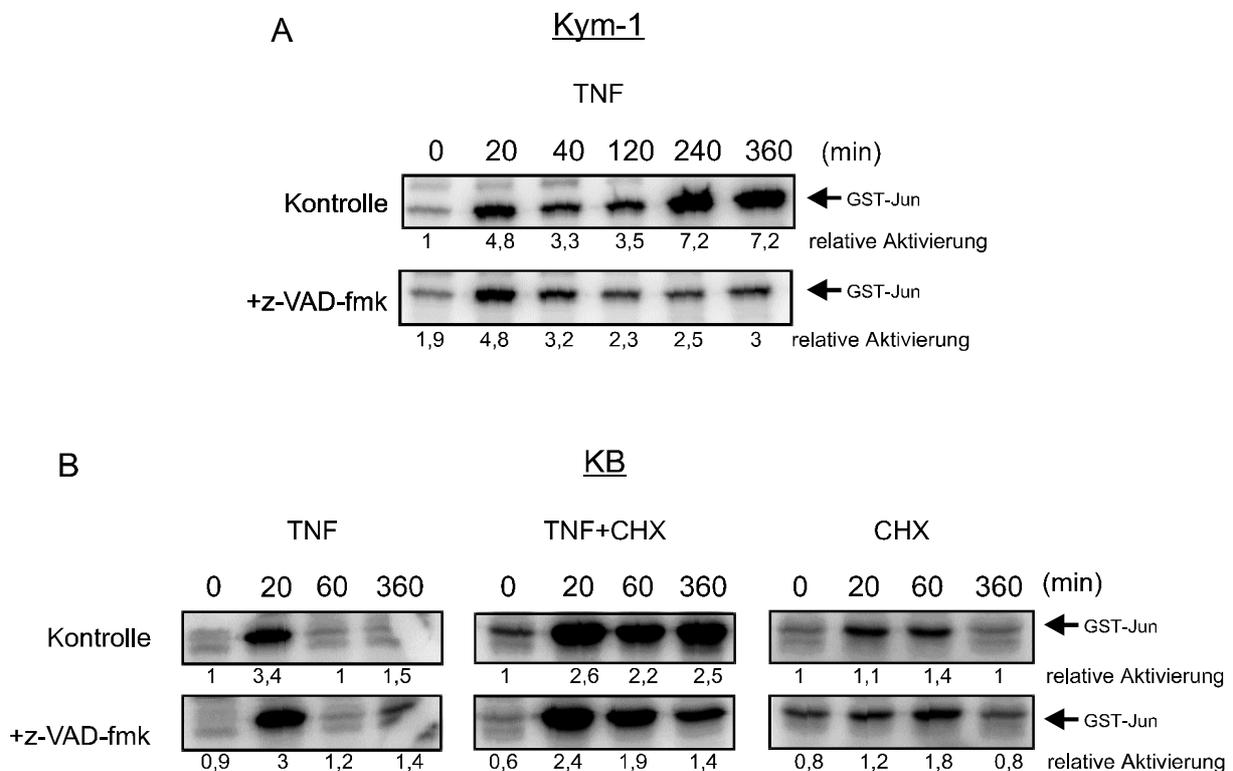
Stimulation des TNF-R1 hat neben der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Apoptose-Induktion auch die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) zur Folge (Sluss et al., 1994, Jupp et al., Shaulian und Karin 2002; Wajant et al., 2002). Neuere Literaturdaten deuten auf einen „Crosstalk“ zwischen Apoptose und Aktivierung der JNK hin, wobei noch umstritten ist, ob die JNK positiven oder negativen Einfluß auf den Zelltod hat (De Smaele et al., 2001; Tang et al., 2001b; Sanna et al., 2002). Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung eines vor kurzem publizierten Anthrapyrazolon-Inhibitors der JNK auf die TNF-R1-vermittelte Apoptose in Kym-1-Zellen untersucht. Dieser Inhibitor (SP00125) bewirkt eine spezifische Inhibition aller drei bekannten JNKs (Bennett et al., 2001). Abbildung 13 zeigt den Einfluß des Inhibitors auf die TNF- und TRAIL-vermittelte Apoptose in Kym-1- und KB-Zellen. Obwohl der Inhibitor die TNF-vermittelte JNK-Aktivierung in Kym-1-Zellen unterdrückte (Abb. 13A), hatte er keinen Einfluß auf die TNF- (Abb. 13B,D), und TRAIL-induzierte Apoptose (Abb. 13C,E) sowohl in Kym-1- wie auch in KB-Zellen. Die JNK-Aktivierung hat in den untersuchten Zell-Linien daher vermutlich keine, oder nur eine untergeordnete Rolle in der TNF- und TRAIL-induzierten Apoptose.



**Abbildung 13: Die Aktivierung der JNK spielt in Kym-1- und KB-Zellen nur eine untergeordnete Rolle in der TNF- und TRAIL-induzierten Apoptose.** (A)  $1 \times 10^6$  Kym-1-Zellen wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und  $\ddot{u}$ N bei 37  $^{\circ}$ C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 1 h mit dem JNK-Inhibitor SP00125 in Gegenwart der gleichen Menge DMSO (s.u.) oder nur DMSO vorinkubiert und anschließend mit TNF (10 ng/ml) f $\ddot{u}$ r 20 min inkubiert oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach Lyse der Zellen wurde die JNK-Aktivierung mittels Immunokomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun(5-89) als Substrat und  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP am Phosphoimager bestimmt (siehe auch Kapitel Material und Methoden). (B,C,D,E)  $20 \times 10^3$  Kym-1-Zellen (B,C) bzw. KB-Zellen (D,E) pro well wurden  $\ddot{u}$ N in einer 96-well-Platte bei 37  $^{\circ}$ C kultiviert. Am n $\ddot{a}$ chsten Tag wurden die Zellen 1 h mit dem JNK-Inhibitor SP00125 (Kym-1-Zellen 50  $\mu$ M, KB-Zellen 25  $\mu$ M) inkubiert (gef $\ddot{u}$ llte Messpunkte). Pro eingesetztem Mikroliter Inhibitor-Stamml $\ddot{o}$ sung wurde zus $\ddot{a}$ tzlich ein Mikroliter DMSO zugegeben, um die Stabilit $\ddot{a}$ t des Inhibitors zu gew $\ddot{a}$ hrleisten. Die Kontrollgruppen ohne Inhibitor wurden mit einer entsprechenden Menge an DMSO behandelt (offene Messpunkte). Anschließend wurde TNF (B,D) oder TRAIL-Flag-M2-Komplex (C,E) in ansteigenden Konzentrationen zugegeben. Nach 8 h wurden lebende Zellen mittels Kristallviolett-F $\ddot{a}$ rbung quantifiziert.

### 5.6.2 Mechanismen der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung

Umgekehrt sollte nun untersucht werden, ob Apoptose Auswirkungen auf die Aktivierung der JNK hat. Dazu wurden Kym-1- und KB-Zellen für einen Zeitraum von sechs Stunden mit TNF stimuliert. Um apoptotische Bedingungen zu schaffen, wurden die KB-Zellen zusätzlich mit CHX behandelt (Wajant et al. 2000). Diese Maßnahme war bei Kym-1-Zellen unnötig, da diese bereits ohne CHX durch TNF-Behandlung sterben (siehe auch Abb. 3A,B). Nach Lyse der Zellen wurde ein Immunkomplex-Assay mit GST-c-Jun (5-89) als Substrat durchgeführt. Abbildung 14 zeigt die Aktivierung der JNK durch TNF und TRAIL in Kym-1- und KB-Zellen.

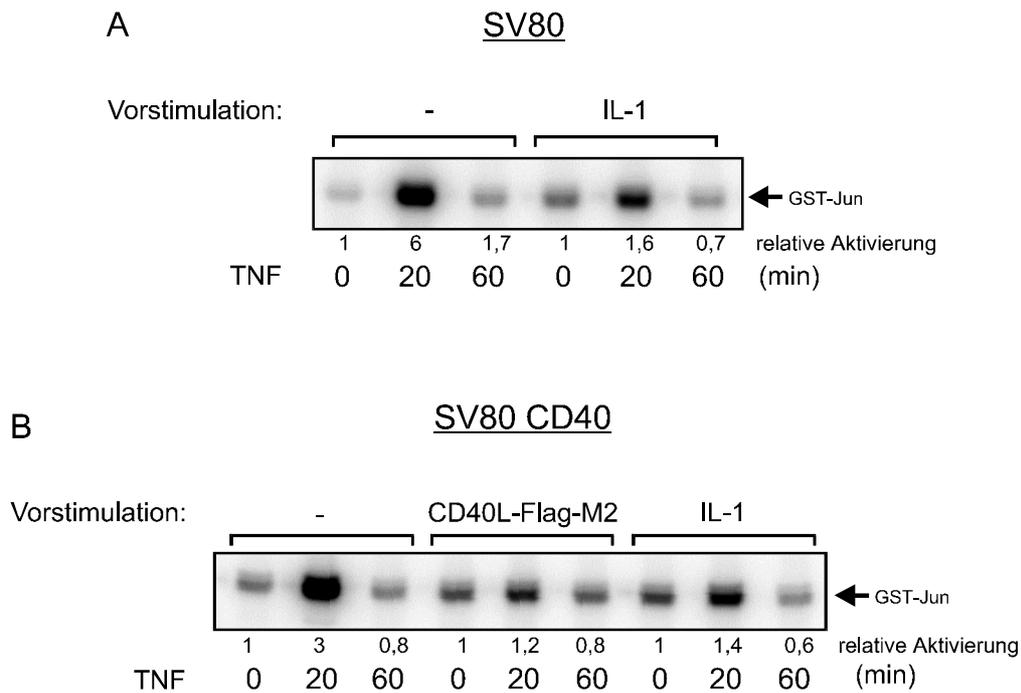


**Abbildung 14: Die transiente TNF-induzierte JNK-Aktivierung erfolgt Caspase-unabhängig; die verlängerte JNK-Aktivierung hingegen ist Caspase-abhängig.**  $1 \times 10^6$  Kym-1- oder KB-Zellen pro Gruppe wurden in 6-cm-Zellkulturschalen ausgesät und üN bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 30 min mit z-VAD-fmk vorstimuliert oder unbehandelt gelassen und anschließend für die angegebenen Zeiten mit TNF (10 ng/ml) stimuliert. Bei den KB-Zellen wurde zusätzlich eine Zeitreihe mit TNF und CHX (2,5 µg/ml) erstellt, da in diesen Zellen TNF nur in Gegenwart von CHX Caspasen und Apoptose aktiviert. Nach Lyse der Zellen wurde die JNK-Aktivierung mittels Immunkomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun(5-89) als Substrat und  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP am Phosphoimager bestimmt (siehe auch Kapitel Material und Methoden).

TNF-Behandlung führte bereits nach 20 Minuten zu einer Aktivierung der JNK (Sluss et al., 1994; Mühlenbeck et al., 1998) (Abb. 14A und B oben). Diese schnelle Aktivierung der Kinase ist transient. Nach vier Stunden (Kym-1-Zellen) bis sechs Stunden (KB-Zellen) Behandlung mit TNF konnte wieder eine JNK-Aktivierung beobachtet werden (Abb. 14A und B oben). Da die Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits sterben, könnte es sich bei dieser verzögerten JNK-Aktivierung um eine Folge der Apoptose handeln. Um dies eingehender zu prüfen, wurden die Zellen in Anwesenheit von z-VAD-fmk mit TNF stimuliert. Die späte JNK-Aktivierung konnte dabei durch Zugabe des Caspase-Inhibitors unterdrückt werden, wohingegen die schnelle, transiente JNK-Aktivierung nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 14A und B unten). Zudem war nach Stimulierung der KB-Zellen mit TNF unter nicht-apoptotischen Bedingungen d. h. ohne CHX, die späte Aktivierung der Kinase nicht zu beobachten. Die frühe JNK-Aktivierung fand dagegen weiterhin statt (Abb. 14B links). Diese Resultate deuten darauf hin, daß die späte TNF-vermittelte JNK-Aktivierung, die unter apoptotischen Bedingungen auftritt, von Caspasen abhängig ist.

### **5.6.3 Die transiente TNF-vermittelte JNK-Aktivierung wird durch Vorstimulation mit NF- $\kappa$ B-induzierenden Liganden inhibiert**

Unter nicht-apoptotischen Bedingungen konnte ein weiterer Aspekt der transienten JNK-Aktivierung durch TNF-R1 beobachtet werden: Der Einfluß einer vorangehenden Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges auf die JNK. Hierfür wurden SV80-Wildtyp-Zellen bzw. CD40- überexprimierende SV80-Zellen (SV80-CD40) mit den NF- $\kappa$ B-aktivierenden Zytokinen IL-1 und CD40L für sechs Stunden stimuliert. Zur JNK-Aktivierung wurden die Zellen daraufhin für 0-60 Minuten mit TNF behandelt. Abbildung 15 zeigt die Auswirkungen der IL-1/CD40L-Vorstimulation auf die TNF-R1-induzierte frühe JNK-Aktivierung: Die Vorstimulation der Zellen mit IL-1 bzw. CD40L inhibierte die frühe TNF-vermittelte JNK-Aktivierung deutlich um ca. 50 bis 60 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 15A und B). Das deutet darauf hin, daß die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch diese Liganden schützend wirken könnte. Die Caspase-abhängige, späte TNF-vermittelte JNK-Aktivierung konnte in diesem System nicht untersucht werden, da die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Induktion der Apoptose hemmt (Liu et al., 1996; Kreuz et al., 2001).



**Abbildung 15: Vorstimulation mit NF- $\kappa$ B-induzierenden Liganden inhibiert die TNF-induzierte JNK.**  $1 \times 10^6$  SV80- oder SV80-CD40-Zellen pro Gruppe wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und  $\ddot{u}$ N bei 37 °C kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen f $\ddot{u}$ r 6 h mit IL-1 (30 ng/ml) oder CD40L-Flag-M2-Komplex (200 ng/ml) vorstimuliert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen wie angegeben mit TNF (10 ng/ml) behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde die JNK-Aktivierung mittels Immunokomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun(5-89) als Substrat und  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP am Phosphoimager bestimmt (siehe auch Kapitel Material und Methoden).

## 5.7 Untersuchungen zur JNK-Aktivierung durch TRAIL und FasL

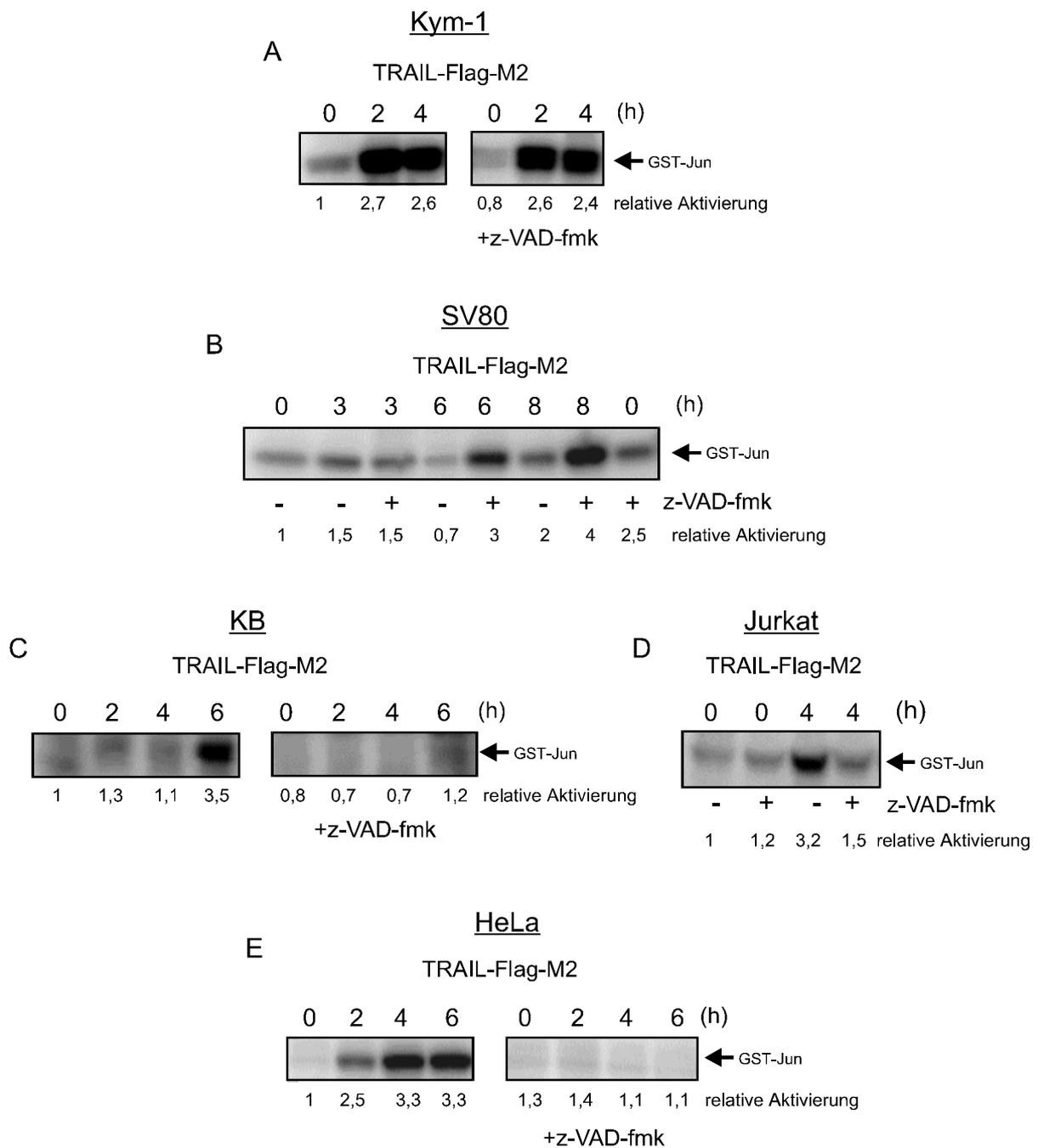
### 5.7.1 Die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung kann Caspase-abh $\ddot{a}$ ngig oder unabh $\ddot{a}$ ngig sein

TRAIL aktiviert in Kym-1- und HeLa-Zellen JNK. Allerdings setzt die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung im Vergleich zur TNF-induzierten JNK-Aktivierung deutlich zeitverz $\ddot{u}$ gert ein und h $\ddot{a}$ lt l $\ddot{a}$ nger an. (M $\ddot{u}$ hlenbeck et al., 1998). Die folgenden Untersuchungen sollen die Unterschiede zwischen TNF- und TRAIL-vermittelter JNK-Aktivierung n $\ddot{a}$ her charakterisieren. Verschiedene Zell-Linien wurden nach Stimulation mit vernetztem TRAIL (TRAIL-Flag-M2-Komplex) hinsichtlich i) JNK-Aktivierung und ii) Caspase-Abh $\ddot{a}$ ngigkeit der JNK-Aktivierung untersucht. Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von z-VAD-fmk kultiviert und anschlie $\ddot{s}$ end  $\ddot{u}$ ber einen Zeitraum von acht Stunden mit TRAIL stimuliert. Die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung erfolgte in allen Zellen sp $\ddot{a}$ t und blieb  $\ddot{u}$ ber den gesamten beobachteten

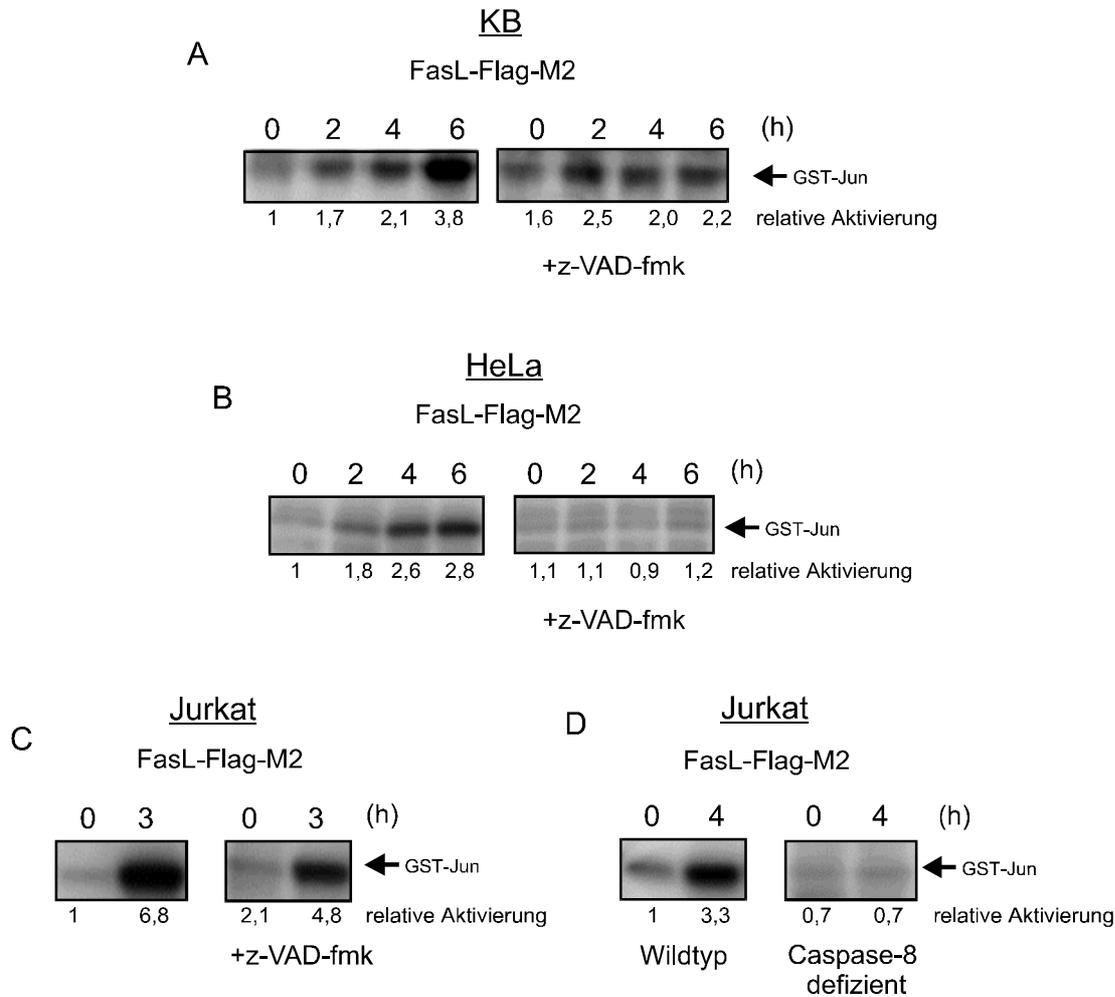
Zeitraum erhöht. TRAIL scheint jedoch nur über einen Mechanismus JNK-Aktivierung zu induzieren, da keine biphasische Aktivierung beobachtet werden konnte. Hinsichtlich der Abhängigkeit von Caspasen ergaben sich aber signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Zell-Linien: Abbildung 16 zeigt den Einfluß einer Caspase-Inhibition durch z-VAD-fmk auf die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung in verschiedenen Zell-Linien. In Kym-1- und SV80-Zellen wurde die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung durch z-VAD-fmk nicht inhibiert, sondern blieb unverändert oder wurde im Fall der SV80-Zellen noch verstärkt (Abb. 16A und B). Dagegen hemmte z-VAD-fmk die Aktivierung der JNK-Kinase durch TRAIL in KB-, Jurkat- und HeLa-Zellen vollständig (Abb. 16C, D und E). Anscheinend kann JNK Zelltyp-abhängig durch einen Caspase-abhängigen und einen Caspase-unabhängigen Signalweg induziert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Caspase-abhängige JNK eine Folge der Apoptose ist (siehe auch nächstes Kapitel).

### **5.7.2 Caspase-Abhängigkeit der FasL-vermittelten JNK-Aktivierung**

Da TRAIL und FasL sehr nah miteinander verwandte Mitglieder der TNF-Liganden-Familie sind (Wiley et al., 1995) und auch der Todesrezeptor Fas JNK zu aktivieren vermag (Cahill et al., 1996, Lenczowski et al., 1997; Yang et al., 1997), wurde nachfolgend die FasL-induzierte Aktivierung der Kinase näher betrachtet. Die Zell-Linien Kym-1 und SV80 konnten allerdings in dieses Experiment nicht miteinbezogen werden, da sie kein Fas exprimieren (Daten nicht gezeigt). Abbildung 17 zeigt die Aktivierung der JNK durch FasL unter dem Einfluß von z-VAD-fmk in KB-, HeLa- und Jurkat-Zellen. Die Stimulation aller Zell-Linien durch vernetzten FasL (FasL-Flag-M2-Komplex) ohne und mit Vorinkubation mit z-VAD-fmk ergab in allen Fällen eine eindeutige Abhängigkeit der JNK-Aktivierung von aktiven Caspasen (Abb. 17A, B und C).



**Abbildung 16: Die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung erfolgt je nach Zelltyp Caspase-abhängig oder unabhängig.**  $1 \times 10^6$  (Kym-1, SV80, KB, HeLa) bzw.  $10 \times 10^6$  (Jurkat) Zellen pro Gruppe wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und  $\mu$ N bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 30 min mit z-VAD-fmk vorbehandelt oder unbehandelt gelassen und anschließend für die angegebenen Zeiten mit TRAIL-Flag-M2-Komplex (100 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die JNK-Aktivierung mittels Immunokomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun(5-89) als Substrat und  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP am Phosphoimager bestimmt (siehe auch Kapitel Material und Methoden).



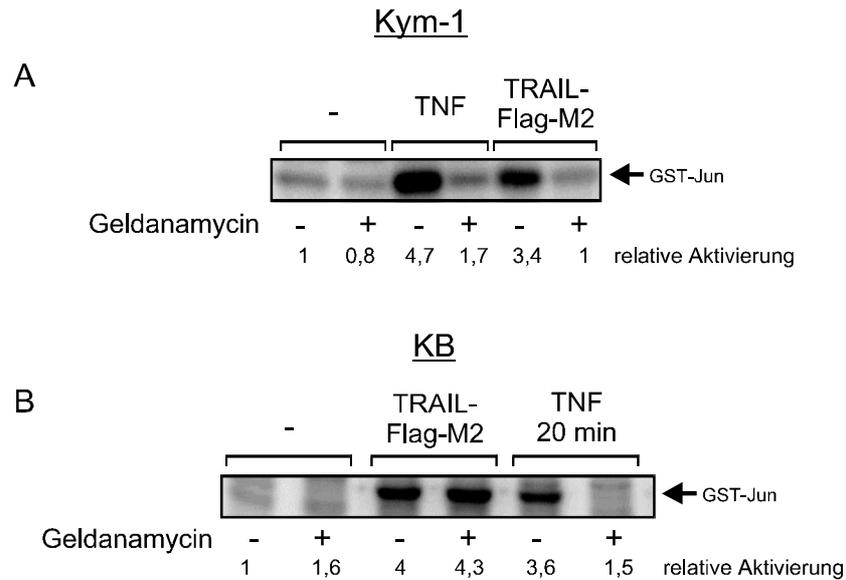
**Abbildung 17: Die Induktion der JNK durch FasL ist in KB-, HeLa- und Jurkat-Zellen Caspase-abhängig.**  $1 \times 10^6$  (KB, HeLa) bzw.  $10 \times 10^6$  (Jurkat) Zellen pro Gruppe wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und  $\bar{u}N$  bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 30 min mit z-VAD-fmk inkubiert oder unbehandelt gelassen und anschließend für die angegebenen Zeiten mit FasL-Flag-M2-Komplex (100 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die JNK-Aktivierung mittels Immunokomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun(5-89) als Substrat und  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP am Phosphoimager bestimmt (siehe auch Kapitel Material und Methoden).

Für HeLa-Zellen konnte jedoch durch Einsatz einer FADD-defizienten Zell-Linie gezeigt werden, daß diese JNK-Aktivierung unabhängig von der Aktivierung des apoptotischen Programms erfolgt (Mühlenbeck et al., 1998). Hierfür spricht auch die Tatsache, daß CHX zur Induktion der JNK nicht benötigt wird, für die Apoptose aber unerlässlich ist (Wajant et al., 2000). Jurkat-Zellen hingegen benötigen im Gegensatz zu HeLa- und KB-Zellen kein CHX, um in die Apoptose zu gehen (Daten nicht gezeigt). Durch Stimulation einer Caspase-8-defizienten Jurkat-Zell-Linie konnte gezeigt werden, daß diese Caspase für die JNK-Aktivierung in Jurkat-Zellen

ebenfalls eine Rolle spielt (Abb. 17D). In T-Zellen könnte die über Caspase-8-Aktivierung führende Induktion des apoptotischen Programms für die Aktivierung der JNK also durchaus von Bedeutung sein. Um auszuschließen, daß die Caspase-8 nicht über einen differentiellen, Apoptose-unabhängigen Mechanismus aktiviert wird, wären aber noch weitere Experimente erforderlich.

### **5.7.3 Die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung kann RIP-abhängig oder unabhängig sein.**

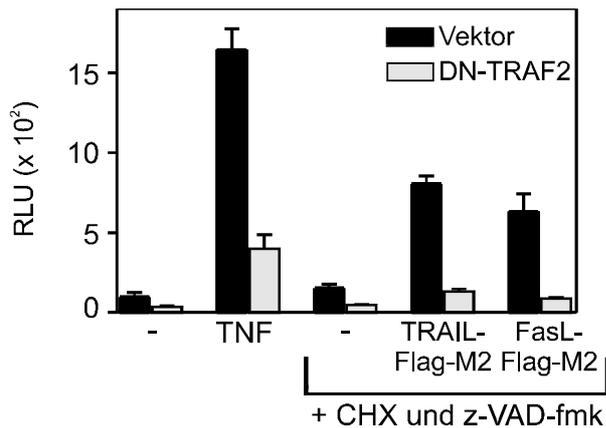
Um die Unterschiede zwischen der TNF- und TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung weiter zu analysieren, wurden Experimente mit dem bereits erwähnten Hsp90-Inhibitor GA durchgeführt. In diesem Fall war jedoch nicht die GA-vermittelte Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges von Interesse, sondern die Inhibition der Kinase RIP. Sowohl für die TNF-induzierte-, als auch für die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung spielt RIP eine bedeutende Rolle (Liu et al., 1996, Kelliher et al., 1998, Lin et al., 2000). Da jedoch bei der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung Zelltyp-spezifische Unterschiede existieren (siehe 5.7.1 und Mühlenbeck et al., 1998), wurde hier die Rolle von RIP für die TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung untersucht. Hierfür wurden Kym-1- und KB-Zellen verwendet, in welchen, wie zuvor gezeigt, die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung auf unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen scheint. Die Zellen wurden  $\bar{u}$ N mit GA behandelt und am folgenden Tag mit TNF oder TRAIL stimuliert. Kym-1-Zellen wurden vor der Zugabe von TNF und TRAIL mit z-VAD-fmk inkubiert, um die Apoptose-Induktion zu verhindern. Abbildung 18 zeigt die Wirkung von GA auf die TNF- und TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung in Kym-1- und KB-Zellen. Es ergaben sich Zelltyp-spezifische Unterschiede: Die JNK-Aktivierung durch TNF und TRAIL wurde in Kym-1-Zellen vollständig durch GA-Vorstimulation gehemmt (Abb. 18A), scheint also wie in der Literatur beschrieben RIP-abhängig zu sein. In den KB-Zellen konnte die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung durch GA nicht gehemmt werden (Abb. 18B). Folglich existieren mindestens zwei unterschiedliche Aktivierungswege für die TRAIL-vermittelte JNK-Induktion: i) Caspase-abhängig, aber RIP-unabhängig und ii) RIP-abhängig aber Caspase-unabhängig.



**Abbildung 18: Wirkung von Geldanamycin auf die TNF- und TRAIL-induzierte Aktivierung der JNK in Kym-1- und KB-Zellen.**  $1 \times 10^6$  Kym-1- oder KB-Zellen pro Gruppe wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät, nach Anheftung an den Plattenboden gegebenenfalls mit Geldanamycin ( $0,5 \mu\text{M}$ ) stimuliert und  $\text{in } 37^\circ\text{C}$  kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 30 min mit z-VAD-fmk ( $20 \mu\text{M}$ ) vorstimuliert um Apoptose zu verhindern und anschließend für die angegebenen Zeiten mit TNF ( $10 \text{ ng/ml}$ ) oder TRAIL-Flag-M2-Komplex ( $100 \text{ ng/ml}$ ) behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde die JNK-Aktivierung mittels Immunokomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun(5-89) als Substrat und  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  am Phosphoimager bestimmt (siehe auch Kapitel Material und Methoden).

### 5.8 Einfluß von TRAF2 und Filamin auf die NF- $\kappa\text{B}$ - und JNK-Aktivierung durch TNF, FasL und TRAIL

TRAF2 spielt eine wichtige Rolle für die Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  und JNK durch TNF und TRAIL (Liu et al., 1996, Lin et al., 2000; Tada et al., 2001). Es stellte sich die Frage, ob TRAF2 auch zur FasL-induzierten NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung beiträgt. Daher wurde die NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch TNF, TRAIL und FasL in HeLa-Wildtyp-Zellen und dominant-negatives TRAF2 überexprimierenden HeLa-Zellen untersucht. Bei den mit TRAIL oder FasL stimulierten Gruppen war, zur Aktivierung der Geninduktion, zusätzlich eine Vorbehandlung mit CHX und z-VAD-fmk erforderlich (Wajant et al., 2000). Es zeigte sich, daß die NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch TNF, TRAIL und FasL durch dominant negatives TRAF2 verhindert wird (Abb. 19). Die Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  durch FasL verläuft folglich ebenfalls TRAF2-abhängig.

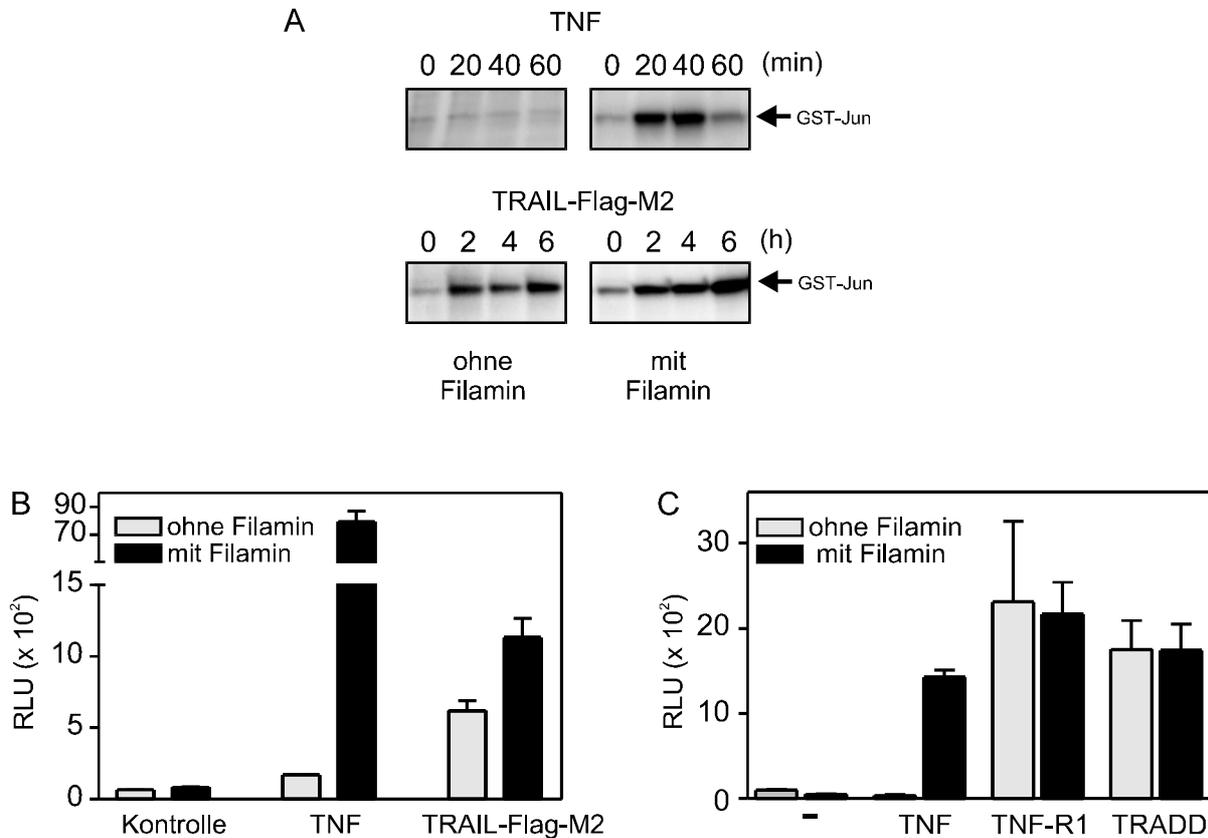


**Abbildung 19: TNF, TRAIL und FasL-induzierte NF- $\kappa$ Baktivierung ist TRAF2-abhängig.**  $15 \times 10^3$  HeLa-Zellen pro well wurden  $\ddot{u}$ N in einer 96-well-Platte bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen transient mit einem 3xNF- $\kappa$ B Luciferase-Reporter-Plasmid, sowie einem  $\beta$ -Galactosidase Expressionsplasmid mit konstitutiv aktivem SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Gleichzeitig wurde ein Teil der Zellen mit einem DN-TRAF2-Expressionsplasmid transformiert (gefüllte Balken) der andere Teil mit Vektor pcDNA3.1 (offene

Balken). Nachdem die Zellen  $\ddot{u}$ N Zeit zur Proteinexpression hatten, wurden sie für 8 h mit TNF (30 ng/ml), TRAIL-Flag-M2-Komplex (200 ng/ml) oder FasL-Flag-M2-Komplex (200 ng/ml) stimuliert. Bei der Stimulation mit TRAIL und FasL wurden die Zellen zusätzlich 30 min vor Stimulation mit einer Kombination aus CHX (2,5  $\mu$ g/ml) und z-VAD-fmk (20  $\mu$ M) inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung luminometrisch bestimmt (siehe Kapitel Material und Methoden).

Filamin, auch bekannt unter dem Namen Aktin-bindendes Protein 280, ist ein Protein im Zytoplasma, das an der Entstehung orthogonaler Aktin-Netzwerke beteiligt ist (Gorlin et al., 1990). Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß Filamin an die RING-Zink-Finger-Domäne von TRAF2 bindet. Hierdurch können TRAF2-abhängige Signalwege wie NF- $\kappa$ B- und JNK-Aktivierung durch TNF beeinflusst werden. In einer Filamin-defizienten humanen Melanom-Zell-Linie (M2) ist die TNF-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der JNK inhibiert. Durch Transfektion eines Filaminplasmids konnte der ursprüngliche wt-Phänotyp dieser Zellen wiederhergestellt werden. (Leonardi et al. 2000). Daher stellte sich die Frage, ob auch die TRAIL- und FasL-vermittelte JNK-Aktivierung durch Filaminmangel beeinflusst wird. Dies wurde anhand der bereits erwähnten Zell-Linien M2 und M2TA7 ermittelt. Wie sich herausstellte, konnte für die FasL-vermittelte JNK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung keine Aussage getroffen werden, da auch in den Filamin-haltigen Zellen keine nennenswerte Induktion durch FasL zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Abbildung 20 zeigt die Wirkung von Filamindefizienz auf die JNK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF und TRAIL: Im Falle der TRAIL-vermittelten JNK-Aktivierung zeigte sich, daß sie, im Gegensatz zur TNF-vermittelten Induktion, durch das Fehlen von Filamin nicht beeinträchtigt wird (Abb. 20A). Das gleiche Ergebnis erbrachte die Messung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung mittels Reporter-Gen-Assay. Auch hier hatte Filamin keinen Einfluß auf die Aktivierung durch TRAIL (Abb. 20B). Ferner ergab der Einsatz

des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk in den M2TA7-Zellen, daß in diesen Zellen die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung Caspase-unabhängig erfolgt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 20: Filamin ist essentiell für die TNF-induzierte Aktivierung von JNK und NF- $\kappa$ B.** (A)  $1 \times 10^6$  Filamin-enhaltende M2TA7- und Filamin-defiziente M2-Zellen pro Gruppe wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und  $\bar{u}$ N bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit TNF (10 ng/ml) und TRAIL-Flag-M2-Komplex (100 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die JNK-Aktivierung mittels Immunokomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun(5-89) als Substrat und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP am Phosphoimager bestimmt (siehe auch Kapitel Material und Methoden). (B)  $15 \times 10^3$  M2TA7- und M2-Zellen pro well wurden in 96-well-Platten  $\bar{u}$ N bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen transient mit einem 3xNF- $\kappa$ B Luciferase-Reporter-Plasmid, sowie einem  $\beta$ -Galactosidase Expressionsplasmid mit konstitutiv aktivem SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Nach 24 h wurden die Zellen für 8 h mit TNF (30 ng/ml) oder TRAIL-Flag-M2-Komplex (200 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung luminometrisch bestimmt (siehe Kapitel Material und Methoden). (C)  $15 \times 10^3$  M2TA7- und M2-Zellen pro well wurden in 96-well-Platten  $\bar{u}$ N bei 37 °C kultiviert. Danach wurden die Zellen transient mit einem 3xNF- $\kappa$ B Luciferase-Reporter-Plasmid, sowie einem  $\beta$ -Galactosidase Expressionsplasmid mit konstitutiv aktivem SV40-Promotor zur Normierung der Transfektionseffizienz transformiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit TNF-R1-Expressionsplasmid, TRADD-Expressionsplasmid oder Vektor pcDNA3.1 transformiert. Nach Inkubierung  $\bar{u}$ N und Lyse der Zellen wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung luminometrisch bestimmt (siehe Kapitel Material und Methoden).

---

Es war nun von Interesse, auf welcher Ebene Filamin mit der durch TNF aktivierten NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionskaskade interferiert. Daher wurde die Wirkung einer Überexpression von TNF-R1 und TRADD auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Filamin-defizienten Zellen getestet. Die Überexpression von sowohl TNF-R1 als auch TRADD bewirkte eine vergleichbar starke Aktivierung von NF- $\kappa$ B in M2- und M2TA7-Zellen (Abb. 20C). Das bedeutet, daß die Überexpression von Filamin die Filamin-defizienten M2-Zellen wieder zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B befähigt. Durch die Produktion vieler Moleküle TNF-R1 bei der Überexpression kommt es zu einer artifiziellen „Clusterung“ des Rezeptors, was seine Funktion wiederherzustellen scheint. Filamin könnte daher eine Funktion für die korrekte Organisation des TNF-R1 in der Zellmembran innehaben. Dies würde auch die Inhibition der TNF-vermittelten JNK-Aktivierung durch Filamin erklären.

## 6. Diskussion

### 6.1 Endogenes Membran-TNF verstärkt die TNF-R1-vermittelte Apoptose.

Viele Mitglieder der TNF-Rezeptorsuperfamilie besitzen eine zytoplasmatische Todesdomäne die der Vermittlung apoptotischer Signale dient (Locksley et al., 2001). Rezeptoren ohne diese Todesdomäne sollten eigentlich keine Apoptose initiieren können. Am Beispiel von TNF-R1 und TNF-R2 konnte jedoch gezeigt werden, daß durch „Crosstalk“ dieser beiden Rezeptoren die Induktion der Apoptose auch durch Stimulation des Nicht-Todesrezeptors TNF-R2 möglich ist (Grell et al., 1999). Auch TWEAK, CD30L und CD40L, die weitere Nicht-Todesrezeptoren aktivieren, vermitteln Apoptose durch Kooperation mit TNF-R1 (Schneider et al., 1999; Grell et al., 1999). Die Kooperation beruht darauf, daß die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch Stimulation der Nicht-Todesrezeptoren zur Induktion von endogenem TNF führt. Da auch die Stimulation des Todesrezeptors TNF-R1 in Kym-1-Zellen Produktion von endogenem TNF zur Folge hat (Grell et al., 1999), sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob dieses auch zur TNF-R1-vermittelten Apoptose beiträgt.

In Kurzzeit (acht Stunden)- und Langzeit (24 Stunden)-Apoptose-Experimenten wurde der Einfluß der Inhibitoren GA und MG-132, die beide den NF- $\kappa$ B-Signalweg inhibieren, auf die TNF- und TRAIL-induzierte Apoptose in Kym-1-Zellen untersucht. Beide vermittelten in Kurzzeit-Experimenten Schutz gegen die TNF-R1-vermittelte Apoptose, jedoch nicht gegen die TRAIL-induzierte Apoptose in Kym-1-Zellen (Abb. 3 und 4). Hierbei wurde zudem beobachtet, daß der protektive Effekt von GA im Vergleich zu MG-132 sehr viel stärker war. Nach Langzeit-Stimulation mit TNF oder Htr-1 war der schützende Effekt von GA noch beobachtbar, jedoch sehr viel weniger ausgeprägt. Im Fall der MG-132-Behandlung fand man dagegen sogar pro-apoptotische Aktivität dieses Inhibitors im 24-Stunden-Apoptose-Experiment. Es zeigten sich also Unterschiede in der Wirkung von GA und MG-132. Diese Unterschiede könnten ein Hinweis darauf sein, daß MG-132, im Gegensatz zu GA, einen weitreichenderen inhibitorischen Effekt ausübt, der anti-apoptotische Prozesse und Signalwege einschließt, die durch GA nicht inhibiert werden. So inhibiert MG-132

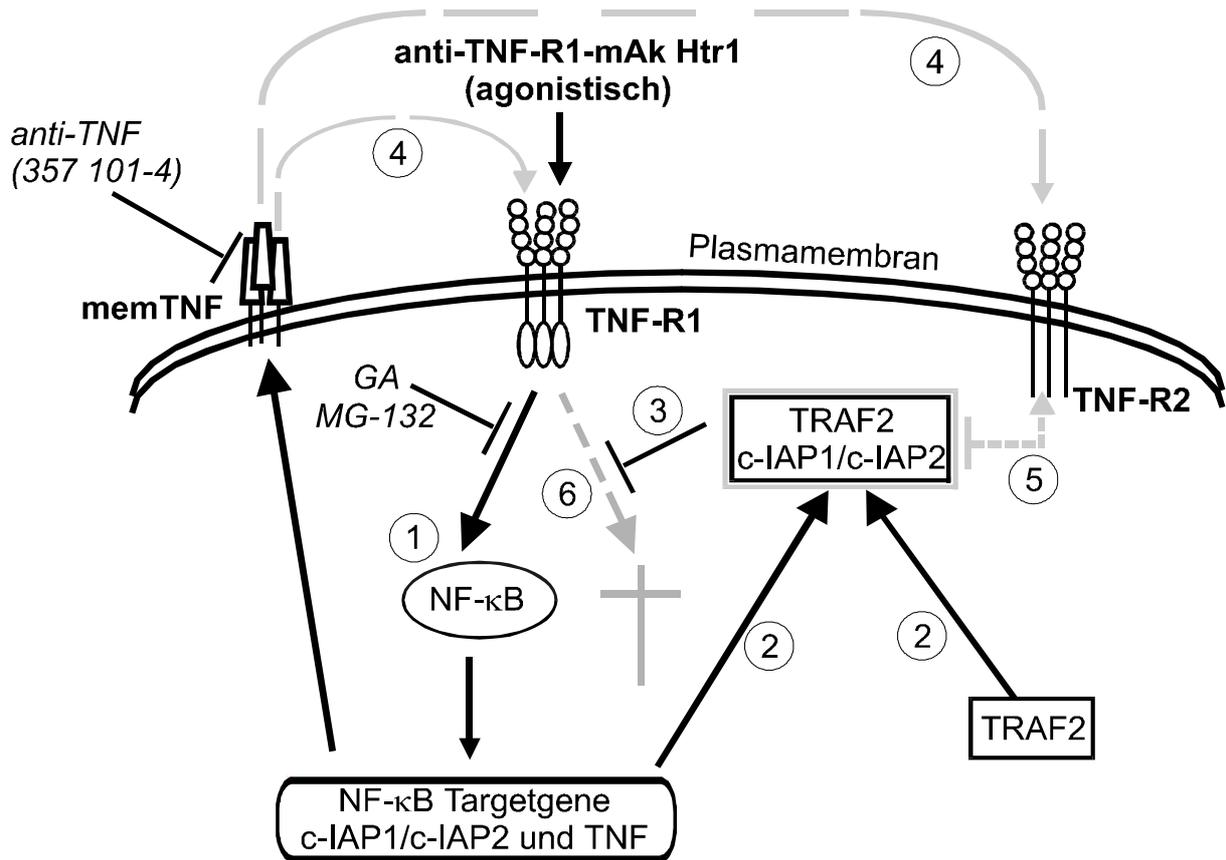
scheinbar nicht nur die TNF-induzierte Produktion der NF- $\kappa$ B-abhängigen Zielgene TNF, TRAF1, c-IAP1, c-IAP2, c-FLIP und Bfl1/A1 (Schwenzer et al., 1999, Wang et al., 1998, Chu et al., 1997, Kreuz et al., 2001, Micheau et al., 2001 und Lee et al., 1999). Ebenfalls könnten neben den NF- $\kappa$ B-Zielgenen konstitutiv exprimierte anti-apoptotische Faktoren oder permanent aktive anti-apoptotische Signalwege durch die Vorbehandlung mit MG-132 beeinflusst werden. Passend zu dieser Hypothese wurde in unserer Arbeitsgruppe festgestellt, daß MG-132 einige Zell-Linien in Abwesenheit von CHX – einem Inhibitor der Proteinsynthese, mit welchem viele Zell-Linien vorbehandelt werden müssen, um Apoptose-Induktion zu ermöglichen (Wajant et al., 2000) - empfindlicher gegen die Todesrezeptor-induzierte Apoptose machte. Diesem Effekt könnte die Induktion der Produktion konstitutiver Schutzproteine zugrunde liegen (Daten nicht gezeigt). GA jedoch konnte die Apoptose-Sensitivierung durch CHX in den untersuchten Zell-Linien nicht ersetzen.

Ein für die vorliegende Arbeit äußerst bedeutsamer Befund ist, daß der protektive Effekt einer GA-Vorbehandlung im Kurzzeit-Experiment weitaus deutlicher ist, als nach über-Nacht-Stimulation mit TNF. Mit zunehmender Stimulationsdauer des TNF-R1 scheint die Bedeutung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung für die Apoptose-Induktion abzunehmen, während sie für die schnelle Induktion der Apoptose am TNF-R1 essentiell ist. Eine permanente Stimulation mit TNF führt also mit der Zeit, trotz inhibiertem NF- $\kappa$ B-Signalweg, auch zur Apoptose. Dies könnte auf der Akkumulation der Caspase-8 am TNF-R1 oder auf der Bildung übermäßig vieler TNF-R1-Komplexe beruhen. Da die Caspase-8 vermutlich nicht zu 100 Prozent inhibiert ist, kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß mit der Zeit die Menge an aktivierter Caspase-8 ausreicht, um die Apoptose über den Mitochondrien-abhängigen Signalweg zu initiieren. Da Todesrezeptoren nicht nur Apoptose, sondern auch Nekrose über einen RIP-abhängigen Signalweg induzieren können (Holler et al., 2000), wurde durch Einsatz des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk sichergestellt, daß Nekrose bei den in Kym-1-Zellen beobachteten TNF-R1-vermittelten zytotoxischen Effekten keine Rolle spielt. Der beobachtete Zelltod war durch z-VAD-fmk inhibierbar, fand also unter Beteiligung von Caspasen statt (Abb 5.). Dies schließt Nekrose als wesentlichen Faktor aus. In Übereinstimmung mit diesem Befund steht die Beobachtung, daß GA die Prozessierung der Caspase-8 nur nach TNF- und Htr-1-Stimulation inhibieren konnte, nicht aber nach Stimulation mit TRAIL (Abb. 6). Die Prozessierung dieser Caspase stellt einen essentiellen Schritt in der Induktion der Apoptose durch

Todesrezeptoren wie TNF-R1 und TRAIL dar (Muzio et al., 1998). Diese Resultate implizieren eine wichtige Rolle der TNF-R1-vermittelten NF- $\kappa$ B-abhängigen Proteinsynthese in Kym-1-Zellen für die Induktion der Apoptose durch TNF-R1. „RNase-Protection-Assay“-Analysen gaben einen ersten Hinweis auf die Frage, welches durch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung induzierte Protein eine Rolle für die TNF-R1-vermittelte Apoptose in Kym-1-Zellen spielt: Endogenes TNF wurde in Kym-1-Zellen nach Stimulation mit sTNF, Htr-1, TWEAK sowie mit agonistischen TNF-R2-spezifischen Ak auf RNA-Ebene nachgewiesen (Abb. 7). Passend zu den vorhergehenden Apoptose-Experimenten blockierte Vorbehandlung mit GA und MG-132 diese Induktion von endogenem TNF vollständig. Auch der Einsatz des neutralisierenden TNF-spezifischen mAk 357 101-4 inhibierte die TNF-R1-vermittelte Apoptose in den Kym-1-Zellen (Abb. 8). Das endogene TNF scheint folglich eine essentielle Rolle für die schnelle TNF-R1-vermittelte Apoptose zu spielen. Die nach Langzeit-Stimulation eintretende, späte Induktion der Apoptose durch TNF-R1 ist hingegen weitgehend unabhängig von endogener TNF-Produktion. Dies ist auch dadurch ersichtlich, daß bereits in einer früheren Studie versucht worden war, eine Beteiligung von endogenem TNF an der TNF-R1-vermittelten Apoptose in Kym-1-Zellen durch Einsatz des Aks 357 101-4 in über-Nacht-Experimenten nachzuweisen. Jedoch zeigte sich, daß nur der TNF-R2-vermittelte Zelltod durch diesen mAk inhibiert werden konnte, nicht jedoch die TNF-R1-vermittelte Apoptose (Grell et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der schnellen Induktion der TNF-R1-induzierten Apoptose. Daher wurde auch der Effekt des neutralisierenden TNF-spezifischen mAks bereits nach acht Stunden betrachtet, wo eine Inhibition der TNF-R1-vermittelten Apoptose-Induktion beobachtet werden konnte. Die nach Langzeit-Stimulation eintretende verzögerte Induktion der Apoptose durch TNF-R1 ist hingegen weitgehend unabhängig von endogener TNF-Produktion, wie auch der geringe protektive Effekt der GA-Vorbehandlung zeigt.

Nachdem die Bedeutung des endogenen TNFs erwiesen war, stellte sich die Frage, in welcher bioaktiven Form das endogene TNF nach TNF-R1-Stimulation in den Kym-1-Zellen exprimiert wird, ob es sich um lösliches TNF oder aber um die membranständige Form (Wajant und Scheurich 2001) handelte, die gegenüber TNF-R1 und TNF-R2 differenzielle Bioaktivitäten aufweisen (siehe Einleitung). Da die eingesetzten TNF-Konzentrationen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit hoch genug waren, um statistisch gesehen alle TNF-R1-Moleküle der Kym-1-Zellen

zu besetzen und das endogen in Kym-1-Zellen produzierte TNF daher keinen neuen Stimulus für den TNF-R1 darstellen konnte, lag die Vermutung nahe, daß es als memTNF gebildet wird und seinen pro-apoptotischen Effekt über den durch sTNF nicht gut aktivierbaren TNF-R2 ausübt. Passend zu dieser Hypothese konnte in ankonzentrierten ÜS von mit TNF stimulierten Kym-1-Zellen kein lösliches TNF nachgewiesen werden (Abb. 11A). Mittels ELISA und FACS-Analysen konnte aber die TNF-R1-vermittelte Produktion geringer Mengen membranständigen TNFs gezeigt werden (Abb. 11B und C). Die Annahme, daß TNF-R2 für den beobachteten Effekt eine Rolle spielt, wurde durch Kostimulation der beiden TNF-Rezeptoren bestätigt: Wurde der Nicht-Todesrezeptor TNF-R2 gleichzeitig mit TNF-R1 durch agonistische Ak aktiviert, so vermittelte weder GA noch der TNF-spezifische neutralisierende mAk 357 101 einen protektiven Effekt auf die TNF-R1-vermittelte Apoptose in Kym-1-Zellen (Abb. 9). Die Erklärung für diese Beobachtung ist, daß bei gleichzeitiger Stimulation von TNF-R2 und TNF-R1 die Notwendigkeit der späteren Stimulation dieses Rezeptors durch das neu gebildete endogene Membran-TNF entfällt und somit auch der NF- $\kappa$ B-Signalweg unwichtig für die schnelle TNF-R1-vermittelte Apoptose-Induktion wird. Aus diesen bisher gezeigten Daten folgt, daß der TNF-R2 eine wichtige beschleunigende Funktion im TNF-R1-vermittelten Zelltod hat. Worin könnte diese beschleunigende Funktion bestehen? Aus der Literatur ist bekannt, daß eine Aktivierung des TNF-R2 unter anderem eine Depletion von TRAF2 aus dem Zytoplasma zusammen mit TRAF1, c-IAP1 und c-IAP2 an den TNF-R2-Signalkomplex zur Folge hat (Fotin-Mleczek et al., 2002). TRAF2 ist aber auch Bestandteil des TNF-R1-Signalkomplexes. Über einen TRAF2-abhängigen Signalweg kommt es zur TNF-R1-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung und folgenden Induktion NF- $\kappa$ B-abhängiger anti-apoptotischer Faktoren (Yang et al., 2001; Wajant et al., 2002), u. a. TRAF1, TRAF2, c-IAP1 und c-IAP2. Diese vier anti-apoptotischen Proteine bilden einen Komplex aus, der am TNF-R1 die Prozessierung der Caspase-8 verhindert (Roy et al., 1997). Wird in Folge TNF-R2-Aktivierung dieser Schutzkomplex an den stimulierten Nicht-Todesrezeptor rekrutiert, so kann am TNF-R1 die Apoptose initiiert werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde daher folgendes Modell der schnellen TNF-R1-vermittelten Apoptose erstellt (Abb. 21):



**Abbildung 21: Modell der TNF-Rezeptorkooperation bei der schnellen TNF-R1-vermittelten Apoptose in Kym-1-Zellen.** Schwarze Linien symbolisieren primäre Reaktionen. Grau dargestellt sind die Folgereaktionen. Inhibitoren dieser TNF-R1-vermittelten Apoptose-Induktion in Kym-1-Zellen sind in kursiv gedruckt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Das Modell zeigt eine selektive Stimulation des TNF-R1 die zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges und folgenden Induktion von endogenem membranständigem TNF sowie anti-apoptotischen Schutzfaktoren (u. a. c-IAP1,c-IAP2) führt (1). Es kommt zur Bildung eines anti-apoptotischen Komplexes (2), der die TNF-R1-vermittelte Apoptose inhiert (3). Das gebildete Membran-TNF aber stimuliert TNF-R1 als auch den durch membranständiges TNF-Form sehr gut aktivierbaren TNF-R2 (4). Hierdurch kommt es zu einer sekundären Umstrukturierung: Einmal aktiviert, kompetiert der TNF-R2 mit dem TNF-R1 um zytoplasmatisches TRAF2. TRAF2 wird zusammen mit den IAP-Proteinen an den TNF-R2 rekrutiert (5) und steht daher dem TNF-R1 jetzt nicht mehr zur Verfügung. Die Folge ist eine Sensitivierung der TNF-R1-vermittelten Apoptose (6). Inhibitoren dieses Mechanismus sind zum einen Antikörper, die das endogene TNF binden und so eine Aktivierung des TNF-R2

verhindern und zum anderen Inhibitoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges (wie GA und MG-132), die so eine Bildung von membranständigem TNF blockieren. Interessanterweise konnte durch Puls-Experimente mit sTNF gezeigt werden, daß ein kurzer Kontakt dieses Liganden mit dem TNF-R1 in Kym-1-Zellen genügte, um Apoptose zu induzieren (Abb. 10). Obwohl nur ca. 2000 Moleküle pro Zelle, scheint die Menge an neu produziertem TNF auszureichen, um den TNF-R1 nach Entfernung des exogenen TNFs weiter zu stimulieren und so die TNF-R1-vermittelte Apoptose aufrechtzuerhalten. Die Effizienz der Apoptose-Induktion war im Vergleich zur permanenten Stimulation mit sTNF nur geringfügig vermindert (Abb. 10), was beweist, daß memTNF ein sehr starker Aktivator der TNF-Rezeptoren ist. Die TNF-R1-vermittelte Apoptose in Kym-1-Zellen scheint durch diesen Rezeptor-„Crosstalk“ unabhängig von einer längeren Präsenz exogenen sTNFs zu werden. Dies gilt jedoch nicht für alle Zelltypen, was Experimente in HeLa-Zellen, die im Gegensatz zu Kym-1-Zellen durch Vorbehandlung mit GA nicht vor TNF-R1-vermittelter Apoptose geschützt werden (Abb. 12), zeigen. Obwohl sie viele TNF-R2-Moleküle exprimieren (Weiß et al., 1997), reicht in HeLa-TNF-R2-Zellen ein TNF-Puls zur Induktion der Apoptose nicht aus. Diese Zellen benötigen die permanente Präsenz exogenen TNFs zur Induktion der Apoptose (Mitteilung von Mariola Fotin-Mleczek). Dies liegt vermutlich daran, daß in HeLa-Zellen die Stimulation des TNF-R1 keine NF- $\kappa$ B-abhängige Induktion von endogenem TNF zur Folge hat (Weiß et al., 1997). Es scheint sich bei der TNF-R1-vermittelten Induktion des memTNF folglich um einen Zelltyp-spezifischen Vorgang zu handeln. Da jedoch auch in den HeLa-Zellen eine schnelle Aktivierung von NF- $\kappa$ B beobachtet werden kann (Mitteilung von Mariola Fotin-Mleczek), läßt sich vermuten, daß die Bildung des DISC am TNF-R1 allgemein ein sekundärer und ineffizienter Vorgang ist, der mit beträchtlicher Zeitverzögerung zu der schnellen Initiierung eines geninduzierenden Rezeptor-Signalkomplexes einsetzt. Nur in bestimmten Zell-Linien, wie Kym-1-Zellen, kann die DISC-Bildung über den beschriebenen Mechanismus (Modell Abb. 21) unterstützt und beschleunigt werden. Es stellt sich daher die Frage, wo dieser Zelltyp-spezifische Unterschied *in vivo* eine Bedeutung haben könnte. Neben der effizienten Aktivierung des TNF-R2 hat Membran-TNF auch Vorteile für den Organismus: TNF kann bei systemischer Verbreitung schwere Nebenwirkungen bewirken, die von Influenza-ähnlichen Symptomen bis hin zum Schockzustand reichen (Mannel und Echtenbacher, 2000). Eine systemische Verbreitung kann aber nur mit löslichem TNF erfolgen, während

---

memTNF am Ort seiner Funktion verbleibt. Werden also größere lokale TNF-Konzentrationen benötigt, ist memTNF - auch aufgrund seiner bereits besprochenen effizienten Wirkung der geeignete Mediator. Warum nun ist dieser Mechanismus Zelltyp-spezifisch? Aufgrund der möglichen schwerwiegenden Folgen einer systemischen Ausbreitung von TNF könnte man spekulieren, daß Zellen, die hohe TNF-Konzentrationen für die Induktion der TNF-R1-vermittelten Apoptose und die Immunantwort benötigen, TNF selber in Form von Membran-TNF herstellen können. Diese Produktion kann schnell durch einen kurzen TNF-Puls quasi „eingeschaltet“ werden, der dem Organismus nicht schadet. Andere Gewebe, bei denen geringere, für den Organismus noch ungefährliche TNF-Konzentrationen zur Apoptose-Induktion ausreichen, oder die nicht so schnell auf den Stimulus reagieren müssen, benötigen diese Fähigkeit nicht. Ein weiterer Aspekt wäre auch, daß bestimmte Gewebetypen bevorzugt von speziellen Pathogenen befallen werden, deren Bekämpfung die Stimulation beider TNF-Rezeptoren voraussetzt. Tatsächlich ist beispielsweise für die antivirale Abwehr eine Kooperation beider TNF-Rezeptoren notwendig (Rubi et al., 1997). Hier hätten Zellen, die nach TNF-R1-Stimulation selbst memTNF bilden können und so TNF-R2 aktivieren können, ebenfalls einen Vorteil. Auf diese Weise verleiht dieser, von uns entdeckte, Mechanismus zur schnellen TNF-R1-vermittelten Apoptose-Induktion dem Organismus also Flexibilität und Anpassungsfähigkeit bezüglich der Reaktion in der Immunantwort.

## 6.2 Untersuchungen der JNK-Aktivierung durch TNF, TRAIL und FasL.

Aufgrund neuerer Literaturdaten, die auf einen möglichen „Crosstalk“ zwischen Apoptose und der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) hindeuten (De Smaele et al., 2001; Tang et al., 2001b; Sanna et al., 2002) wurde die Apoptose-Induktion durch den TNF-R1 und TRAIL auch in dieser Hinsicht untersucht. Vorbehandlung mit einem JNK-Inhibitor, der nachweislich alle drei bekannten JNK inhibiert (Bennett et al., 2001), zeigte jedoch, daß diese MAPK in den hier untersuchten Systemen keine signifikante Rolle bei der Induktion von Apoptose zu spielen scheint (Abb. 13). Jedoch konnte umgekehrt sehr wohl ein Einfluß der Apoptose auf die TNF-R1-vermittelte JNK-Aktivierung beobachtet werden (Abb. 14). In den untersuchten Zell-Linien wurde die JNK-Aktivierung durch TNF zu zwei verschiedenen Zeitpunkten beobachtet: Wir fanden eine transiente JNK-Aktivierung, die nach 20 Minuten ein Maximum erreichte, aber nach 40 Minuten bereits wieder auf dem Ausgangsniveau war und eine erst nach einigen Stunden auftretende Aktivierung, die über den gesamten Untersuchungszeitraum erhöht blieb. Die früh auftretende, transiente Aktivierung war Caspase-unabhängig. Die später auftretende, anhaltende Aktivierung konnte durch z-VAD-fmk inhibiert werden und ist somit Caspase-abhängig. Die TNF-induzierte, verzögerte JNK-Aktivierung wurde zudem zeitgleich mit dem einsetzenden Zelltod beobachtet und trat in TNF-stimulierten KB-Zellen ohne die zur Apoptose-Induktion in diesen Zellen erforderliche zusätzliche CHX-Vorbehandlung (Wajant et al., 2000) nicht auf. Diese Resultate lassen eine Beteiligung der Apoptose an der späten TNF-R1-vermittelten JNK-Aktivierung vermuten. Die Caspase-unabhängige frühe Aktivierung der JNK durch TNF wurde durch Vorstimulation mit IL-1 bzw. CD40L deutlich inhibiert (Abb. 15). Diese Liganden aktivieren auch den NF- $\kappa$ B-Signalweg (Auron et al., 1998; Schwabe et al., 2001), der für den Schutz vor TNF-induzierter Apoptose verantwortlich ist. Eine mögliche Erklärung ist, daß die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Induktion von JNK blockiert. In Abbildung 22 sind die hier untersuchten Mechanismen in einem Schema zusammengefaßt.

Die Analyse der TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung ergab zwei verschiedene Aktivierungsmechanismen: Wie bei der TNF-induzierten JNK-Aktivierung handelt es sich auch hier um einen Caspase-abhängigen Signalweg und einen Caspase-unabhängigen Signalweg (Abb. 16 und Mühlenbeck et al., 1998). Dennoch ergab

sich ein bedeutsamer Unterschied zwischen der TNF- und TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung. Im Fall der TNF-R1-vermittelten JNK-Aktivierung konnten beide Aktivierungsmechanismen in demselben Zelltyp beobachtet werden. Die zwei verschiedenen TRAIL-induzierten Signalwege dagegen scheinen Zelltyp-spezifisch zu sein: Während in Kym-1- und SV80-Zellen ausschließlich die Caspase-unabhängige TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung auftrat (Abb. 16A,B), konnte in KB-, Jurkat- und HeLa-Zellen nur der Caspase-abhängige Signalweg detektiert werden (Abb. 16C,D,E). Zudem wurde im Gegensatz zu den zwei TNF-R1-vermittelten JNK-Aktivierungsmechanismen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Aktivierungskinetik der beiden TRAIL-induzierten JNK-Signalwege beobachtet: die TRAIL-vermittelte JNK-Aktivierung erfolgte in allen Zell-Linien spät und blieb während des gesamten Untersuchungszeitraumes erhöht. Nahezu identisch war die Aktivierungskinetik der Fas-vermittelten JNK-Aktivierung. Im Fall der Fas-vermittelten JNK-Aktivierung konnten Kym-1- und SV80-Zellen jedoch nicht in die Untersuchungen einbezogen werden, da beide Zelltypen kein Fas exprimieren (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation der Zell-Linien KB, HeLa und Jurkat ergab, in allen Fällen in Übereinstimmung mit der in diesen Zell-Linien beobachteten Caspase-Abhängigkeit der TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung, ebenfalls eine eindeutige Caspase-Abhängigkeit der FasL-induzierten JNK-Aktivierung (Abb. 17A,B,C). Dies läßt vermuten, daß die FasL- und TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung über gleiche oder ähnliche Signalwege ablaufen könnte. Obwohl in dieser Arbeit nicht beobachtet, scheint auch FasL in bestimmten Zell-Linien Caspase-unabhängig JNK zu aktivieren. Für 293-Zellen wurde die Existenz eines solchen Caspase-unabhängigen Aktivierungsmechanismus der Fas-vermittelten JNK bereits nachgewiesen (Yang et al., 1997). Ferner wurde eine Mutante des murinen Fas beschrieben, welche die Induktion der Apoptose inhibiert, während die JNK-Aktivierung noch erfolgen konnte (Chang et al., 1999).

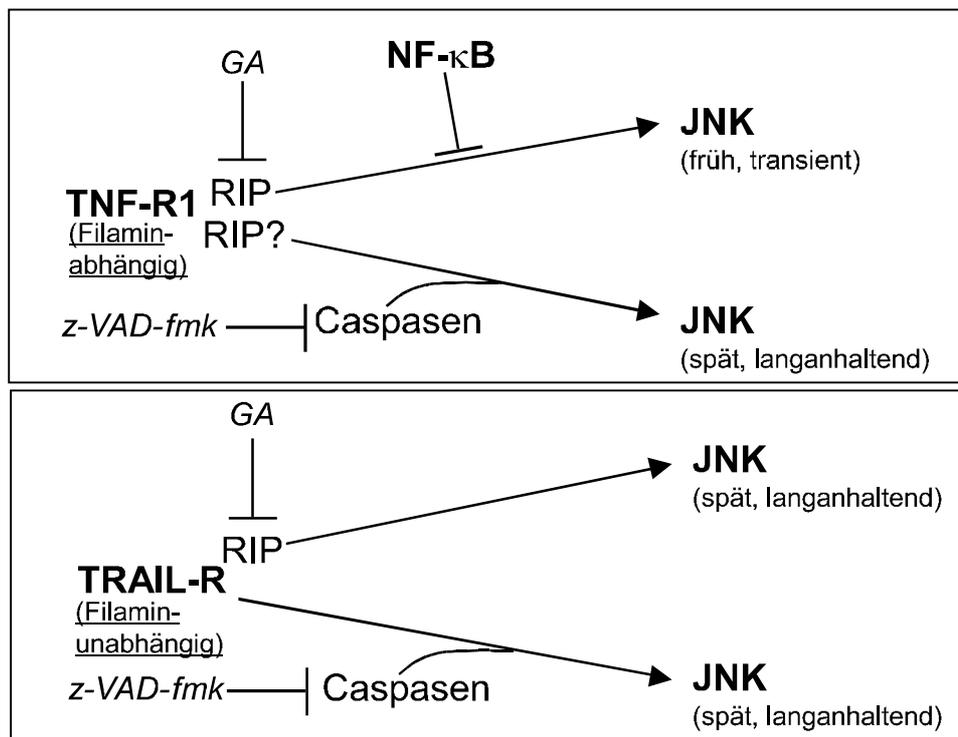
Die TRAIL- und FasL-vermittelte JNK-Aktivierung wurde in allen Zell-Linien ohne CHX-Vorbehandlung untersucht. Dennoch kann die Beteiligung des apoptotischen Signalweges nicht völlig ausgeschlossen werden, da TRAIL und FasL sehr starke Aktivatoren der Apoptose sind. Obwohl z. B. in HeLa-Zellen die Stimulation mit TRAIL ohne CHX nicht ausreicht, um meßbar Apoptose zu induzieren (Mühlenbeck et al., 1998), besteht auch unter diesen Bedingungen theoretisch die Möglichkeit, daß apoptotische Caspasen in geringem Maß aktiviert werden. Kym-1- und Jurkat-

Zellen benötigen jedoch keine CHX-Vorbehandlung zur Apoptose-Induktion, weshalb in diesen Fällen eindeutig apoptotische Bedingungen vorlagen (Abb. 16A,D).

Auch die nachgewiesene Caspase-Abhängigkeit der JNK-Aktivierung durch TNF, TRAIL und FasL bedeutet noch nicht, daß diese nur eine Folge der Apoptose ist. Neben den apoptotischen Caspasen gibt es auch Caspasen, die nicht an der Apoptose-Induktion beteiligt sind (Sadowski-Debbing et al., 2002). Da es sich bei z-VAD-fmk um einen Breitspektrum-Caspase-Inhibitor handelt, der alle Caspasen inhibiert (Garcia-Calvo et al., 1998), ist es möglich, daß die JNK-Aktivierung durch TNF-, TRAIL- und FasL auf der Aktivierung nicht-apoptotischer Caspasen beruht. Hierfür sprechen Untersuchungen der Fas-vermittelten JNK-Aktivierung in HeLa-Zellen, die dominant-negatives FADD exprimieren. Die JNK ließ sich in diesen Zellen noch immer gut aktivieren (Mühlenbeck et al., 1998). Die Fas-vermittelte JNK-Aktivierung ist in Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen inhibiert. Dies zeigt, daß zumindest in dieser T-Zell-Linie die für die Induktion von Apoptose essentielle Caspase-8 an der JNK-Aktivierung beteiligt ist (Abb. 17D). In Jurkat-Zellen benötigt die Fas-vermittelte Induktion von Apoptose kein CHX (s. o.), es herrschen folglich apoptotische Bedingungen. Die JNK könnte in dieser Zell-Linie also durchaus Folge der Apoptose sein. Weitere Experimente sind erforderlich, um zu klären, ob Caspase-8 über einen Apoptose-unabhängigen Signalweg JNK aktiviert.

Durch Vorinkubation der Zellen mit dem Hsp90-Inhibitor Geldanamycin (GA), der die Funktion des für die TNF-induzierte JNK-Aktivierung essentiellen Moleküls RIP (Liu et al., 1996; Kelliher et al., 1998) inhibiert, konnten die Mechanismen der TRAIL- und FasL-vermittelten JNK-Aktivierung noch weiter charakterisiert werden (Abb. 18): So zeigte sich, daß die Caspase-unabhängige TRAIL-induzierte JNK-Aktivierung in Kym-1-Zellen durch die Vorbehandlung mit dem Inhibitor blockiert wurde, während GA auf die Caspase-abhängige JNK-Aktivierung in KB-Zellen keinen Einfluß hatte. Es scheint also neben dem bereits publizierten RIP-abhängigen Aktivierungsmechanismus der TRAIL-induzierten JNK-Aktivierung (Lin et al., 2000) auch einen RIP-unabhängigen Signalweg zu geben. Hierbei scheint der oben beschriebene Caspase-unabhängige Signalweg zur Aktivierung der JNK nach TRAIL-Stimulation RIP-abhängig zu sein, während der Caspase-abhängige Signalweg RIP-unabhängig ist.

Kürzlich wurde die Interaktion der Zytoskelettkomponente Filamin mit TRAF2 nachgewiesen (Leonardi et al., 2000). Durch diese Interaktion werden TRAF2-abhängige Signalwege beeinflusst: So inhibierte Filamin-Überexpression die TRAF2-induzierte Aktivierung von JNK und NF- $\kappa$ B. Andererseits war die TNF-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und JNK in Filamin-defizienten-Zellen inhibiert (Leonardi et al., 2000 und Abb. 20A,B). Da die TRAIL- und die Fas-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B TRAF2-abhängig sein kann (Liu et al., 1996; Lin et al., 2000; Tada et al., 2001 und Abb. 19), wurde in dieser Arbeit der Einfluß der Filamindefizienz auf die JNK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch FasL und TRAIL untersucht. Die TRAIL-induzierte JNK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung konnte sowohl in der Filamin-defizienten, wie auch der rekonstituierten Zell-Linie beobachtet werden (Abb. 20A,B). Daraus kann man schlußfolgern, daß Filamin für die TRAIL-vermittelte Signaltransduktion nicht essentiell ist. Abbildung 22 zeigt zusammenfassend eine vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der JNK-Aktivierung durch TNF und TRAIL:



**Abbildung 22: Vergleich der JNK-Aktivierung durch TNF und TRAIL.** Inhibitoren sind in kursiv gedruckt. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Zusammenfassend ergab sich also sowohl für die TNF-, als auch für die TRAIL- und FasL-induzierte JNK-Aktivierung die Existenz zweier verschiedener Signalwege. Ausgehend von dem bisherigen Wissensstand über die Mechanismen der

JNK-Aktivierung (s. Einleitung) kann versucht werden, diese beiden Signalwege den Literaturdaten zuzuordnen. So findet man in Publikationen Hinweise auf die JNK-Aktivierung durch TNF über einen Mechanismus, der Interaktionen zwischen TRAF2, Gruppe-I-GCKs und MEKK1 erfordert (Shi et al., 1999; Nakano et al., 2000; Yao et al., 1999; Yuasa et al., 1998; Chadee et al., 2002). Weiter wird ein GCK-unabhängiger Signalweg diskutiert, an dem TRAF2, ROS und ASK-1 beteiligt sind (Chandel et al., 2001; Gotoh et al., 1998; Liu et al., 1998). Da ASK-1 eine Kinase ist, die auch Apoptose induzieren kann (Chang et al., 1998), könnte man spekulieren, daß es sich bei dem GCK-unabhängigen Signalweg um den beobachteten Caspase-abhängigen Aktivierungsmechanismus handeln könnte. Hierfür spräche auch der kürzlich publizierte Befund aus ASK-1-Knockout-Mäusen, der eine Beteiligung dieser Kinase bei der verlängerten JNK-Aktivierung durch TNF unter apoptotischen Bedingungen nachweist (Tobiume et al., 2001). Folglich würde der Caspase-unabhängige Aktivierungssignalweg dem GCK-abhängigen Mechanismus gleichzusetzen sein. Andererseits ist aber auch eine Beteiligung von Caspasen an der Spaltung und Aktivierung von MEKK1 bekannt (Deak et al., 1998; Cardone et al., 1997; Widmann et al., 1997; Widmann et al., 1998), was dafür spräche, daß der GCK-unabhängige Mechanismus dem beobachteten Caspase-abhängigen Signalweg entspricht. Im Fall der Fas-vermittelten JNK-Aktivierung wurde zudem die Beteiligung von ASK-1 an der Caspase-unabhängigen JNK-Aktivierung gezeigt (Yang et al., 1997; Chang et al., 1998). Wie erwähnt, sind die Caspase-abhängigen und -unabhängigen Signalwege bei der TRAIL- und FasL-induzierten JNK-Aktivierung Zelltyp-abhängig. Bei der TNF-R1-vermittelten JNK-Induktion wurden in den untersuchten Zell-Linien beide Aktivierungsmechanismen der JNK beobachtet. Folglich könnte es sich, obwohl die beiden Aktivierungswege sowohl für TNF-, als auch für TRAIL und FasL auf den ersten Blick ähnlich erscheinen, dennoch um verschiedene, vom jeweiligen Zytokin-abhängige Signalwege handeln, die nur zufällig teilweise dieselben Proteine, wie z. B. ASK-1 nutzen. Weitere Analysen der Zytokin-vermittelten JNK-Aktivierung scheinen daher erforderlich.

Die TNF-induzierte JNK-Aktivierung sowie die NF- $\kappa$ B-Aktivierung war in der Filamin-defizienten Zell-Linie inhibiert, ließ sich jedoch in der mit einem Filaminplasmid transfizierten Zell-Linie aktivieren (Leonardi et al., 2000 und Abb. 20A,B). Filamin beeinflußt also TNF-R1-vermittelte Signalwege, jedoch nicht TRAIL-induzierte Signalwege. Die Auswirkungen der Filamindefizienz auf die TNF-R1-vermittelte

NF- $\kappa$ B-Aktivierung konnte durch Überexpression des TNF-R1 vollständig kompensiert werden (Abb. 20C). Dies wirft die Frage auf, wie Filamin zur Signalübertragung des TNF-R1 beiträgt. Da Filamin an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Gorlin et al., 1990), ist eine Rolle des Filamin für die richtige Organisation des TNF-R1 in der Membran wahrscheinlich. So könnte der Rezeptor ohne Filamin eventuell nicht richtig in der Zellmembran verankert sein und daher auf diese Weise die Interaktion mit den „downstream“-Adaptermolekülen gestört sein. Filamin könnte aber auch eine strukturgebende Funktion, im Sinne eines „Scaffold“-Proteins für den TNF-R1 innehaben. Diese „Scaffold“-Funktion wurde für Filamin bereits bei anderen Rezeptoren, wie z. B. dem Calcium-Rezeptor, dem humanen Androgen-Rezeptor und dem Dopamin-D(2)-Rezeptor beschrieben (Hjalm et al., 2001; Ozanne et al., 2000; Li et al., 2000). Diese Erklärung erscheint auch logisch, da sich durch die Überexpression übermäßig viele TNF-R1-Moleküle in der Zelle ansammeln, wodurch es zu einer artifiziellen „Clusterung“ dieser Rezeptormoleküle kommt (Boldin et al., 1995). Die Rolle des Filamins, die wenigen unter natürlichen Bedingungen existierenden Rezeptoren zusammenzuführen, ist dadurch hinfällig und die TNF-R1-vermittelten Signalwege können daher nach TNF-R1-Transfektion auch in den Filamin-defizienten Zellen ablaufen. Die TRAIL-Rezeptoren scheinen anders organisiert zu sein, da Filamindefizienz für TRAIL-induzierte Signalwege keine Auswirkungen zeigt.

## 7. Summary

The members of the TNF ligand family are a group of cytokines involved in a variety of biological processes including inflammation, apoptosis, autoimmunity and oncogenesis. The TNF-ligands exert their functions through two different types of receptors both belonging to the TNF receptor superfamily: namely the death domain (DD)-containing receptors and receptors which lack a death domain. Stimulation of death receptors typically leads to the recruitment of cytoplasmatic DD-containing adapter proteins that couple these death receptors to the apoptotic machinery of the cell. The receptors without a DD interact with members of the TNF-receptor associated factor (TRAF)-family leading to the activation of NF- $\kappa$ B, JNK and p38 (Locksley et al., 2001; Wajant et al., 2001). The present study investigates the molecular mechanisms of death receptor-induced signalling pathways, focussing in particular on TNF-R1-mediated apoptosis and activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK).

It has been recently shown that selective stimulation of the non-DD-containing TNF-R2 is sufficient to induce apoptosis in Kym-1 cells by an indirect mechanism (Grell et al., 1993; Grell et al., 1999). Thus stimulation of TNF-R2 leads to the production of endogenous TNF which subsequently signals cell death via the DD-containing TNF-R1 (Grell et al., 1999; Vercaemmen et al., 1995). Given that TNF-R1 is also capable to induce the production of endogenous TNF it was investigated whether this endogenous TNF is also involved in TNF-R1-induced apoptosis as well.

Using the heat shock protein 90 (Hsp90)-inhibitor Geldanamycin (GA) as well as the proteasome inhibitor MG-132 which both block the activation of NF- $\kappa$ B, prevention of TNF-R1-mediated apoptosis, but not TRAIL-induced cell death, could be observed in short term assays. Interestingly, in long term assays TNF-R1-induced cell death was only slightly affected by GA. An influence of necrotic pathways, which are also inhibited by GA, could be excluded by the use of the caspase-inhibitor z-VAD-fmk. This implicated an important role of the NF- $\kappa$ B-activation for TNF-R1-mediated apoptosis. Exclusive stimulation of TNF-R1 by agonistic TNF-R1-specific antibodies (Htr-1) induced production of endogenous TNF and apoptosis in Kym-1 cells. Neutralising TNF-specific antibodies completely blocked TNF-R1-induced cell death in short term assays. TNF-R1-stimulated cells expressed TNF mainly in a cell-

associated form, suggesting that endogenously produced TNF acts in its membrane-bound form (memTNF). Membrane-bound TNF can strongly trigger both TNF receptors while soluble TNF (sTNF) predominantly acts via TNF-R1 (Wajant and Scheurich, 2001). Therefore endogenous memTNF produced by exclusive stimulation of TNF-R1 can efficiently trigger TNF-R2. Simultaneous stimulation of both TNF receptors is sufficient to induce apoptosis in the presence of GA or neutralising TNF-specific antibodies. This argues for a co-operation of both TNF receptors in the induction of apoptosis by TNF-R1. In this manner, induction of memTNF and the following crosstalk between TNF-R1 and TNF-R2 leads to a strong and fast occurring apoptotic response. Furthermore, we show that Kym-1 cells only need a short TNF-puls to initiate the induction of the apoptotic pathway. For HeLa cells, however, which are not capable to produce endogenous TNF after stimulation of TNF-R1 (Weiß et al., 1997), a permanent presence of exogenous TNF is essential to induce apoptosis, although in both cell lines a TNF-puls is sufficient for the induction of the NF- $\kappa$ B-signalling pathway. These data indicate that the formation of the apoptosis-competent TNF-R1 signalling complexes (DISC) is a secondary event occurring with time after the predominant formation of non-apoptotic gene-inductive receptor signalling complexes. However, DISC formation at TNF-R1 can be enhanced in some cells by the demonstrated production of endogenous memTNF, thus also circumventing the need of prolonged presence of exogenous soluble TNF for the induction of TNF-R1-mediated apoptosis.

Recent published data have suggested the existence of a possible crosstalk between apoptosis and the activation of JNK. Nevertheless, it is still not clear whether JNK activation is pro- or anti-apoptotic (De Smaele et al., 2001; Tang et al., 2001b; Sanna et al., 2002). In this study using an inhibitor of all three known JNKs, it could be shown that TNF-R1-mediated activation of the JNK has no significant role in TNF-R1-induced apoptosis. On the other hand, there is evidence for the involvement of caspases in the activation of JNK induced by TNF, TRAIL and FasL. In the case of TNF-R1-mediated JNK activation two different pathways could be observed: first, a transient, caspase-independent pathway, which could be inhibited by pre-stimulation of the cells with NF- $\kappa$ B-inducing cytokines. Second, a later occurring caspase-dependent JNK activation, which is paralleled by the initiation of the apoptotic program. Investigation of TRAIL- and FasL-induced JNK activation showed the existence of two celltype specific pathways – caspase-dependent, but RIP-

independent and RIP-dependent, but caspase-independent. In conclusion, the involvement of caspases in the activation of JNK was demonstrated after stimulation with TNF as well as with TRAIL or FasL. However, it remains to be verified, whether JNK activation is an apoptotic epiphenomenon, as the caspases involved in JNK activation could also be activated by a distinct pathway independent of the induction of the apoptotic program.

## 8. Literaturverzeichnis

- Armitage, R. J. (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 407-413.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Auron, P. E. (1998). The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 221-237.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., 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 beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.
- Bazan, J. F. (1993). Emerging families of Cytokines and receptors. *Curr. Biol.* 3, 603-606.
- Baud, V., Liu, Z.-G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y. and Karin, M. (1999). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* 13, 1297-1308.
- Baud, V. and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372-377.
- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S. and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376, 167-170.
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M. and Anderson, D. W. (2001). SP00125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13681-13686.
- 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.
- Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H. and Wallach, D. (1995). Self-association of the "death domains" 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., 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.
- 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. USA* 87, 3127-3131.
- Brown, K. D., Hostager, B. S. and Bishop, G. A. (2002). Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *J. Biol. Chem.* im Druck
- Cahill, M. A., Peter, M. E., Kischkel, F. C., Chinnaiyan, A., M., Dixit, V. M., Krammer, P. H. and Nordheim, A. (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene* 13, 2087-96.

- Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G. and Frisch, S. M. (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90, 315-323.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3666-3670.
- Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC, Sung YC, Oh BH. (1999). 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* 11, 253-261.
- Chadee, D. N., Yuasa, T. and Kyriakis, J. M. (2002). Direct activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase MEKK1 by the Ste20p homologue GCK and the adaptor protein TRAF2. *Mol. Cell Biol.* 22, 737-749.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.-W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chandel, N. S., Schumacker, P. T. and Arch, R. H. (2001). Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 276, 42728-42736.
- Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H. and Baltimore, D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter Protein Daxx. *Science* 281, 1860-1863.
- Chang, H. Y., Yang, X. and Baltimore, D. (1999). Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1252-1256.
- Chang, L. and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chen, G., Cao, P. and Goeddel, d. V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell.* 9, 401-410.
- 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. (1996). 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. A., 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.
- Clem, R. J. (2001). Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death. Differ.* 8, 137-143.
- Deak, J. C., Cross, J. V., Lewis, M., Qian, Y., Parrott, L. A., Distelhorst, C. W. and Templeton, D. J. (1998). Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5595-5600.
- Degli-Espost, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.-P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G. and Smith, C. A. (1997a). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 186, 1165-1170.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A. and Goodwin, R. G. (1997b). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- $\kappa$ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. and Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419-429.

- Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M., Liu, Z.-G. (2001). The alpha and beta subunits of I $\kappa$ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol. Cell Biol.* 21, 3986-3994.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D. U., Jin, R., Jones, J., Cong, R. and Franzoso, G. (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 414, 308-313.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548-554.
- Duckett, C. S. and Thompson, C. B. (1997). CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev.* 11, 2810-2821.
- Eck, M. J. and Sprang, S. R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.* 264, 17595-17605.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C. and Young, P. R. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 273, 14363-14367.
- Engels, I. H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Janicke, R. U., Porter, A. G., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. and Wesselborg, S. (2000). Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 19, 4563-4573.
- Fotin-Mleczeck, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Haußer, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J. A. and Wajant, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.* 115, 2757-2750.
- Fulda, S., Meyer, E. and Debatin, K. M. (2000). Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res.* 60, 3947-3956.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 273, 32608-32613.
- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J. and Hartwig, J. H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J. Biol. Chem.* 111, 1089-1105.
- Gosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. (1998). NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225-260.
- Gotoh, Y. and Cooper, J. A. (1998). Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J. Biol. Chem.* 273, 17477-17482.
- Grell, M., Krammer, P. H. and Scheurich, P. (1994). Segregation of APO-1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 24, 2563-2566.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., et al. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G. and Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 570-575.

- Grell, M., Zimmermann, G., Gottfried, E., Chen, C. M., Grunwald, U., Huang, D. C., Wu Lee, Y. H., Durkop, H., Engelmann, H., Scheurich, P., Wajant, H. and 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, 3034-3043.
- Harhaj, E. W., Good, L., Xiao, G., Uhlik, M., Cvijic, M. E., Rivera-Walsh, I. and Sun, S. C. (2000). Somatic mutagenesis studies of NF-kappa B signaling in human T cells: evidence for an essential role of IKK gamma in NF-kappa B activation by T-cell costimulatory signals and the HTLV-I Tax protein. *Oncogene* 19, 1448-1456.
- Hjalm, G., MacLeod, R. J., Kifor, O., Chattopadhyay, N. and Brown, E. M. (2001). Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 34880-34887.
- Hoeflich, K. P., Yeh, W. C., Yao, Z., Mak, T. W. and Woodgett, J. R. (1999). Mediation of TNF receptor associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1). *Oncogene* 18, 5814-5820.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B. and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 489-495.
- Hsu, H. L., Shu, H. B., Pan, M. G. and Goddel, D. V. (1996a). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
- 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.
- Hu, W.-H., Johnson, H. and Shu, H.-B. (1999). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF- $\kappa$ B and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 30603-30610.
- Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., Ashkenazi, A. and de Vos, A. M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell* 4, 563-571.
- Ip, Y. T. and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 205-219.
- 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.
- Jenkins, M., Keir, M. and McCune, J. M. (2000). A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 7988-7993.
- Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W. and Goeddel, D. V. (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
- Jones, E. Y., Stuart, D. I. and Walker, N. P. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338, 225-228.
- Jupp, O. J., McFarlane, S. M., Anderson, H. M., Littlejohn, A. F., Mohamed, A. A., MacKay, R. H., Vandenabeele, P. and MacEwan, D. J. (2002). Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem. J.* 359, 525-35.
- Kaptein, A., Jansen, M., Dilaver, G., Kitson, J., Dash, L., Wang, E., Owen, M. J., Bodmer, J. L., Tschopp, J. and Farrow, S. N. (2000). Studies on the interaction between TWEAK and the death receptor WSL-1/TRAMP (DR3). *FEBS Lett.* 485, 135-41.

- Karpusas, M, Hsu, Y. M., Wang, J. H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L. and Thomas, D. (1995). 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 3, 1031-1039.
- 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-kappaB signal. *Immunity* 8, 297-303.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell Biol.* 21, 3964-3973.
- Kyriakis, J.M. (1999). Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 5259-5262.
- Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. and Cheng, G. (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9136-9141.
- Lenczowski, J. M., Dominguez, L., Eder, A. M., King, L. B., Zacharchuk, C. M. and Ashwell JD (1997). Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 170-181.
- Leonardi, A., Ellinger-Ziegelbauer, H., Franzoso, G., Brown, K. and Siebenlist U. (2000). Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J. Biol. Chem.* 275, 271-278.
- Leong, K. G. and Karsan, A. (2000). Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Histol Histopath.* 15, 1303-1325.
- Lewis, J., Dewin, A., Miller, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Neckers, L. and Liu, Z. (2000). Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 275, 10519-10526.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, M., Bermak, J. C., Wang, Z. W. and Zhou, Q. Y. (2000). Modulation of dopamine D(2) receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280). *Mol. Pharmacol.* 57, 446-452.
- Li, Q., van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F. and Verma, I. M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the I kappa B kinase 2 gene. *Science* 284, 321-325.
- Li, X., Yang, Y. and Ashwell, J. D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.
- Li, Y., Kang, J., Friedman, J., Tarassishin, L., Ye, J., Kovalenko, A., Wallach, D. and Horwitz, M. S. (1999). Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1042-1047.
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y. and Liu, Z.-G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13, 2514-2526.
- Lin, Y., Devin, A., Cook, A., Keane, M. M., Kelliher, M., Lipkowitz, S. and Liu, Z.-G. (2000). The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of I $\kappa$ B-Kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6638-6645.
- 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-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.

- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. and Kyriakis, J. M. (2000). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol. Cell Biol.* 20, 2198-2208.
- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- 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.
- Makris, C., Godfrey, V. L., Krahn-Senftleben, G., Takahashi, T., Roberts, J. L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R. S. and Karin, M. (2000). Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti 1336. *Mol. Cell* 5, 969-979.
- Maniatis, T. (1997). Catalysis by a multiprotein I $\kappa$ B kinase complex. *Science* 278, 818-819.
- Mariani, S. M. and Krammer, P. H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* 28, 973-982.
- Mannel, D. N. and Entenacher, B. (2000). TNF in the inflammatory response. *Chem. Immunol.* 74, 141-161.
- 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. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* 7, 1003-1007.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Brush, J., Goddard, A. and Ashkenazi, A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr. Biol.* 8, 525-528.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16, 2794-2804.
- 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 I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science* 278, 860-866.
- Mercurio, F., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Young, D. B., Li, J. W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. and Manning, A. M. (1999). I $\kappa$ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol. Cell Biol.* 19, 1526-15238.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. and Tschopp, J. (2001). NF- $\kappa$ B signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell Biol.* 21, 5299-5305.
- Mongkolsapaya, J., Grimes, J. M., Chen, N., Xu, X. N., Stuart, D. I., Jones, E. Y. and Sreaton, G. (1999). Structure of TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1048-1053.
- 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. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Becherer, J. D. et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 385, 733-736.

- Mühlenbeck, F., Haas, E., Schwenger, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P. and Wajant, H. (1998). TRAIL/APO2L activates c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 33091-33098.
- Mühlenbeck, F., Schneider, P., Bodmer, J.-L., Schwenger, R., Hausser, A., Schubert, G., Scheurich, P., Moosmayer, D., Tschopp, J. and Wajant, H. (2000). The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK-activation. *J. Biol. Chem.* 275, 32208-32213.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Savesen, G. S. and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273, 2926-2930.
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-56.
- Naismith, J. H. and Sprang, S. R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem. Sci.* 23, 74-79.
- Nakano, K., Yamauchi, J., Nakagawa, K., Itoh, H. and Kitamura, N. (2000). NESK, a member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and is expressed during the late stages of embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 20533-20539.
- Nakayama, M., Ishidoh, K., Kayagaki, N., Kojima, Y., Yamaguchi, N., Nakano, H., Kominami, E., Okumura, K., and Yagita, H. (2002). Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J. Immunol.* 168, 734-743.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998). ASK-1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell* 2, 389-395.
- Osawa, Y., Banno, Y., Nagaki, M., Brenner, D. A., Naiki, T., Nozawa, Y., Nakashima, S. and Moriwaki, H. (2001). TNF- $\alpha$ -induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J. Immunol.* 167, 173-180.
- Ozanne, D. M., Brady, M. E., Cook, S., Gaughan, L., Neal, D. E. and Robson, C. N. (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol. Endocrinol.* 14, 1618-1626.
- 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.
- Pan, G., Ni, J., Wie, 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., Ni, J., Yu, G., Wie, Y.-F. and Dixit, V. M. (1998). TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett.* 6, 41-45.
- Pastorino, J. G., Tafani, M. and Farber, J. L. (1999). Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 19411-19416.
- Perez, C., Albert, I., DeFay, K., Zachariades, N., Gooding, L. and Kriegler M. (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63, 251-258.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271, 12687-12690.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., Godowski, P. J., Wood, W. I., Gurney, A. L., Hillan, K. J., Cohen, R. L., Goddard, A. D., Botstein, D. and Ashkenazi, A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.

- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. and Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M. and Goeddel, D. V. (1995a). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269, 1424-1427.
- 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.
- Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I-kappaB kinase complex. *Nature* 395, 297-300.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., et al. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-6925.
- Rudolph, D., Yeh, W. C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A. J. and Mak, T. W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF-kappa B activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev.* 14, 854-862.
- Sadowski-Debbing, K., Coy, J. F., Mier, W., Hug, H. and Los, M. (2002). Caspases--their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 50, 19-34.
- Sanna, M. G., da Silva Correia, J., Ducrey, O., Lee, J., Nomoto, K., Schrantz, N., Deveraux, Q. L. and Ulevitch, R. J. (2002). IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1754-1766.
- Schaeffer, H. J. and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435-2444.
- Schmidt-Supprian, M., Bloch, W., Courtois, G., Addicks, K., Israel, A., Rajewsky, K. and Pasparakis, M. (2000). NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol. Cell* 5, 981-992.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.-L., Hoffmann, K., Kataoka, T., Holler, N. and Tschopp, J. (1997a). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappa B. *Immunity* 7, 831-836.
- Schneider, P., Bodmer, J.-L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Terskikh, A., Peitsch, M. C. and Tschopp, J. (1997b). Characterization of Fas(Apo-1,CD95)-Fas ligand interaction. *J. Biol. Chem.* 272, 18827-18833.
- 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. *Eur. J. Biochem.* 29, 1785-1792.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254, 439-359.
- Schwabe, R. F., Schnabl, B., Kweon, Y. O., Brenner, D. A. (2001). CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J. Immunol.* 166, 6812-6819.
- Schwenzler, R., Siemienski, 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 up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 19368-19374.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131-E136.

- Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, P. 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., Leonardi, A., Kyriakis, J., Siebenlist, U. and Kehrl, J. H. (1999). TNF-mediated activation of the stress-activated protein kinase pathway: TNF receptor-associated factor 2 recruits and activates germinal center kinase related. *J. Immunol.* 163, 3279-3285.
- Siegel, R. M., Chan, F. K., Chun, H. J. and Lenardo, M. J. (2000). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 1, 469-474.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P. and Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
- Sluss H. K., Barrett T, Derijard B, and Davis RJ (1994). Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8376–8384.
- Smith, R. A. and Baglioni, C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* 262, 6951-6954.
- 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.
- Stancovski, I. And Baltimore, D. (1997). NF- $\kappa$ B activation: The I $\kappa$ B kinase revealed? *Cell* 91, 299-302.
- 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.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobarai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T. W., Yagita, H., Okumura, K., Yeh, W. C. and Nakano, H. (2001). Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J. Biol. Chem.* 276, 36530-36534.
- Takeuchi, M., Rothe, M. and Goeddel, D. V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 19935-19942.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. and Nagata, S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* 4, 31-36.
- 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, 421-429.
- Tang, D., Lahti, J. M. and Kidd, V. J. (2000). Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 9303-9307.
- Tang, G., Yang, J., Minemoto, Y. and Lin, A. (2001a). Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKKbeta suppresses TNF-alpha -induced apoptosis. *Mol. Cell* 8, 1005-1016.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M. and Lin, A. (2001b). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 414, 313-317.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. and Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the the 55 kD TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.

- Ting, A. T., Pimentel-Muinos, F. X. and Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* 15, 6189-6196.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO J.* 20, 222-228.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T. K. Jones, S. N., Flavell, R. A. and Davis, R. J. (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.* 15, 1419-1426.
- Tracey, K. J. and Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 317-343.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M. and Krammer, P. H. (1989). Monoklonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R. and Fiers, W. (1995). Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 5, 392-399.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998a). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 187, 1477-1485.
- Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., van de, C. M., Declercq, W., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998b). Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* 188, 919-930.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Wajant, H., Haas, E., Schwenzler, R., Mühlenbeck, F., Kreuz, S., Schubert, G., Grell, M., Smith, G. and Scheurich, P. (2000). Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximid-sensitive factor occurs at the level of or upstream of FADD. *J. Biol. Chem.* 275, 24357-24366.
- Wajant, H. and Scheurich, P. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33, 19-32.
- Wajant, H., Henkler, F. and Scheurich, P. (2001). The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13, 389-400.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2002). Tumor Necrosis Factor. *Cell Death Differ. Review im Druck.*
- 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.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G. Goeddel, D. V. and Baldwin, A. S. Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922-2933.
- Weiß, T., Grell, M., Hessabi, B., Bourteele, S., Müller, G., Scheurich, P. and Wajant, H. (1997). Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80 – Requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J. Immunol.* 158, 2398-2404.
- Weiß, T. Kooperation der beiden Tumor-Necrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren bei der Induktion zytotoxischer Effekte. Shaker Verlag, Aachen (1997). *Dissertation Universität Stuttgart, D93.*

- Weiß, T., Grell, M., Siemienski, K., Mühlenbeck, F., Dürkop, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. and Wajant, H. (1998). TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J. Immunol.* 161, 3136-2404.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. and Neckers, L. M. (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8324-8328.
- Widmann, C., Johnson, N. L., Gardner, A. M., Smith, R. J. and Johnson, G. L. (1997). Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1. *Oncogene* 15, 2439-2447.
- Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, N. L., Jarpe, M. B. und Johnson, G. L. (1998). MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 18, 2416-2429.
- Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dorken, B. and Daniel, P. T. (2001). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 97, 1378-1387.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. and Goodwin, R. G. (1995). Identification and characterisation of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Wiley, S. R., Cassiano, L., Lofton, T., Davis-Smith, T., Winkles, J. A., Lindner, V., Liu, H., Daniel, T. O., Smith, C. A. and Fanslow, W. C. (2001). A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity* 15, 837-846.
- 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 I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nat. Immunol.* 2, 620-624.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. J. and Baltimore D (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.
- 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, 2118-2125.
- 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, 22681-22692.
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. (1997). The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91, 243-252.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H. and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300.

**Veröffentlichungen:**

Weingärtner, M., Siegmund, D., Schlecht, U., Fotin-Mleczek, M., Scheurich, P., Wajant, H. (2002). Endogenous Membrane Tumor Necrosis Factor (TNF) Is a Potent Amplifier of TNF Receptor 1-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 34853-348539.

Henkler, F., Baumann, B., Fotin-Mleczek, M., Weingärtner, M., Schwenzer, R., Peters, N., Wirth, T., Scheurich, P., Schmid, J. A., Wajant, H. (2002). Caspase-mediated cleavage converts TRAF1 from a selective modulator of TNF receptor signaling to a general inhibitor of NF- $\kappa$ B activation. *eingereicht bei EMBO J.*

Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J. A., Wajant, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.* 115, 2757-2770.

Siegmund, D., Mauri, D., Peters, N., Juo, P., Thome, M., Reichwein, M., Blenis, J., Scheurich, P., Tschopp, J., Wajant, H. (2001). Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8 mediate up-regulation of c-Fos by Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) via a FLICE inhibitory protein (FLIP)-regulated pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 32585-32590.

Bartke, T., Siegmund, D., Peters, N., Reichwein, M., Henkler, F., Scheurich, P., Wajant, H. (2001). p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene* 20, 571-580.

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

Stuttgart, den 10.10.2002.

Monika Weingärtner

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Monika Weingärtner, geb. Reichwein  
Geburtsdatum: 04. Dezember 1972  
Geburtsort: München  
Familienstand: verheiratet

### Ausbildungsdaten

Schulbildung	1979 -1983	Grundschule Eduard-Spranger-Straße, München
	1983-1992	Neusprachliches Sophie-Scholl-Gymnasium, München
Studium	1992 -1998	Biologiestudium an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
	1998	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilian-Universität, München
		Abschluß als Dipl. Biol. Univ. am 23. November 1998
Promotion	1999-2002	Promotion am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart
<u>Berufserfahrung</u>	1.10.98 - 31.5.99	Wissenschaftlicher Außendienst für die Sankyo Pharma GmbH