



Regulation Tumornekrosefaktor (TNF) Rezeptor assoziierter Signalwege durch das Adapterprotein TRAF1

Regulation of tumor necrosis receptor (TNF) associated
pathways through the adapter protein TRAF1

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

José Antonio Carmona Arana aus Huércal-Overa

Würzburg 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Professor Dr. Harald Wajant

2. Gutachter: Professor Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „Regulation Tumornekrosefaktor (TNF) Rezeptor assoziierter Signalwege durch das Adapterprotein TRAF1“ selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Würzburg,.....
Datum Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Regulation of tumor necrosis receptor (TNF) associated pathways through the adapter protein TRAF1“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis. Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,.....
Date Signature

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. September 2010 bis 30. Dezember 2014 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Wajant bedanken, da er mich im Laufe meiner Promotion sehr gut wissenschaftlich betreut hat und durch anregende Diskussionen sowie Ideen meine Leidenschaft für die Wissenschaft erweckt hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Thomas Müller, der sich die Zeit für diese Dissertation genommen hat und als Zweitgutachter meiner Promotion mich betreut hat.

Meine Dankbarkeit gilt den guten Mitarbeitern der AG Wajant, die mit ihrer guten Zusammenarbeit, guter Betriebsatmosphäre und Unterstützung diesen harten Weg mir erleichtert haben, insbesondere Susanne, Manfred: „Ihr seid die Besten!“

Letztendlich spreche ich gerne meinen Dank für die unendliche Geduld und Rückhalt meiner Freunde, besonders Agnieszka, Alex, Ana Luz, Antonio, Celia, Isabell, Roberto, Rocio, Salvatore, meinem Bruder, Manolo, meiner Mutter und vor allem meiner Ehefrau aus. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft.

Für Elena Sofía

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die TNF-Superfamilie	1
1.1.1	Liganden der TNF-Superfamilie	1
1.1.2	Rezeptoren der TNF-Superfamilie	3
1.1.3	NF κ B-Aktivierung in Rahmen der TNF-Superfamilie	7
1.2	TNF	11
1.3	TWEAK/Fn14	11
1.4	CD40L/CD40	13
1.4.1	CD40Ligand/CD154	13
1.4.2	Der CD40 Rezeptor	13
1.5	TRAF Moleküle	16
1.6	Zielsetzung	17
2	Materialien	18
2.1	Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	18
2.2	Enzyme	19
2.3	Antikörper	19
2.4	Lösungen und Puffer	20
2.5	Kits	21
2.6	Apparaturen und Verbrauchsmaterial	22
2.7	Zelllinien	23
2.7.1	Eukaryotische Zellen	23
2.7.2	Mesenchymale humane Stammzellen	23
	Mesenchymale humane Stammzellen wurden aus dem Stock des Lehrstuhls für Tissue Engineering & Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg erhalten.	23
2.7.3	Prokaryotische Zellen	23
2.8	Rekombinante Fusionsproteine und Plasmide	24
3	Methoden	25
3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	25
3.2	Konservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen	25
3.3	Produktion der rekombinanten Proteine	26
3.4	Herstellung der stabil transfizierte TRAF1-Zellen	26
3.5	Herstellung von Gesamtzelllysaten nach Stimulation	26
3.6	Gleichgewichtsbindungsstudien	27

3.7	Statistik, Berechnungen und Darstellung der Daten	28
3.8	ELISA Analyse	28
3.9	ELISA Analyse in transient transfizierten Zellen	29
3.10	Durchflusszytometrie	29
3.11	Western Blot	30
3.11.1	SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)	30
3.11.2	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	30
3.11.3	Immundetektion	31
3.12	Polymerase Chain Reaction (PCR)	31
4	Ergebnisse	32
4.1	TWEAK induziert TRAF1 stärker als TNF	32
4.2	Die Induktion von TRAF1 durch lösliches TWEAK kann abhängig oder unabhängig vom klassischen NF B-Signalweg erfolgen	38
4.3	TWEAK priming und ektopische TRAF1-Expression inhibieren die CD40-induzierte Signaltransduktion	43
4.3.1	TWEAK Vorstimulation inhibiert die CD40-Induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs	43
4.3.2	TWEAK inhibiert die CD40-vermittelte Aktivierung der MAPKs	47
4.3.3	Die ektopische Expression von TRAF1 hat keinen Einfluß auf die Interaktion von CD40 mit seinem Liganden	49
4.3.4	TRAF1 Überexpression verhindert CD40L-assoziierte Induktion von NF κ B	51
4.3.5	Verminderte IL6 und IL8 Synthese in TRAF1-Stabiltransfektanten	52
5	Diskussion	54
5.1	Sowohl der klassische, als auch der alternative NF B-Signalwege spielen eine Rolle bei der TWEAK-induzierte TRAF1-Expression	54
5.2	TWEAK-Stimulation und ektopische TRAF1-Expression inhibieren CD40-asoziierte Signalwege	57
6	Zusammenfassung	61
7	Abstract	63
8	Literaturverzeichnis	65
9	Anhang	77
9.1	Abkürzungsverzeichnis	77
9.2	Publikationen	83

1 Einleitung

1.1 Die TNF-Superfamilie

Vor über dreißig Jahren wurden Lymphotoxin (LT) (Williams and Granger, 1973) und der „Tumor necrosis factor“ (TNF) (Carswell et al., 1975) identifiziert. Sofort wurde die strukturelle Verwandtschaft dieser Moleküle festgestellt was zur Gründung der TNF-Ligandenfamilie führte und im Laufe der Jahre wurden neue Mitglieder dieser Ligandenfamilie gefunden als auch eine komplementäre Familie von strukturell verwandten Rezeptoren, die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie. Die TNF-Superfamilie umfasst aktuell 29 Rezeptoren und 19 Liganden, welche in aller Regel von Zellen des Immunsystems exprimiert werden, einigen dieser Moleküle zeigen aber auch eine ubiquitäre Expression. Viele wichtige Prozesse werden durch die Moleküle dieser Familie reguliert; beispielweise Zellmigration, Zellwachstum und Zelldifferenzierung (Liu et al., 2013; Shi et al., 2003; Kowalczyk-Quintas and Schneider, 2014) als auch Vorgänge des Immunsystems wie z.B. Antigenpräsentation und Phagozytose (MacLennan and Vinuesa, 2002; Yang et al., 2005; Netea et al., 1999). Defekte TNF-Moleküle oder deren deregulierten Expression kann zur Entstehung bedeutender Erkrankungen führen.

1.1.1 Liganden der TNF-Superfamilie

Die Liganden der TNF-Superfamilie werden hauptsächlich als homotrimere Typ-II Transmembranproteine exprimiert (Locksley et al., 2001). Es gibt jedoch eine Ausnahme; Lymphotoxin- α (LT α) wird als lösliches Homotrimer freigesetzt (del Rio et al., 2013; Etemadi et al., 2013) und bildet mit dem membrangebundenen LT β das heterotrimere Molekül LT $\alpha\beta_2$. Die neunzehn Mitglieder der TNF-Superfamilie werden durch 18 Gene kodiert und können an einen oder mehrere Typen von TNF-Rezeptoren binden (Bodmer et al., 2002). Die Liganden der TNF-Familie sind charakterisiert durch die sogenannte „TNF-Homologie Domäne“ (THD), welche den extrazellulären C-Terminus des Liganden umfasst. Die THD ist ein sehr konserviertes Strukturmotiv, das aus ca. 145 Aminosäuren besteht, die zwei antiparallele β -Faltblätter bilden. Die THD ist verantwortlich für die

Rezeptorbindung und die Trimerisierung der Liganden (Bodmer et al., 2002). Aus den membranständigen Formen der TNF-Liganden können durch proteolytische Spaltung (durch Metalloproteasen z.B. Furin und ADAM-Familie) oder durch alternatives Spleißen lösliche trimere Formen freigesetzt werden (Locksley et al., 2001; Bodmer et al., 2002). Membranständige und lösliche TNF-Liganden können manchmal unterschiedlich gut ihre entsprechenden Rezeptoren aktivieren. So sind z.B. die membranständige und lösliche Variante von TNF α imstande an TNFR1 und TNFR2 zu binden. Während die Bindung der membranständigen Variante von TNF jedoch für beide TNF-Rezeptoren zu deren Aktivierung führt, resultiert die Bindung von löslichem TNF zwar in einer starken TNFR1-Aktivierung, hat aber kaum Wirkung auf die Aktivität des TNFR2 (Grell et al., 1995; Rauert et al., 2010). Die löslichen Varianten von TNF-Liganden, die trotz Rezeptorbindung wenig aktivierend wirken, können durch Oligomerisierung oder Immobilisierung an der Zelloberfläche ihre Rezeptorstimulierende Aktivität enorm steigern (Wyzgol et al., 2009; Wajant et al., 2013).

TNFR2



TNFR1



TNF

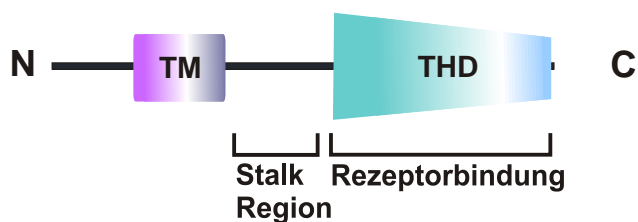


Abbildung 1: Allgemeine Struktur der TNF-Liganden und Rezeptoren am Beispiel von TNF, TNFR1 und TNFR2.

CRD = cysteinreiche Domänen, S = Signalpeptid, TM = Transmembrandomäne, THD = TNF Homologiedomäne, PLAD = pre-ligand assembly domain und C, N = C und N-Terminus.

1.1.2 Rezeptoren der TNF-Superfamilie

Die TNF-Superfamilie umfasst derzeit 29 Moleküle, die als Rezeptoren agieren. An jeden Rezeptor können ein oder mehrere Typen von TNF-Liganden binden mit Ausnahme von DR6 („death receptor 6“), TROY („tumor necrosis factor receptor superfamily member 19“), RELT („receptor expressed in lymphoid tissues“) und NFGFR („nerve growth factor receptor“), für welche noch keine Liganden gefunden wurden, die an diese Rezeptoren binden. Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie werden hauptsächlich als Typ-I und Typ-III-Transmembranproteine exprimiert (Locksley et al., 2001; Bodmer et al., 2002; Hehlhans and Pfeffer, 2005). Lösliche Varianten der TNF-Rezeptoren können durch alternatives Spleißen (4-1BB) oder

proteolytische Prozessierung (CD40, CD30, CD27, TNFR2, TNFR1, Fas) generiert werden (Gruss and Dower, 1995; Smith et al., 1994; Aderka, 1996). Die Rezeptoren der TNF-Familie haben als identifizierendes Merkmal in ihrem extrazellulären Teil eine bis sechs cysteinreiche Domänen („cysteine rich domain“, CRD) (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001), welche typischerweise drei Cysteinbrücken ausbilden (Naismith and Sprang, 1998; Zhang, 2004; Bodmer et al., 2002). Die CRDs sind funktionell an der Ligandbindung beteiligt (Zhang, 2004). Ferner besitzt der extrazelluläre Teil des Rezeptors die N-Terminale „pre-ligand assembly domain“ (PLAD), welche die Bildung inaktiver homodi- oder homotrimerer Komplexe vermittelt. Dieser Bereich umfasst die erste cysteinreiche Domäne und partizipiert nicht an der Ligandbindung (Chan et al., 2000). Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie können daher entweder als vorgeformte inaktive Komplexe in der Membran vorkommen (wie z.B. TNFR1, TNFR2, CD40) oder als einzelne Einheit. Nach Ligandenbindung kommt es jedoch in beiden Fällen zur Bildung trimerer Ligand-Rezeptorkomplexe, die ev. weiter aggregieren (Mukai et al., 2010). Die Signaltransduktion erfolgt bei den Mitgliedern der TNFR-Familie durch die ligandeninduzierte Rekrutierung zyttoplasmatischer Adaptermoleküle, da diese Rezeptoren keine intrinsische katalytische Aktivität besitzen. „TNF Rezeptor assoziierte Faktoren“ (TRAFs) und „death domain“ Adaptermoleküle wie z.B. „TNFR1 associated death domain“ (TRADD) oder „Fas-Associated protein with Death Domain“ (FADD) sind Beispiele für solche Adapterproteine. Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie werden in drei Gruppen eingeteilt: die Todesrezeptoren, die TRAF-bindenden Rezeptoren und die Decoy Rezeptoren. Die Todesrezeptoren sind durch die Todesdomäne („death domain“, DD) charakterisiert, eine konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne im C-terminalen Teil dieser Rezeptoren. Adapterproteine, die auch eine DD tragen, können über diesen Bereich rekrutiert werden. Manche Rezeptoren wie z.B. CD95, TRAILR1 und TRAILR2 bilden nach Ligandenbindung den „death inducing signaling complex“ (DISC), der das Adapterprotein FADD („Fas-associated death domain“), die Procaspasen-8 und -10 und fakultativ das „cellular FLICE-like inhibitory protein“ (cFLIP) umfasst, aus (Peter and Krammer, 2003). Im DISC erfolgt die Dimerisierung der Procaspase-8 und deren Aktivierung durch autoproteolytische Prozessierung. Die prozessierten aktiven Caspase-8 Moleküle werden ins Zytoplasma freigesetzt. Sekundär wird zelltypabhängig die Apoptose auf zwei

Wegen aktiviert. In Typ-I-Zellen ist die durch Caspase-8 erreichbare Prozessierung der Effektorcaspase Caspase-3 ausreichend, um die Effektorphase der Apoptose auszulösen (Kantari and Walczak, 2011). Das ist die sogenannte extrinsische Apoptose (Ghavami et al., 2009). In Typ-II-Zellen hingegen wird aufgrund der Inhibition von prozessierten Effektorcaspasen durch XIAP und ähnliche Moleküle ein weiterer Mechanismus für die Aktivierung der Effektorphase der Apoptose genutzt. Dieser Mechanismus wird durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung des „BH3-interacting domain death agonist“ (BID)-Proteins ausgelöst. BID ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl2 („*B-cell lymphoma 2*“)-Familie, dessen Spaltung in der Freisetzung des tBid-Proteins („truncated Bid“) resultiert (Li et al., 1998). Das gespaltene Fragment transloziert ins Mitochondrium und induziert dort Bax/Bak-abhängig („Bcl2-associated X protein“, „Bcl2 antagonist/killer“) die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Infolgedessen werden mitochondriellen pro-apoptotischen Faktoren (z.B. Cytochrom c) und Antagonisten von Caspaseinhibitoren der IAP (Inhibitors of apoptosis)-Familie wie SMAC/Diablo („second mitochondria derived activator of apoptosis“/„direct IAP binding protein with low pI“) freigesetzt. Anschließend bilden Cytochrom c, Procaspase-9 und Apaf-1 („apoptotic protease-activating factor-1“) das Apoptosom. Innerhalb des Apoptosoms wird die Caspase-9 aktiviert, was wiederum zur der Aktivierung Caspase-3 führt. Ferner hemmt SMAC/Diablo XIAP. Die anti-apoptotische Inhibition des extrinsischen Signalwegs wird dadurch aufgehoben. Diese indirekte Apoptoseinduktion wird als intrinsische Apoptose bezeichnet (Danial and Korsmeyer, 2004; Kantari and Walczak, 2011; Zaman et al., 2014). Acht Rezeptoren enthalten die Todesdomäne: TNFR1, TRAILR1, TRAILR2, p75-NGFR, DR3, DR6 EDAR, und CD95 und (Wajant, 2003; Guicciardi and Gores, 2009; Lavrik, 2014). Die TRAF-bindenden TNF-Rezeptoren interagieren direkt mit den Mitgliedern der TRAF-Familie, welche ihrerseits indirekt verschiedene „mitogen activated protein kinase“ (MAPK), wie z.B. p38, Erk1/2, cJun und das „nuclear factor kappa B“ (NF κ B)-System aktivieren. Dies wird im Abschnitt 1.1.3 ausführlicher beschrieben. Die Decoy Rezeptoren lösen keine Signaltransduktion aus, da sie keine intrazelluläre Domäne enthalten. Die bisherig charakterisierten Decoy Rezeptoren sind DcR1, DcR2, DcR3 und OPG (Ashkenazi, 1999; Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001).

Gruppe	Name/Systematische Nomenklatur	Abkürzung	Ligand(en)
Todes-Rezeptoren	Tumor necrosis Factor Receptor1	TNFR1	TNF α , LT α
	TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 1	TRAILR1	TRAIL
	TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor 2	TRAILR2	TRAIL
	Death Receptor 3	DR3	TL1A
	Death Receptor 6	DR6	?
	Ectodysplasin-A receptor	EDAR	EDA-A1
	FAS /Cluster of differentiation 95	CD95	FasL
	Nerve growth factor receptor	p75-NGFR	?
TRAF-Interagierende Rezeptoren	Tumor necrosis factor Receptor 2	TNFR2	TNF α , LT α
	TNF-related apoptosis-inducing ligand Receptor	TRAILR4	TRAIL
	Receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand	RANK	RANKL
	Fibroblast growth factor-inducible 14	Fn14	TWEAK
	Receptor expressed in lymphoid tissue	RELT	?
	Lymphotoxin- β receptor	LT β R	LT $\alpha\beta_2$, LIGHT
	Herpesvirus entry mediator	HVEM	LT α , LIGHT
	TNFRSF5	CD40	CD40L
	TNFRSF8	CD30	CD30L
	TNFRSF7	CD27	CD27L
	TNFRSF9	4-1BB	4-1BBL
	TNFRSF4	OX40	OX40L

Gruppe	Name/Systematische Nomenklatur	Abkürzung	Entsprechender Ligand
TRAF-Interagierende Rezeptoren	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein	GITR	GITRL
	X-linked ectodermal dysplasia receptor	XEDAR	EDA-A2
	TNFRSF expressed on the mouse embryo	TROY	?
	B cell maturation	BCMA	APRIL, BAFF
	B cell-activating factor receptor	BAFF-R	BAFF
	Transmembrane activator and CAML interactor	TACI	APRIL, BAFF
Decoy Rezeptoren	Osteoprotegerin	OPG	RANKL, TRAIL
	Decoy Receptor1	DcR1	TRAIL
	Decoy Receptor2	DcR2	TRAIL
	Decoy Receptor 3	DcR3	FasL, LIGHT, TL1A

Tabelle 1. TNF-Rezeptoren und ihre entsprechenden Liganden (nach Bodmer et al., 2002)

1.1.3 NF- κ B-Aktivierung in Rahmen der TNF-Superfamilie

Als erste Komponenten des NF κ B-Systems wurden DNA-bindende Proteine identifiziert, die regulatorische Sequenzen des Promotors der leichten Ketten von Antikörpern erkennen (Sen and Baltimore, 1986). Die namensgebende „nuclear factor of kappa B“ (NF κ B)-Familie umfasst fünf Proteine p65/RelA, RelB, cRel, p50/NF κ B1, und p52/NF κ B2, welche heterodimerische oder homodimerische Transkriptionsfaktoren bilden (Hayden and Ghosh, 2012). Alle Mitglieder des NF κ B-Systems werden durch die „Rel homology domain“ (RHD) charakterisiert, die an der Dimerisierung und DNA-Bindung beteiligt sind (May and Ghosh, 1997). In quieszenten Zellen ist die Kernlokalisationssequenz der Dimeren durch Interaktion mit inhibitorischen Proteinen der „inhibitors of NF κ B“ (I κ B)-Familie oder intramolekulare Bindung von inhibitorischen Domänen maskiert und infolgedessen bleiben die Dimere im Zytoplasma lokalisiert (Hoesel and Schmid, 2013). Die Vorläuferproteine p100 und p105 tragen „I κ B protein like“ inhibitorische Domänen im C-Terminus, die durch proteolytische Spaltung entfernt werden können, so dass daraus die aktiven Formen p50 und p52 entstehen (Caamaño and Hunter, 2002).

Die inhibitorischen Moleküle der I κ B-Familie zeichnen sich durch die sogenannte „ankyrin repeats“ aus, die die Bindung an die DNA-bindenden Domänen der NF κ B-Dimeren ermöglichen (Hoesel and Smith, 2013). Zur der I κ B-Familie gehören I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p105 und p100 (Shih et al., 2011; Caamaño and Hunter, 2002). Zwei Signalwege führen zur Aktivierung der NF κ B-Transkriptionsfaktoren, der klassische und der alternative NF κ B-Signalweg (Shih et al., 2011). Proinflammatorische Zytokine (TNF, LT α , IL1, TWEAK...), ROS („reactive oxygen species“) und virale und bakterielle Antigene können die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs hervorrufen. Die TNF-induzierte NF κ B-Aktivierung ist das traditionelle Beispiel der Funktionsweise des NF κ B-Systems und wird im Folgenden kurz zusammengefasst. In unstimulierten Zellen ist die Todesdomäne des TNFR1 durch das „silencer of death domain“ (SODD)-Protein maskiert. Die TNF/TNFR1-Interaktion führt zu einer Reorganisation des TNFR1-Komplexes und zur Dissoziation von SODD. Daraufhin werden die Adapterproteine „TNF receptor-associated death domain“ (TRADD) und „receptor interacting protein 1“ (RIP1) durch ihre Todesdomäne an den TNF/TNFR1-Komplex rekrutiert (Wajant and Scheurich, 2011). TRADD dient als Gerüst für die sekundäre Rekrutierung von TRAF2/1-cIAP1/2 Komplexen. Diese Komplexe bestehen aus heterotrimeren TRAF1/TRAF2-Molekülen oder homotrimerem TRAF2 und einem einzelnen cIAP1- oder cIAP2-Molekül (Zheng et al., 2010). RIP, TRAF2 und cIAPs werden sekundär K63-ubiquitiniert. Die K63-verknüpften Polyubiquitinketten dienen einerseits als Verankerungsstelle für den „linear ubiquitin chain assembly complex“ (LUBAC)-Komplex und den TAK-TAB-Komplex (Haas et al., 2009). Durch LUBAC erfolgt die Ubiquitinierung der NEMO-Untereinheit des IKK-Komplexes, der aus den Kinasen IKK1 und IKK2 und eben dem regulatorischen Gerüstprotein IKK- γ /NEMO besteht (Tokunaga et al., 2009). Dies ermöglicht die Interaktion von NEMO und TRAF2. Der TAK-TAB-Komplex, der aus den „transforming growth factor- β activated kinase-1“ (TAK1) und den Partnerproteinen „TAK1 binding protein-2“ (TAB2) und TAB3 besteht (Kanayama et al., 2004), bindet an die K63-Polyubiquitinketten von RIP1 und wird daraufhin aktiviert. Die Untereinheit TAK1 phosphoryliert und aktiviert nun IKK2. Dies führt zur IKK2-vermittelten K48-Ubiquitinierung des inhibitorischen Proteins I κ B α und somit zu dessen proteolytische Degradation durch das Proteasom. Nun können die verbleibenden NF κ B-Dimere p65/p50 in den

Kern translozieren (Wajant and Scheurich, 2011). Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs erfolgt durch verschiedene Rezeptoren der TNF-Familie, beispielweise Fn14, LT β R, BAFF-R, TNFR2 und RANK (Sun, 2011). In unstimulierten Zellen wird die „NF κ B inducing kinase“ (NIK) durch TRAF3 K48-ubiquitiniert und so für proteasomale Degradation markiert (Liao et al., 2004; Vallabhapurapu et al., 2008). Nach der Stimulation der alternativ NF κ B-aktivierenden Rezeptoren erfolgt eine TRAF2-vermittelte Rekrutierung und K63-Ubiquitinierung von cIAP1/2 an TRAF3 (Vallabhapurapu et al., 2008; Zarnegar et al., 2008). Die aktivierten cIAPs ermöglichen weiterhin die proteasomale Degradation von TRAF3 durch K48-Ubiquitinierung. Neusynthetisierte NIK-Moleküle können nun akkumulieren und dann IKK1 phosphorylieren (Zarnegar et al., 2008). Anders als im klassischen NF κ B-Signalweg wird das Vorläuferprotein p100 durch IKK1 unabhängig von NEMO und IKK2 phosphoryliert (Xiao et al., 2004). Dies dient als Erkennungssignal für den Ubiquitinligasekomplex SCF/ β TrCP (Fong and Sun, 2002) und triggert die proteolytische Prozessierung und somit die Entfernung der inhibitorischen Domäne von p100 durch das Proteasom. Nachfolgend werden die verbleibenden p52-tragenden Dimere (p52/RelB) in den Kern transloziert und die Transkription der Zielgenen induziert (Beinke and Ley, 2004). Überdies gibt es den sogenannten untypischen NF κ B-Signalweg. Genotoxischer Stress kann durch die Kinase „Ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) die Ubiquitinierung von NEMO im Kern induzieren. Infolgedessen wird IKK2 aktiviert und somit die Genexpression aktiviert (Huang et al., 2003). Das NF κ B-System reguliert die Genexpression von mehreren hundert verschiedenen Molekülen; z.B. BAFF (Moon and Park, 2007), CCL5 (Wickremasinghe et al., 2004), IL-2 (Rao et al., 2003), TNF α (Collart et al., 1990) und T-cell receptor/CD3gamma (Badran et al., 2002) aber auch von TRAF1 (Schwenzer et al., 1999).

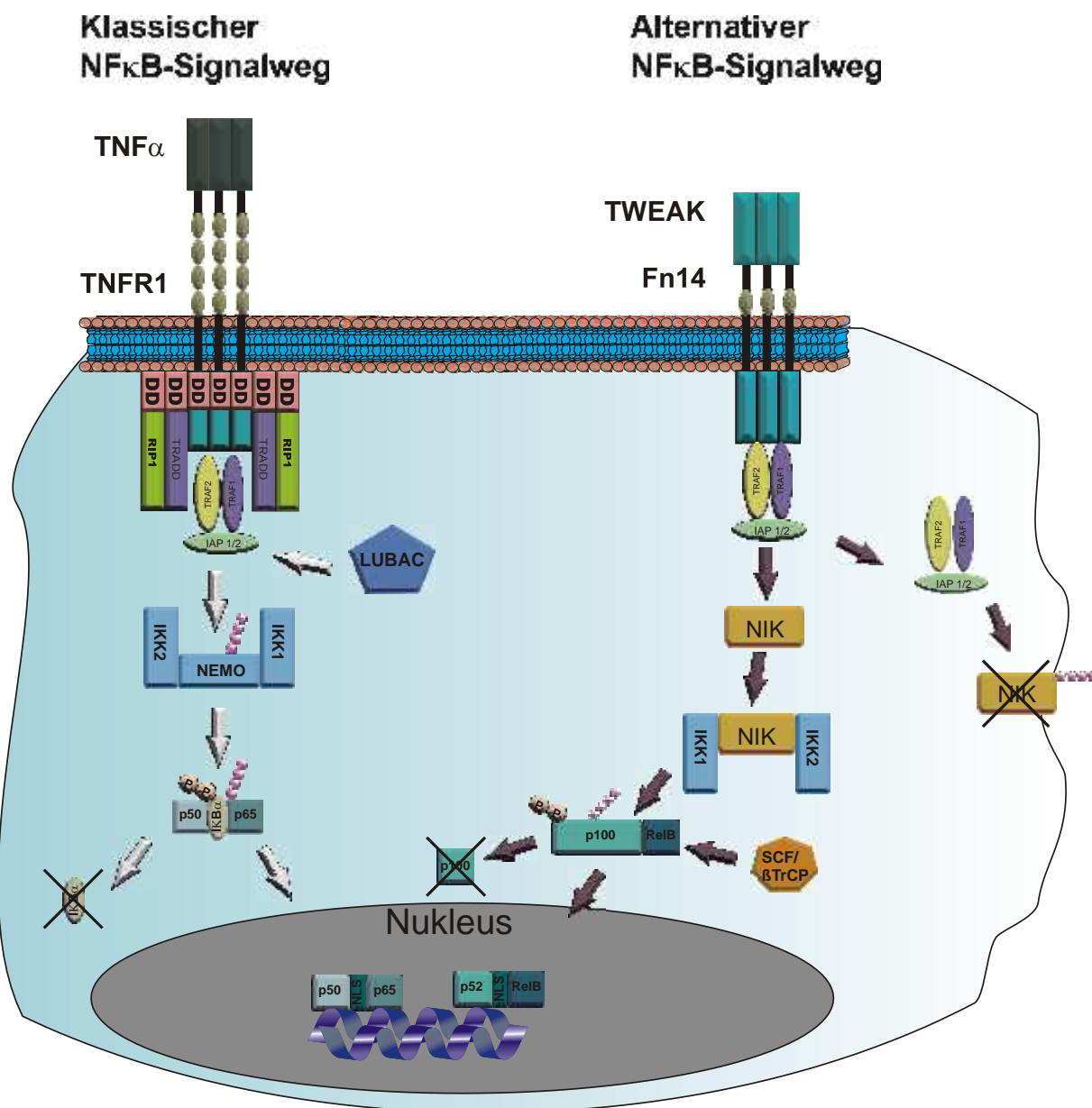


Abbildung 2: Schematische Darstellung des NF | B-Systems

1.2 TNF

Das älteste Mitglied der TNF-Superfamilie, der „Tumor Necrosis Factor“ (TNF) wurde 1975 erstmals isoliert. TNF(α), (auch als Kachektin bezeichnet), ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, das hauptsächlich von Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und T-Zellen aber auch in anderen Zellen wie Fibroblasten und Tumorzelllinien exprimiert wird (Wajant et al., 2003). TNF ist ein Typ-II-Transmembranprotein mit trimerer Struktur, das repräsentativ für die Liganden der TNF-Superfamilie ist. TNF besteht aus einer intrazellulären Domäne, welches am Membran-Trafficking und dem Reverse Signaling beteiligt ist; einer Transmembrandomäne und der extrazellulären Domäne, die die THD und eine Stalk-Region umfasst (Bodmer et al., 2002). In der Stalk-Region befindet sich die Schnittstelle für die Metalloprotease „TNF α converting enzyme“ (TACE/ ADAM17), die die lösliche TNF-Variante freisetzen kann (Black., 1997; Moss et al., 1997). Die lösliche und membranständige Form von TNF binden unterschiedslos an TNFR1 und TNFR2 (Grell et al., 1995). Jedoch aktiviert die membranständige Variante beide TNF-Rezeptoren wohingegen die lösliche Variante vor allem nur den TNFR1 stimuliert (Grell et al., 1995). TNFR1 und TNFR2 sind durch jeweils vier cysteinreiche Bereiche in ihren extrazellulären Domäne gekennzeichnet (Naismith and Sprang, 1998). Die TNFR2-Expression ist im wesentlichen auf das Immunsystem beschränkt, der TNFR1 hingegen zeigt eine ubiquitäre Expression in menschlichen Geweben (Wajant et al., 2003; Cabal-Hierro and Lazo, 2012; Speeckaert et al., 2012).

1.3 TWEAK/Fn14

1997 wurde „Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis“ (TWEAK), zunächst als ein breit exprimiertes Zytokine mit selektiver apoptotischer Wirkung auf wenige Zelllinien beschrieben (Chicheportiche et al., 1997). TWEAK (auch gekannt als APO3L, DR3LG, CD255) ist ein Ligand der TNF-Familie, der als

homotrimeres Typ-II Transmembranprotein exprimiert wird. TWEAK kann nach Proteolyse durch Furin-Protease aber auch als lösliches Molekül wirken. Das humane Gen für TWEAK befindet sich in dem Locus 17p13.1 und kodiert ein Peptid mit 249 Aminosäuren. Der C-Terminal extrazelluläre Teil besteht aus 206 Aminosäuren (AS) mit einer Stalk-Region und einer THD Domäne. Die Transmembrandomäne ist 25 AS lang und die N-terminale intrazelluläre Domäne hat 18 AS mit einer Serinphosphorylierungsstelle (Chicheportiche et al., 1997). Membranständiges TWEAK zeigt eine umfassendere biologische Aktivität als lösliches TWEAK. So aktivieren lösliches und membranständiges TWEAK sehr effektiv den alternativen NF κ B-Signalweg, der klassischen NF κ B-Signalweg hingegen wird durch Membran-TWEAK weitaus besser aktiviert als durch lösliches TWEAK (Roos et al., 2010). Die Oligomerisierung vom löslichen TWEAK potenziert jedoch dessen klassisch NF κ B-stimulierende Aktivität (Roos et al., 2010). TWEAK wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert u.a. in Monozyten, Makrophagen, Astrozyten und verschiedenen humanen Tumorzelllinien (Winkles, 2008). In 2001 wurde der „Human fibroblast growth factor-inducible 14“ (Fn14) als TWEAK-Rezeptor identifiziert (Wiley et al., 2001). Das humane Gen für Fn14 liegt in dem Locus 16p13.3 (Feng et al., 2000) und kodiert ein Protein mit 129 AS, das als Typ-I-Transmembranprotein exprimiert wird. Fn14 ist der kleinste Rezeptor der TNF-Familie; sein extrazellulärer Teil besitzt nur eine cysteinreiche Domäne (CRD), im Gegensatz zu der Mehrheit der Mitglieder der TNF-Familie die zwei bis vier CRDs haben. Der zytoplasmatische Teil des Fn14 besteht nur aus 28 AS und umfasst nur ein TRAF-bindendes Motiv, an das TRAF5, TRAF3, TRAF2 und TRAF1 binden können, aber keine Todesdomäne (Brown et al., 2003; Han et al., 2003). Die Fn14 Expression wurde in allen humanen Geweben, außer in T und B-Lymphozyten nachgewiesen (Burkly et al., 2007; Winkles, 2008). Als Folge der TWEAK/Fn14 Interaktion werden multipel Signalwege aktiviert wie z.B. Erk, JNK, PI3K/ AKT, vor allem aber auch das NF κ B-System (Kumar et al., 2009; Blanco-Colio, 2014). Vielerlei zelluläre Effekte werden durch das TWEAK/Fn14 System reguliert, beispielweise: Migration, Apoptose, Zelldifferenzierung Proliferation, Zellüberleben und Angiogenese.

1.4 CD40L/CD40

1.4.1 CD40Ligand/CD154

Der zu der TNF-Familie gehörige Ligand CD40L (TRAP, gp39, CD154) wird als Typ-II- Transmembranprotein exprimiert und hat ein Gewicht von 32 bis 39 kDa. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei β -Faltblättern und einer α -Helix zwischen ihnen. Obwohl die membranständige Variante überwiegt, wurden die lösliche Variante auch beobachtet (Elgueta et al., 2009; Graf et al., 1995). Der CD40L kann als Heterokomplex zusammen mit zwei kürzeren Varianten auf der Membran exprimiert werden (Mazzei et al., 1995; Hsu et al., 1997). Diese Varianten sind jeweils 31 oder 18 kDa groß und behalten die Fähigkeit an den CD40 zu binden und biologische Reaktionen hervorzurufen. CD40L weist drei Bindungsziele vor: CD40 und die Integrine α IIb β 3 und α 5 β 1 (Alturaihi et al., 2015). CD40L wird hauptsächlich in aktivierten T-Zellen und B-Zellen, Thrombozyten, NK-Zellen, Monozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert; ebenso in Zellen der glatten Muskulatur, endothelialen und epithelialen Zellen.

1.4.2 Der CD40 Rezeptor

CD40 ist ein Rezeptor der TNF-Familie, der 1984 mittels eines Antikörpers gegen Harnblasenkrebs identifiziert wurde (Koho et al., 1984; Paulie et al., 1984). Der CD40 Rezeptor ist ein 48 kDa Typ-I-Transmembranprotein, das in B-Zellen, Dendritischen Zellen, Makrophagen, blutzellbildenden Stammzellen, verschiedenen Karzinomzellen und epithelialen Zellen des Thymus exprimiert wird (Kehry, 1996). CD40 umfasst 193 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne, 21 Aminosäuren in der Leader Sequenz, 22 Aminosäuren in der transmembranen Domäne und 62 AS in der intrazellulären Domäne (van Kooten and Banchereau, 2000). Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus vier CDRs (Kehry, 1996). In dem intrazellulären Teil befinden sich Bindungsstellen für verschiedene Moleküle wie z.B. TRAF2, TRAF3, TRAF6 oder JAK3 (Bishop et al., 2007; Hanissian and Geha, 1997; Säemann et al., 2003). Die Interaktion des CD40L mit CD40 führt zunächst zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Anschließend werden TRAF-Proteine direkt

oder indirekt an die zytoplasmatische Domäne rekrutiert (Pullen et al., 1998; Fotin-Mleczek et al., 2004) und intrazelluläre Signalwege aktiviert, die beispielweise zur Aktivierung von NF κ Bs, STAT3, AKT/PI3K, JNK, JAK3, und ERK1/2 führen. Die Interaktion CD40L/CD40 löst wichtige Vorgänge in verschiedenen Zellen aus. In Dendritischen Zellen induziert sie die Zytokin-Produktion (z.B. IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12), stimuliert die Antigenpräsentation und die Reifung der Zellen (van Kooten and Banchereau, 2000; Chatzigeorgiou et al., 2009; Caux et al., 1994). In Monozyten wird durch CD40 die Überlebensrate erhöht und die Zytokinproduktion wird gesteigert. CD40 induziert auch Wachstum, Differenzierung und Antikörperproduktion in Subpopulationen von B-Zellen (van Kooten and Banchereau., 2000). So kann die CD40-Aktivierung erneut Telomerasen in B-Gedächtniszellen aktivieren und die Zellen von der Apoptose retten. CD40-Signaling ist unerlässlich für den Antikörperklassenwechsel, Zellproliferation in den B-Zellen, die Aktivierung des AID-Enzyms und für die Entwicklung des Immungedächtnisses und des Keimzentrums. CD40 kann auch die Umwandlung der B-Zellen in Plasmazellen inhibieren und die Produktion der Zytokine IL-6, IL-10, TNF α und LT α in diesen Zellen erhöhen (Randall et al., 1998; van Kooten and Banchereau, 2000). Darüber hinaus ist CD40 an der Aktivierung der Dendritische Zellen und Makrophagen durch T-Zellen beteiligt. CD40-Signaling ist vorwiegend wichtig in den direkten Interaktionen zwischen den Zellen. Entsprechend ist die Deregulierung des CD40 in verschiedenen Erkrankungen verwickelt. So verursachen z.B. Mutationen im CD40/CD40L das Hyper-IgM-Syndrom und ebenso wurde eine Überexpression/ektopische Expression des Rezeptors im Non-Hodgkin und Hodgkin-Lymphom, im Multiplem Myelom sowie Karzinomen der Harnblase, der Zervix und der Niere festgestellt (Tai et al., 2003; Annunziata et al., 2000; Tong and Stone, 2003; Hassan et al., 2015; Altenburg et al., 1999; Pellat-Deceunynck et al., 1996).

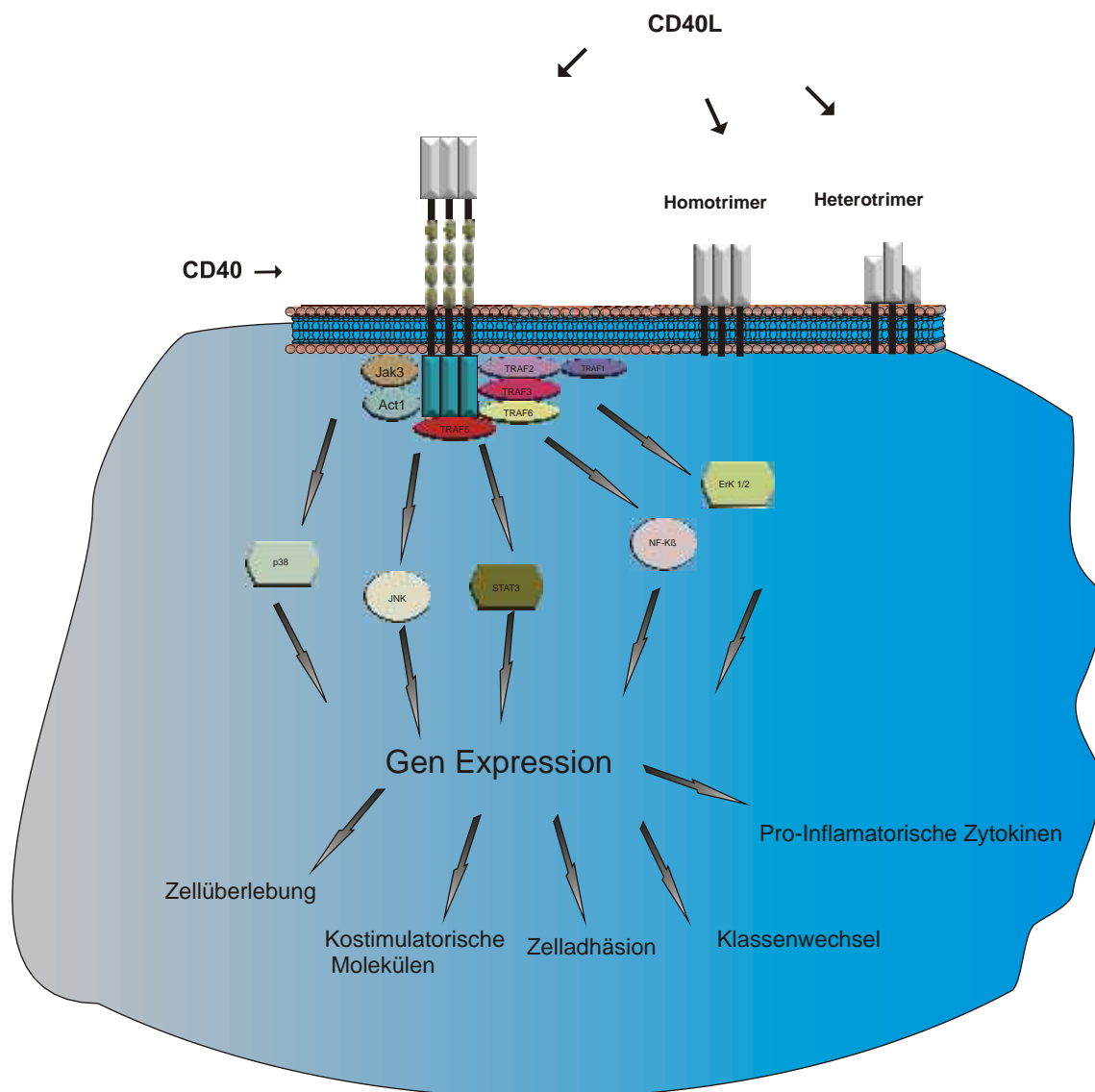


Abbildung 3. Model der Signaltransduktion von CD40L/CD40

1.5 TRAF Moleküle

Die „Tumor necrosis factor receptor associated factor“ (TRAF)-Proteine sind Adapterproteine, welche eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Rezeptoren der TNFR-Familie spielen (Inoue et al., 2000; Wajant et al., 2001). Sechs TRAF-Proteine wurden bisher in Säugetieren identifiziert (TRAF1-6) sowie ein etwas weniger ähnliches Protein, das TRAF7 genannt wurde (Xie, 2013). Die TRAF-Proteine TRAF1 – TRAF6 zeichnen sich durch die C-terminale TRAF-Domäne aus, die aus der N-terminalen (TRAF-N) und C-terminalen (TRAF-C) Subdomäne besteht (Bradley and Pober, 2001). Die TRAF-C Subdomäne ermöglicht die Bindung an die intrazelluläre Domänen von TNF-Rezeptoren und die Interaktionen mit regulatorischen Proteinen, die TRAF-N Subdomäne hingegen ist an der Oligomerisierung beteiligt (Zotti et al., 2012; Häcker et al., 2011). Die TRAF-Proteine TRAF2- TRAF6 tragen 5 -7 Zinkfingerdomänen und ein „really interesting new gene“ (RING)-Finger-Motiv, das diesen Proteinen eine E3 Ubiquitin-Ligase Wirkung verleiht (Ostuni et al., 2010; Häcker et al., 2011), in ihrer N-terminalen Hälfte. TRAF1 hingegen besitzt kein RING-Finger-Motiv und nur ein einzelnes Zinkfinger-Motiv. TRAFs können als Adapterproteine von vielen Rezeptoren dienen, so z.B. von TNF-Rezeptoren, Rezeptoren der „Toll-like receptor“ (TLRs)-Familie, der „NOD-like receptors“ (NLRs)-Familie und der „RIG-I like receptors“ RLR-Familie (Kawai and Akira, 2010; Saleh., 2011; Loo et Gale., 2011; Yu and Levine, 2011). Die TRAF-Proteine können direkt durch die „TRAF interacting motifs“ (TIMs) oder indirekt durch Adapterproteine wie TRADD und RIP an die TNF-Rezeptoren rekrutiert werden (Xie, 2013). TRAFs können als Gerüstprotein in den rezeptorassoziierten Signalkomplexen wirken, können aber auch mittels ihrer RING-Domäne andere Proteine durch Ubiquitinierung modifizieren (Xie, 2013; Yoon et al., 2014). Multiple intrazelluläre Signalwege, die z.B. zur Aktivierung von NF κ B, JNK, p38 oder ERK1/2 führen, werden durch die TRAFs aktiviert und somit werden durch diese Proteine viele verschiedene biologische Funktionen gesteuert (Chung et al., 2002; Wajant et al., 2001; Xie, 2013).

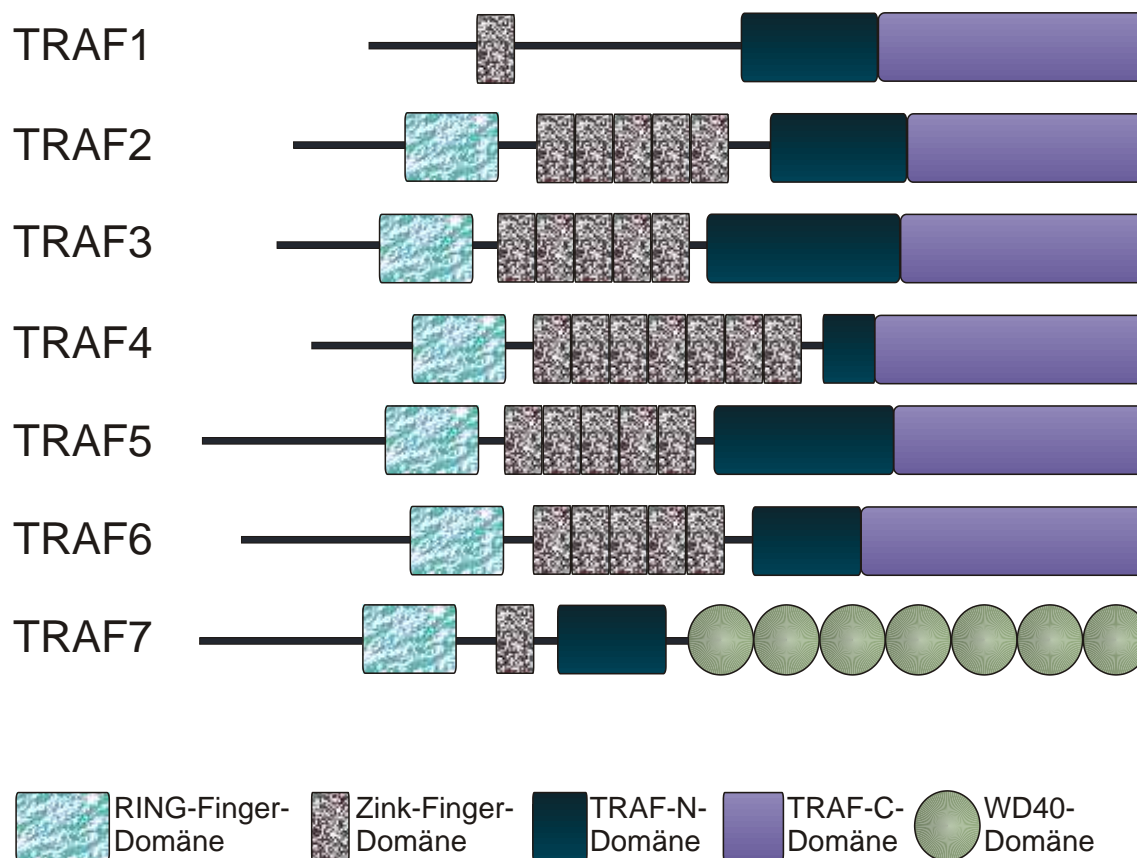


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur der TRAF-Proteinen

1.6 Zielsetzung

Unterschiedliche biologische Funktionen werden durch das Zytokin TWEAK reguliert. Die Signaltransduktion des TWEAK/Fn14-Systems erfolgt wesentlich durch das NF κ B-System. Die lösliche und membranständige (oder als Surrogat auch oligomerisiertes lösliches TWEAK) TWEAK-Variante stimulieren die zwei Zweige des NF κ B-Systems jedoch mit unterschiedlicher Effektivität. Das Adapterprotein TRAF1 ist ein stark durch das NF κ B-System reguliertes Molekül und interagiert mit TRAF2, das für die Signaltransduktion der meisten Rezeptoren der TNF-Familie sehr wichtig ist. Deshalb sollte untersucht werden, ob beide TWEAK-Varianten und somit beide NF κ B-Signalwege TRAF1 zu induzieren vermögen. Weiterhin sollte geklärt werden inwieweit TWEAK mittels TRAF1-Induktion die TRAF2-vermittelte CD40-Signaltransduktion modifiziert.

2 Materialien

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
1 kb DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
ABTS-Puffer	Roche, Mannheim, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Anti-FLAG M2 Agarose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cycloheximid (CHX)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMEM Medium	PAA, Pasching, Österreich
DMEM-F12	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline)	PAA, Pasching, Österreich
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Detuschland
Ethanol	J.T. Baker, Leibzig, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACSFlowTM	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Geneticindisulfat (G418-Sulfat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipofektamine® 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Leibzig, Deutschland
Milchpulver	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MG-132	Calbiochem, Schwabach, Deutschland
MLN4924	Active Biochem (Maplewood, NJ, USA),
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (100 x)	PAA, Pasching, Österreich
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphataseinhibitor II	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Prestained Protein Marker (Broad Range)	NEB , Frankfurt, Deutschland
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Medium	Lonza, Köln, Deutschland
TPCA1	Biozol, Eching, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
z-VAD	Bachem, Heidelberg, Deutschland

2.2 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.3 Antikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller
Anti-Caspase-3	Kaninchen polyklonal, #9662	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Caspase-9	Rabbit polyclonal, #9502	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-CD40-PE	Maus IgG1,	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-ERK	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Flag (M2)	Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-I κ B α	Maus monoklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-IL6 (OptEIA ELISA)	OptEIA ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-IL8 (OptEIA ELISA)	OptEIA ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-JNK	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Denmark
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Maus IRDye 800	Ziege polyklonal	LI-COR Bioscience, Bad Homburg, Deutschland
Anti-Maus-HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-NIK	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Anti-pERK	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-p38	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-p100/52	Maus monoklonal	Upstate/Millipore, Schwalbach, Deutschland
Anti-p-I κ B α	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-pJNK	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-pp38	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-TRAF1	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-Tubulin	Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Ansbach, Deutschland
Anti-TWEAK	Ziege polyklonal, IgG	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-TWEAK(OptEIA ELISA)		R&D Systems, Mineapolis, USA
Anti-Ziege-HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti- β -Actin	Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Mouse IgG1-PE	Klon 11711	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Streptavidin-HRP		BD Biosciences, Heidelberg

2.4 Lösungen und Puffer

Lösung	Zubereitung
Assay Diluent	1 x PBS 10 % (v/v) FCS
Blotpuffer (10x)	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
ELISA Coating Buffer	0,1 M Natriumcarbonat 8,4 g/l NaHCO ₃ 3,56 g/l Na ₂ CO ₃ pH 9,5
Laufpuffer (10x)	0,05 M Tris 0,38 M Glycin 0,004 M SDS pH 8,3
LB Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g/l NaCl
PBS (Phosphate buffered saline)	0,02 M Na-Phosphat 0,7 % (w/v) NaCl pH 7,2
PBST	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20

Materialien

PBST in Milch	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilch
Probenpuffer (SDS-PAGE 4x)	8% (w/v) SDS 10% β -Mercaptoethanol 40 % Glycerol 0,2M Tris Bromphenolblau pH 8
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8
TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	0,02 M Tris 8 % (w/v) NaCl pH 7,6
TBST	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween-20
TBST in Milch	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilch
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8

2.5 Kits

System	Hersteller
BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit	NEB, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DNA-Gelextraktion NucleoSpin® Extract II Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
OptEIA IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
OptEIA IL6-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
OptEIA TWEAK-ELISA Kit	R&D Systems, Mineapolis, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pierce Silver Stain Kit Fermentas,	Fermentas ,St. Leon-Rot, Deutschland
PureYield Plasmid Miniprep/Midiprep-	System Promega, Mannheim, Deutschland

2.6 Apparaturen und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
Agfa Curix 60 Entwicklungsmaschine	Agfa, Düsseldorf, Deutschland
Begasungsschrank Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresesystem „Mini-Protean-Tetra Cell“	BioRad, München, Deutschland
Elektroporator Equibio EasyjecT Plus	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius Acculab Atilon, Göttingen Deutschland
Gellaufkammern SDS-PAGE	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Heizblock	PeqLab, Erlangen, Deutschland
LI-COR Odyssey® Infrared Imaging system	Biosciences, Lincoln, USA
Luminometer Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld, Deutschland
Mikrozentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Thermocycle Primus	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Schüttler/Kippwippe	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Semi-Dry-Blotkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching, Deutschland
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher Ultrasonics, Teltow, Deutschland
Ultrazentrifuge OPTIMA-L70	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortexer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Wet-Blotkammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-, 24-, 12-, 6-Well Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96-Well ELISA-Platten (high binding)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Blotting-Papier (0,35 mm, 195 g/m ²)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Durchflusszytometrie Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Entwickler-Lösung	Agfa, Düsseldorf, Deutschland
Fixierer G334(i)	Agfa, Düsseldorf, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße)	Whatman, Dassel, Deutschland
Parafilm M (38 m x 10 cm)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Petrischalen (35, 60 und 100 mm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Polyallomerröhrchen	Seton, Los Gatos, CA, USA
Polypropylenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Garching, Deutschland
schwarze 96-well Platten (high binding)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Untersuchungshandschue	Medline, Mundelein, USA
Whatman-Papier	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 und 175 cm ²)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (145 mm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (35 und 60 mm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber mit Drehkopf	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

2.7 Zelllinien

2.7.1 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Ursprung	Quelle
786O	Humane Nierenkarzinomzelllinie	Institutseigener Stock
786O-TRAF1	Humane Nierenkarzinomzelllinie	eigene Herstellung
A172	Human Glioblastomzelllinie	Universitäres Centrum für Tumorerkrankungen Frankfurt
A172-IκBα-Sr	Human Glioblastomzelllinie	Universitäres Centrum für Tumorerkrankungen Frankfurt
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie	Institutseigener Stock
HeLaCD40	Human Zervixkarzinomzelllinie	Institutseigener Stock
HT1080	Humane Fibrosarkomzelllinie	Institutseigener Stock
HT1080-CD40	Humane Fibrosarkomzelllinie	Institutseigener Stock
OAW-42	Humane Ovarialkarzinomzelllinie	Institutseigener Stock
U2OS	Humane Osteosarkomzelllinie	Institutseigener Stock
U2OS-TRAF1	Humane Osteosarkomzelllinie	eigene Herstellung

2.7.2 Mesenchymale humane Stammzellen

Mesenchymale humane Stammzellen wurden aus dem Stock des Lehrstuhls für Tissue Engineering & Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg erhalten.

2.7.3 Prokaryotische Zellen

NEB 5-α Competent *E.Coli* (High Efficiency) wurden von dem Unternehmen New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) erstanden.

2.8 Rekombinante Fusionsproteine und Plasmide

Plasmide	
TWEAK-R90A-R93A-R97A-pCR3	Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine und Plasmide wurden entweder von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin Würzburg zur Verfügung gestellt oder selbst kloniert.
TWEAK-Flag-pCR3	
pCMV(CAT)T7-SB100	
TRAF1 (D159/163A)-pT2/SV-Neo	
Fusionsprotein	
Flag-TWEAK	
Fc-TWEAK	
Flag-TNF	
Fc-Flag-CD40L	
GpL-Fc-Flag-CD40L	

3 Methoden

3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen unter Standardbedingungen (Brutschrank 37°C, 5% CO₂) kultiviert. 786O-, 786O-TRAF1, HT1080-, HT1080-CD40-, OAW42- und HeLaCD40-Zellen wurden in RPMI1640 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. U2OS-, U2OS-TRAF1-, A172-, A172-I κ B α -SR-Zellen wurden in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Mesenchymale humane Stammzellen wurden entweder in DMEM-F12-Ham mit 10% FCS oder mit TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Medium kultiviert. Je nach Wachstumsrate wurden die Zellen wöchentlich geteilt. Bei 70 bis 90 % Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturboden inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen in deren entsprechenden Medium, mittels eines Zellschabers geerntet und bei 1.200 UpM, 4 min abzentrifugiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Ein Teil der Zellen (5-10 %) wurde weiter kultiviert, und der Rest wurde entweder für Experimente verwendet, weggeworfen oder bei -80°C konserviert.

3.2 Konservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen

Um eine langfristige Verwendung der Zellen zu ermöglichen, wurde ein Zellrest von jeder Zelllinie gelagert. Restlichen Zellpellets aus den Kulturen wurden in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C konserviert. Die Zellrevitalisierung erfolgte folgendermaßen: die Zellen wurden bei Raumtemperatur schnell aufgetaut, in Zellkulturmedium resuspendiert und abzentrifugiert. Um das DMSO zu entfernen wurde der ganze Überstand verworfen. Daraufhin wurden die Zellpellets in frischem Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.3 Produktion der rekombinanten Proteine

HEK293-Zellen wurden durch Elektroporation mit Expressionsplasmiden, die für das Protein von Interesse kodieren, transient transfiziert. Zu diesem Zweck wurden 30×10^6 Zellen aus einer Zellkulturflasche, geerntet und pelletiert (wie in Abschnitt 3.1). Anschließend wurde der Zellpellet in 1 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert, in eine Elektroporationsküvette überführt und mit 40 µg von dem entsprechenden Plasmid versetzt. Die Elektroporation wurde bei 250 V, 1800 µF durchgeführt. Danach wurden die transfizierte Zellen in großer Zellkulturschale in RPMI 1640 Medium mit 2 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Schließlich wurde der Überstand nach 4-5 Tagen abgenommen und durch Zentrifugation (4600 UpM 10 Minuten) die restliche Zellen entfernt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde ein Aliquot des Überstandes zusammen mit einem Proteinstandard auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Western blotting (Siehe Abschnitt 3.10).

3.4 Herstellung der stabil transfizierte TRAF1-Zellen

Mittels Elektroporation wurden 786O-, und U2OS-Zellen mit Expressionsplasmiden des Sleeping Beauty System transfiziert (Siehe 3.3), welche für TRAF1 und eine Sleeping Beauty-spezifische Transpoase kodieren. Danach wurden die Zellen in eine große Zellkulturschale mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep in RPMI 1640 Medium kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von G418-Sulfat (500 µg/ml) für 2-3 Wochen selektioniert. Um die TRAF1-Überexpression zu konstatieren, wurden die TRAF1-Expression in den transfizierten Zellen und in Kontrollzellen durch Western blotting analysiert.

3.5 Herstellung von Gesamtzelllysaten nach Stimulation

Um die Protein-Expression zu untersuchen, wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Zu diesen Zweck wurden die Experimente in 6-Well Platten (5×10^5 Zellen/Well) durchgeführt. Die Stimulation wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS beendet, die

Zellen wurden mittels eines Zellschabers bei 4°C abgekratzt und in 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 4°C 14.000 UpM abzentrifugiert und der Überstand weggeworfen. Das Zellpellet wurde in 130 µl mit 1:25 Protease- (Roche, Mannheim) und 1:50 Phosphatase-Inhibitor I/II/III (Sigma, Deisenhofen) supplementiertem Probenpuffer resuspendiert und für 15 Sekunden sonifiziert. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben bei 96°C für 8 min aufgekocht. Schließlich wurden die Proben 10 min bei 14000 UpM abzentrifugiert und die fertigen Gesamtzelllysate für Western Blott-Analysen verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.6 Gleichgewichtsbindungsstudien

Für die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsstudien wurden 2×10^5 Zellen/Well in 24-Well Platten ausgesät und weiter in Kultur behalten. Nach 16 Stunden wurde das Medium gewechselt. Um die unspezifische Bindung zu bestimmen wurde die Hälfte der Platte mit 3 µg/ml Fc-Flag-CD40L bei 37°C für eine Stunde vorbehandelt. Vorbehandelte und unbehandelte Wells (totale Bindung) wurden paarweise mit steigenden Konzentrationen von GpL-Fc-Flag-CD40L bei 37° 1 Stunde inkubiert. Durch 10 x waschen mit eiskaltem PBS wurden die ungebundenen Ligandenmoleküle entfernt. Im Folgenden wurden die Zellen in 50 µl Medium (RPMI 1640, 0,5 % FCS, Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und in eine schwarze 96-Well Platte überführt. Für die Berechnung der Rezeptoranzahl pro Zelle wurde die Zellen eines Well mit Trypsin abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Quantifizierung der GpL-Aktivität erfolgte mittels eines *Gaussia* Luciferase Assay Kits und eines Lucy 2 Luminometers. Hierzu wurde der zellgebundenen *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) 10 µl einer Lösung (GpL-Substrat 1:100 in GpL-Puffer, *Gaussia* Luciferase Assay Kit, New England Biolabs, Frankfurt) zugegeben und die Lumineszenz in dem Luminometer gemessen (Verweildauer 1 Sekunde pro Well). Zuvor wurde die Luziferaseaktivität einer bekannter Konzentration des GpL-Fc-Flag-CD40L gemessen, um die relativen Lichteinheiten in Molekülzahlen umrechnen zu können. Die Messung erfolgte spaltenweise aufgrund der schnellen Abnahme der Luziferaseaktivität. Der Messfehler (< 5 %) wurde anhand einer Lösung bekannter konstanter

Konzentration von einem GpL-Fusionsproteinstandard etabliert und bei der Auswertung durch einen Korrekturfaktor berücksichtigt. Die spezifische Bindung wurde als Differenz der unspezifischen Bindung und der totalen Bindung kalkuliert. Die K_D wurde mit den spezifischen Bindungswerten durch nicht linear Regression ermittelt.

3.7 Statistik, Berechnungen und Darstellung der Daten

Der GraphPad Prism 5.0 Software (GraphPad Software, Inc) wurde für die Kalkulationen der kinetischen Parameter und der Regression Analyse verwendet. Die Abbildungen wurden mittels der CorelDRAW Graphics Suite X4 Software angefertigt.

3.8 ELISA Analyse

Für die Bestimmung der IL8- und IL6-Produktion wurden die untersuchten Zelllinien in 96-Well Flachbodenplatten (2×10^4 Zellen/Well) mit 100 μ l des jeweiligen Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in frischen Medium mit den angegebenen Liganden in Triplikaten für 19 Stunden stimuliert. Parallel wurden 96-Well ELISA-Platten mit den humanen anti-IL8- oder anti-IL6 Capture-Antikörper beschichtet (aus dem OptEIA IL6- und IL8-ELISA-Kit BD Biosciences, nach Angaben des Herstellers) und bei 4°C gelagert. Nach der Stimulationszeit wurde der Zellüberstand bei -20°C aufbewahrt oder weiter benutzt. Als nächstes wurden die ELISA-Platten mit Assay Diluent (PBS mit FCS 10%) für 1 Stunde geblockt und danach gewaschen (5x mit PBS). Der Zellüberstand wurde dann auf die ELISA-Platten zusammen mit einer IL8- oder IL6-Standardlösung (2, 1, -0,5 ng/ml) aufgetragen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die ELISA-Platten gewaschen (5x mit PBS), und eine Mischung aus biotinyliertem anti-IL8- oder anti-IL6-Antikörper und Streptavidin-Meerrettichperoxidase-HRP wurde auf die Platten für 1 Stunde gegeben. Letztendlich wurden die Platten erneut gewaschen (5x mit PBS). Die Quantität des in den Zellüberstand sekretierten IL8/6

wurde durch Zugabe des HRP-Substrates ABTS (gelöst in ABTS Puffer) und der Messung im ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt.

3.9 ELISA Analyse in transient transfizierten Zellen

Der Einfluss der Überexpression verschiedenen TWEAK-Varianten auf die Zytokinproduktion wurde in HT1080-Zellen untersucht. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen in 6 cm Zellkulturschale ausgesät, und über Nacht weiter kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels des Lipofektamine Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, nach Herstellerangaben) mit Expressionsplasmiden für lösliches TWEAK (TWEAK(ed)-Flag-pCR3), membranständiges TWEAK (TWEAK-R90A-R93A-R07A-pCR3), und pCR3 Leervektor transfiziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in der Neubaukammer gezählt, und in 6-Well Platten, und 96-Well Platen ausplattiert und für 6 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und ein Teil der Zellen mit TWEAK-Flag (200 ng/ml) über Nacht stimuliert. Schließlich wurden die Überstände von 96-Well Platen abgenommen und die Menge von IL8 und TWEAK quantifiziert. Mit der 6-Well Platten wurden Gesamtzelllysate hergestellt, und die Proteinexpression wurde durch Western blotting untersucht.

3.10 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression des CD40 in verschiedener Zelllinien war die Zellbehandlung folgende: die Zellen wurden geerntet, gewaschen mit PBS, gezählt und etwa 7×10^5 Zellen/Probe in Durchflusszytometrie Röhrchen überführt. In der Folge wurden die Zellen mit Phycoerythrin-konjugierten monoklonalen CD40-spezifischen Antikörper bzw. den entsprechenden Isotypkontroll-Antikörper für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Zuletzt wurden die Proben gewaschen (4x mit PBS) und die Fluoreszenz der zellgebunden Antikörper anhand BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen.

3.11 Western Blot

3.11.1 SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Auftrennung der Proteine der Gesamtzelllysaten erfolgte durch ein SDS-Polyacrylamid-Gel, welches aus Trenngel und Sammelgel besteht. Das Trenngel wurde mit Trenngelpuffer (0,374 M Tris pH 8,8; 0,0035 M SDS), 0,1% APS, 12% Acrylamid angesetzt. Um die Polymerisation des Trenngels herbeizuführen wurde 0,1% TEMED verwendet. Bevor die Polymerisation beendet war, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine platte Gelgrenze zu erlangen. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgeschüttet. Um die Sammlung der Proben zu ermöglichen, wurde das Trenngel mit einem Sammelgel (6% Polyacrylamid, Sammelpuffer (0,125 M Tris pH 6,8; 0,00375 M SDS), 0,1% APS und TEMED 0,1% für die Polymerisation) überschichtet. Unmittelbar danach, bevor das Sammelgel vollständig polymerisierte, wurde ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm herausgenommen und die Proteinproben und ein Molekulargewichtsstandard (Prestained Protein Marker, Broad Range, New England Biolabs, Frankfurt) in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch 90 min bei 90-130 V und 400 mA in einer Gellaufkammer (Peqlab, Erlangen) aufgetrennt.

3.11.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte entweder in einer vertikalen Nassblotkammer oder in einer semi-dry horizontalen Blotkammer (Peqlab, Erlangen). Die Nitrozellulosemembran und vier Stück Whatman-Papier wurden in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) befeuchtet und folgendermaßen in die Blotkammer gelegt: Anode - 2 Lagen Whatman-Papier - Nitrozellulosemembran - Gel - 2 Lagen Whatman-Papier - Kathode. Die Proben wurden jeweils 90 Minuten bei Raumtemperatur und eine Spannung von 90 V und 400 mA in der Nassblotkammer oder 105 Minuten bei Raumtemperatur, 300 V und 1,5 mA/cm² Gelfläche in der semi-dry Blotkammer geblottet.

3.11.3 Immundetektion

Zunächst wurden die unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch Zugabe von PBS-T- bzw. TBS-T-Milch (5%) (1xPBS bzw. 1xTBST; 0,05 % (v/v) Tween-20; 5 % (w/v) Magermilchpulver) für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler abgeblockt. Nach zweimaligem Waschen in PBS-T- bzw. TBS-T für 5 min wurde die Nitrozellulosemembran mit den Erstantikörper (nach Angaben des Herstellers) in PBS-T oder TBS-T über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran erneut in PBS-T oder TBS-T dreimal für fünf Minuten gewaschen, und mit einem Peroxidase-konjugierten bzw. fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur in PBS-T, TBS-T oder TBS-T-Milch (5 %) inkubiert. Daraufhin wurde die Membran wiederum 3 mal für 5 min in PBS-T oder TBS-T gewaschen. Schließlich wurde die Nachweisreaktion durchgeführt; bei Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern erfolgte dies mit dem ECL Kit (enhanced chemiluminescence) und Röntgenfilmen (GE Healthcare, Garching) in der Agfa Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa, Düsseldorf). Die fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper wurden durch das LI-COR Odyssey®-System (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) auf der Membran visualisiert.

3.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

1 µl DNA (1:100), 1 µl MgCl₂, 1 µl Primer 1/ 2, 1 µl dNTPs, 5 µl 10x Puffer; 0,75 µl Polymerase und 40 µl H₂O wurden für die PCR verwendet. Der Ablauf des PCR-Programms war wie folgt: Denaturierung - Die Proben wurden für 3 min bei 94°C inkubiert und wurden daraufhin 30 Zyklen für 30 sek bei 94°C denaturiert. Primerhybridisierung für 45 sek bei 55°C und Elongation für 60 sek bei 72°C. Letztendlich wurden die Proben für 10 min bei 72 °C elongiert.

4 Ergebnisse

4.1 TWEAK induziert TRAF1 stärker als TNF

Lösliches TWEAK und lösliches TNF wurden in Bezug auf die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs verglichen. Die Zelllinien HT1080, 786O, U2OS, OAW42 und A172 und mesenchymale Stammzellen wurden mit Flag-TWEAK und Flag-TNF stimuliert und anschließend die Gesamt-Zelllysate mittels Western Blotting analysiert. Aus früheren Studien ist bekannt, dass TNF effizient eine Phosphorylierung und Degradierung von I κ B α induziert, d.h. den klassischen NF κ B-Signalweg aktiviert (Wicovsky et al., 2009).

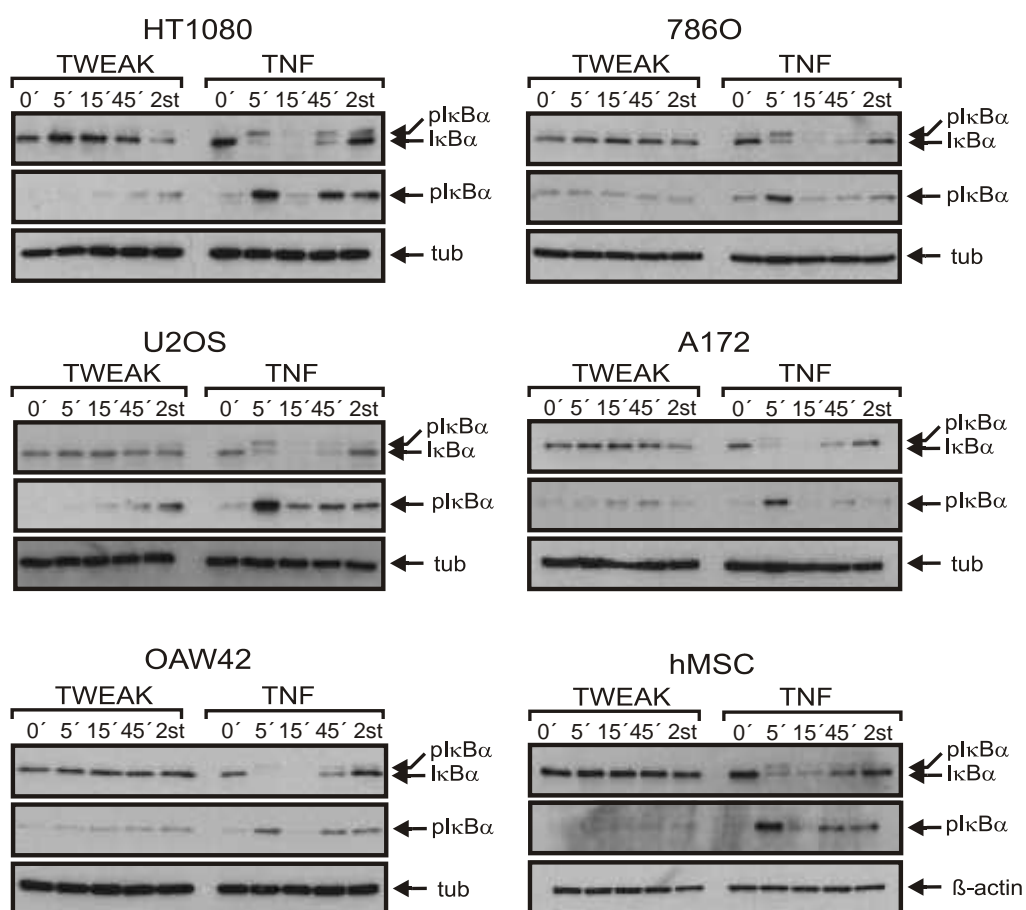


Abbildung 5. Lösliches TWEAK und TNF aktivieren den klassischen NF κ B-Signalweg unterschiedlich gut.

Die angegebenen Zelllinien wurden mit Flag-TNF und Flag-TWEAK (200 ng/ml) für die angegebenen Zeit stimuliert. Alle Gruppen wurden dann zusammen gerettet und Gesamt-Zelllysate bezüglich der Expression von $\text{pI}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mittels Western Blot analysiert.

Der klassische $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg wurde unabhängig vom Zelltyp durch TNF innerhalb von 5-15 min stark aktiviert, d.h. es gab eine starke Zunahme an phosphoryliertem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ sowie eine deutlich $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Degradation (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu war nach Stimulation mit löslichem TWEAK selbst nach zwei Stunden nur eine geringe $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Phosphorylierung feststellbar. Eine $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Degradation war nicht oder im Falle der HT1080- und A172-Zellen kaum nachweisbar (Abbildung 5). Dies läßt den Schluß zu, dass TWEAK den klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg kaum oder gar nicht aktiviert. Die Aktivierung der IL8-Expression ist indikativ für die Aktivierung des klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwegs. Deshalb liefert IL8 einen guten Beweis für die Aktivierung des klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwegs. Entsprechend der Befunde mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wurde das Zytokin IL8 durch TNF wesentlich stärker als durch lösliches TWEAK induziert (Abbildung 6).

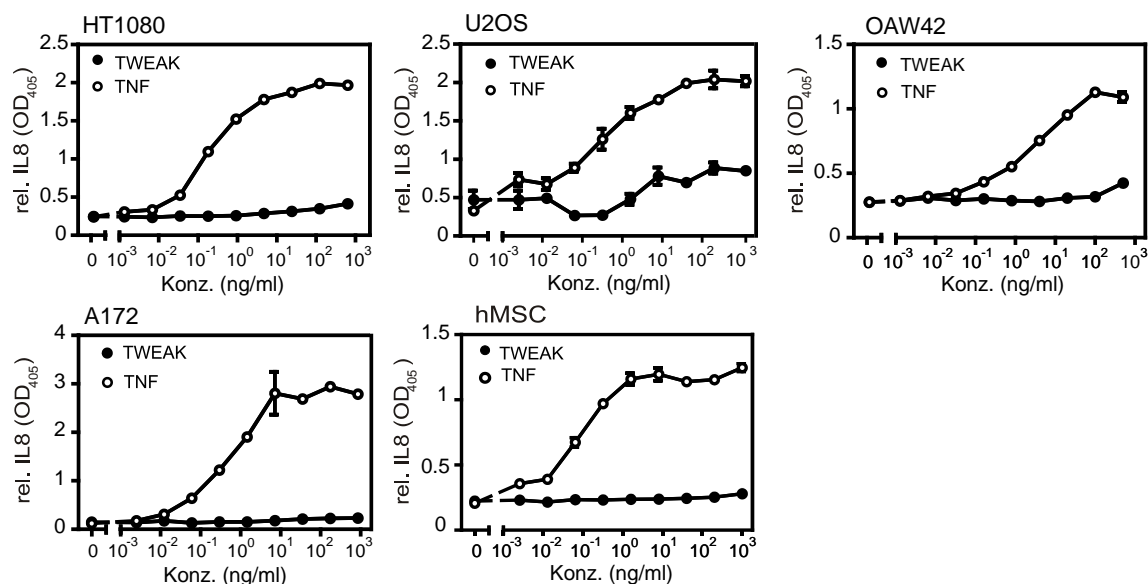


Abbildung 6. IL8-Induktion nach TNF- oder TWEAK-Stimulation

HT1080-, U2OS-, A172-, OAW42- und mesenchimale Stammzellen wurden in Dreifachwerten in 96-Well Platten mit einer Titration jeweils von Flag-TNF oder Flag-TWEAK über Nacht stimuliert. Nach 16 Stunden wurden die Überstände bezüglich der Produktion von IL8 hin analysiert. 786O-Zellen hatten konstitutiv eine hohe IL8-Produktion, deswegen wurde diese Zelllinie nicht untersucht.

Um auszuschließen, dass eine geringe spezifische Aktivität des eingesetzten TWEAK für die fehlende Induktion des klassischen NF κ B-Signalwegs verantwortlich ist, wurde die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs untersucht. Charakteristisch für diesen NF κ B-Signalweg sind die Akkumulation der „NF κ B inducing kinase“ (NIK) und die Prozessierung von p100 (Hoesel and Schmid, 2013). Beide Prozesse wurden konzentrationsabhängig durch TWEAK sehr effizient induziert, während die TNF-Stimulation selbst bei höchsten Konzentrationen ohne Effekt in dieser Hinsicht blieb (Abbildung 7).

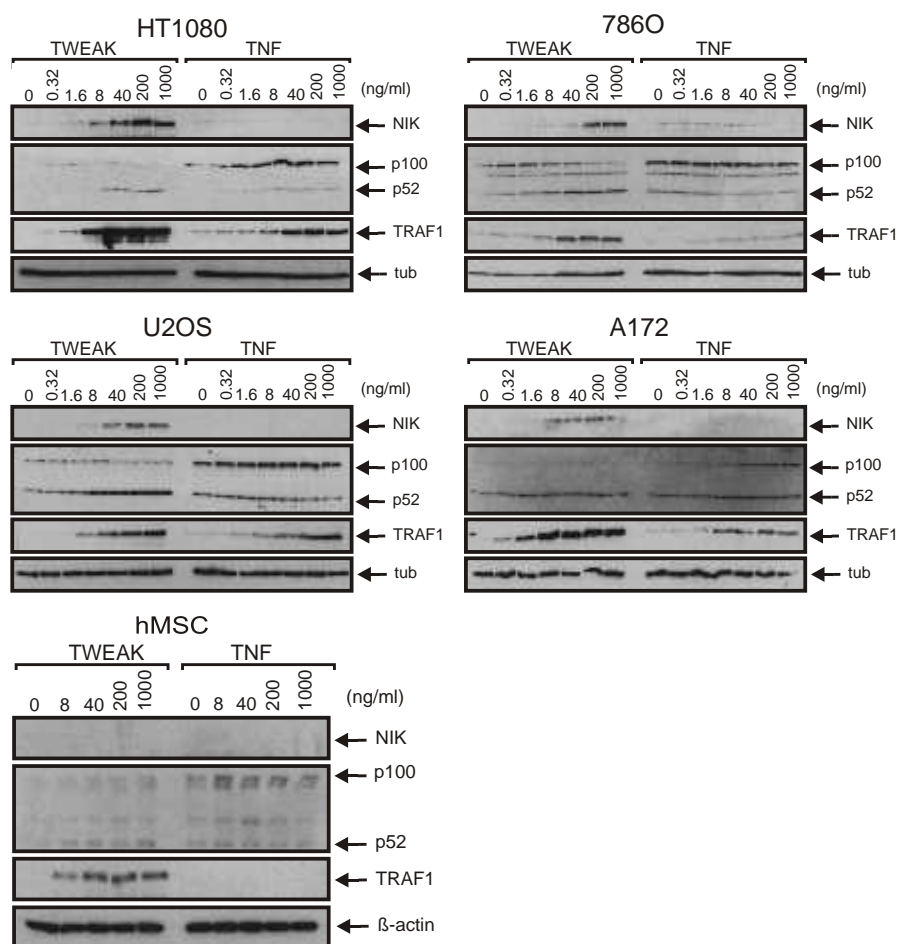


Abbildung 7. Induktion des alternativen NF κ B-Signalwegs durch lösliches TNF und TWEAK

HT1080-, 786O-, U2OS-, A172- und mesenchymale Stammzellen wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) und Flag-TNF (200 ng/ml) über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden alle Gruppen zusammen geerntet. Die TRAF1-Induktion wurde durch Western Blot nachgewiesen.

Unstimulierte Zellen weisen keine oder nur eine geringfügige TRAF1-Expression auf, die durch TNF und den klassischen NF κ B-Signalweg stark aktiviert wird. (Abbildung 7, 8). Erstaunlicherweise wurde TRAF1 durch lösliches TWEAK teilweise sogar besser als durch TNF aktiviert. Die TWEAK-induzierte Erhöhung der TRAF1-Expression erfolgte im Vgl. zu TNF allerdings verzögert (Abbildung 7, 8). NIK und IKK1 sind Schnittpunkte des klassischen und des alternativen NF κ B-Signalwegs. Daher wurde parallel die Aktivierung des klassischen Signalweges in Langzeit-Stimulationsexperimenten mit TWEAK und TNF anhand der I κ B α -Phosphorylierung und -Degradation und zusätzlich die TRAF1-Expression bestimmt.

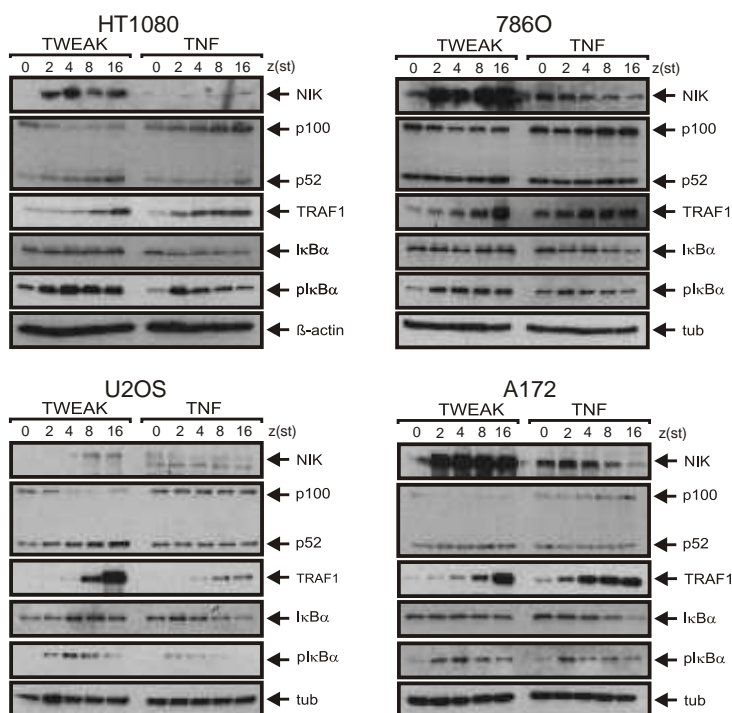


Abbildung 8. Kinetik des NF κ B-Signalwegs

HT1080-, 786O-, U2OS- und A172-Zellen wurden jeweils mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) und Flag-TNF (200 ng/ml) für 2, 4, 8 und 16 Stunden stimuliert. Alle Gruppen wurden zusammen geerntet. Gesamt-Zelllysate wurde mittels Western Blot analysiert.

Tatsächlich fand eine allerdings schwache I κ B α -Phosphorylierung in den TWEAK-stimulierten Zellen statt (Abbildung 8). Ferner zeigte die Untersuchung des gesamten I κ B α -Spiegels nur geringe Änderungen. Da I κ B α auch ein Zielgen des

klassischen NF κ B-Signalwegs ist, kann vermutet werden, dass eine schwache aber andauernde downstream Stimulation des klassischen NF κ B-Signalwegs zu einem Gleichgewicht zwischen der Degradation und der Neusynthese des I κ B α führt. Lösliches TWEAK triggert, im Gegensatz zu TNF, nur eine schwache Produktion des NF κ B-Zielgens IL8 (Abbildung 6). Dies, scheint im Widerspruch zur stärkeren Induktion des NF κ B-Zielgens TRAF1 durch TWEAK zu stehen. Eine mögliche Erklärung wäre eine Entkopplung der Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs von der TRAF1 Expression in TWEAK-stimulierten Zellen. Es gibt Hinweise darauf, dass nach TNF Stimulation die Akkumulation von TRAF1 durch post-transkriptionelle Modifikationen verhindert wird. Tatsächlich wurde in der Literatur eine TRAF1-Prozessierung durch die Caspasen-3 und -8 beschrieben. In Todesrezeptor-positiven Zellen, wird TRAF1 an der Aminosäure D163 prozessiert und als Folge davon ein NF κ B-inhibitorisches Fragment generiert (Irmiler et al., 2000; Leo et al., 2001). Es ist weiterhin bekannt, dass die cIAP2-vermittelte Ubiquitinierung von TRAF1 zu einer Degradation dieses Faktors im Proteasom führt (Lee et al., 2004). Deshalb könnte einer oder mehrere dieser Vorgänge die zytoplasmatische Menge von Wildtyp-TRAF1 Molekülen in TWEAK-stimulierten Zellen vermindern.

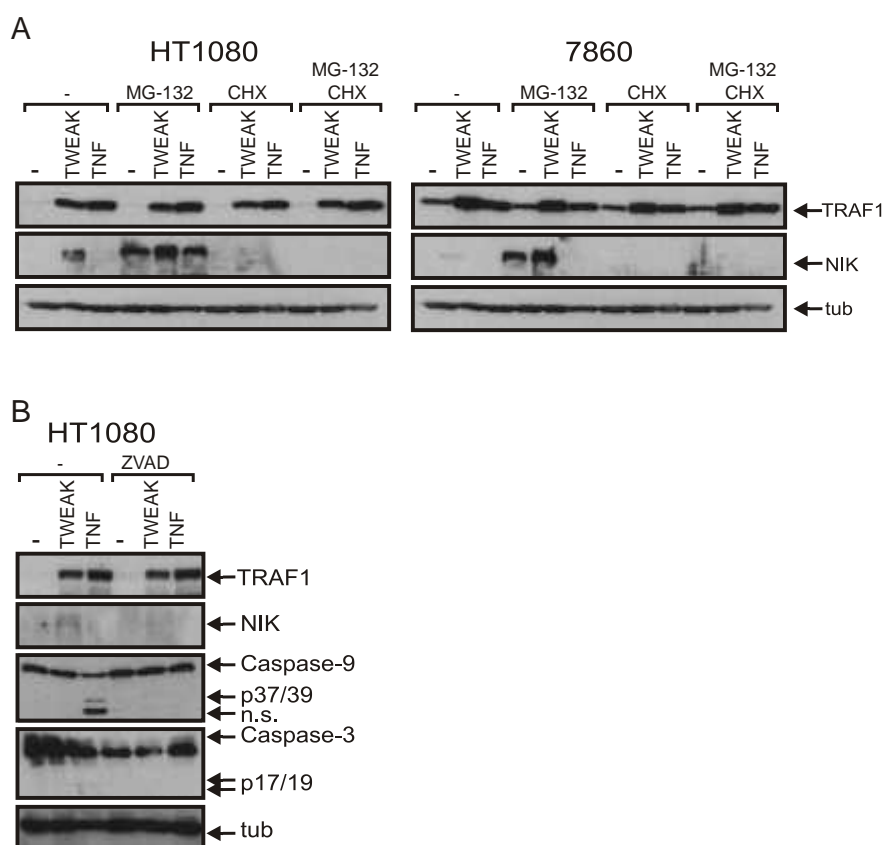


Abbildung 9. Die TWEAK-induzierte TRAF1-Expression ist unabhängig von Posttranskriptionalen Modifikationen

A. Die TRAF1-Expression wurde in HT1080- und 786O-Zellen induziert durch Stimulation mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) oder Flag-TNF (100 ng/ml) über Nacht. Die Zellen wurden zusätzlich 4 Stunden mit Proteasom Inhibitor MG132 (20 mM) und oder Protein Synthese Inhibitor Cycloheximid (25 µg/ml) behandelt.

B. HT1080-Zellen wurden über Nacht mit Flag-TNF und Flag-TWEAK in Abwesenheit oder Anwesenheit von z-VAD-fmk (20 mM) stimuliert. Die Gesamt-Zelllysaten wurden für die TRAF1-Induktion durch Western Blot analysiert.

Um herauszufinden, ob unterschiedliche posttranskriptionale TRAF1-Modifikationen die Ursache für die unterschiedliche TRAF1-Expression nach TWEAK- oder TNF-Stimulation sein könnte, wurde die Stabilität von TRAF1 in entsprechend stimulierten Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach der TRAF1-Induktion mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 und mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximide (CHX) behandelt (Abbildung 9). In Vorarbeiten unseres Labors wurde nachgewiesen, dass TNF einen schwachen apoptotischen Effekt in den HT1080-Zellen hat (Wicovsky et al., 2009). Deshalb wurden die Wirkung des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk in Bezug auf die TRAF1-

Induktion untersucht. Es zeigte sich, dass posttranskriptionale Modifikationen die TWEAK- und TNF-Stimulation der TRAF1-Induktion nicht beeinflussen (Abbildung 9B). Darüberhinaus wurde mittels einer PCR-Analyse festgestellt, dass lösliches TWEAK effizienter TRAF1 induzieren kann als TNF (Abbildung 10). Dieser Fakt ist ein Argument gegen eine ursächlich Beteiligung von posttranskriptionalen Modifikationen bei der unterschiedlichen Induzierbarkeit von TRAF1 durch lösliches TWEAK und TNF.

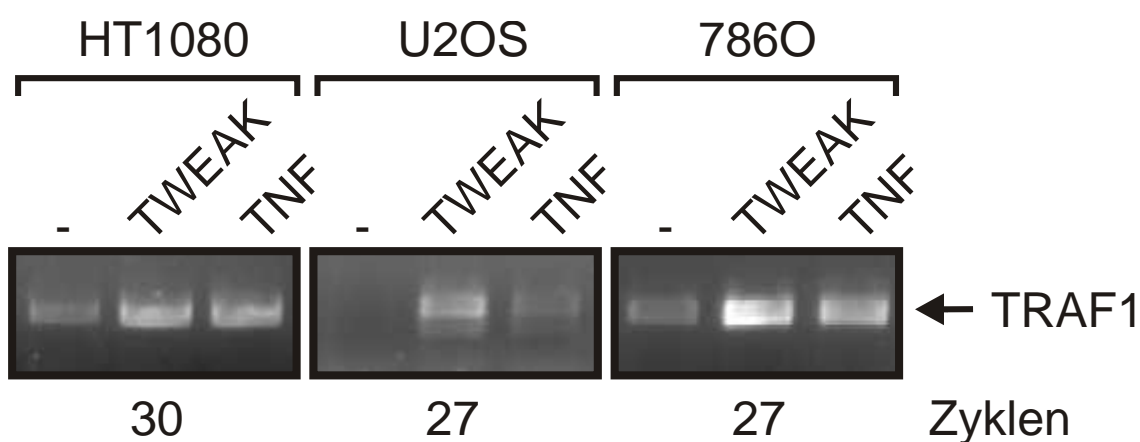


Abbildung 10. Lösliches TWEAK induziert die Transkription des TRAF1-Gens

Für die angegebenen Zelllinien wurde die Gesamt-RNA nach über Nacht Stimulation mit jeweils Flag-TNF (100 ng/ml über Nacht) oder Flag-TWEAK (200 ng/ml) isoliert. Anschließend wurden die Proben durch Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) analysiert.

4.2 Die Induktion von TRAF1 durch lösliches TWEAK kann abhängig oder unabhängig vom klassischen NF κ B-Signalweg erfolgen

Die Beobachtung, dass lösliches TWEAK im Vergleich zu TNF der stärkere Induktor von TRAF1 ist und die Kinetik der TRAF1-Induktion sprechen für eine vom klassischen NF κ B-Signalweg unabhängige Regulation der TRAF1-Expression. Die Oligomerisierung von löslichem TWEAK imitiert die biologische Aktivität von membranständigem TWEAK (Roos et al., 2010). Die Oligomerisierung von löslichem TWEAK hat Zelltyp-unabhängig zwar eine verstärkte, Konzentrations-abhängige Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs (Abbildung 12A), nicht

aber des alternativen NF κ B-Signalwegs sowie der TRAF1-Expression zur Folge (Abbildung 11).

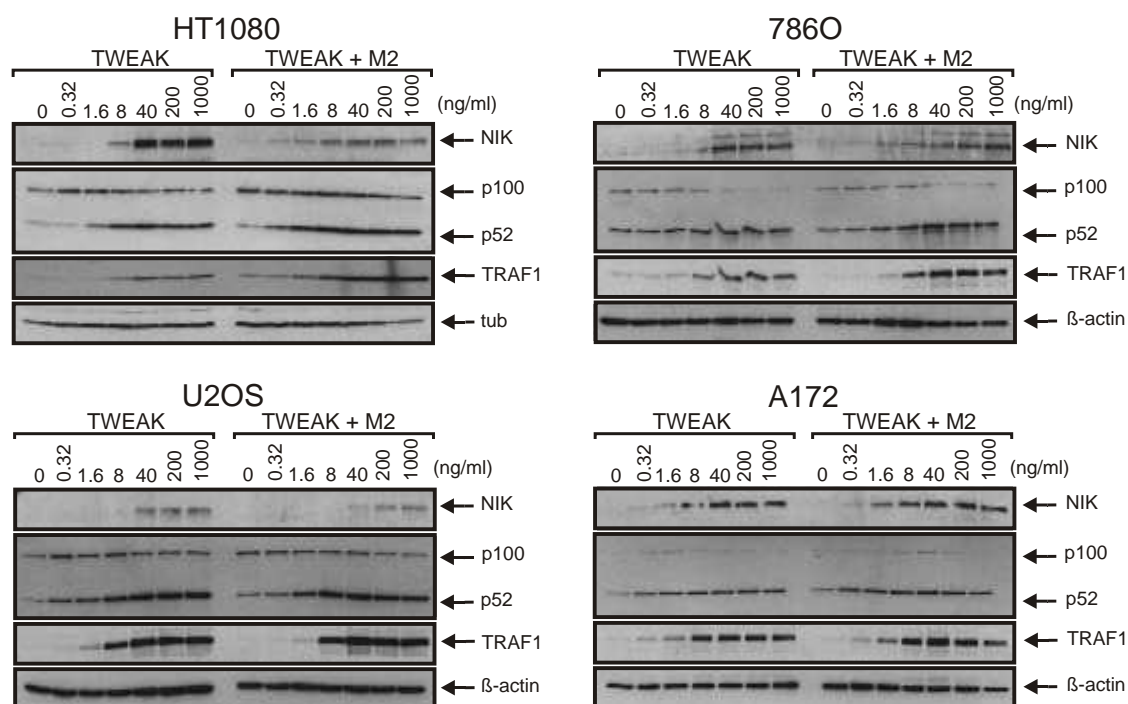


Abbildung 11. Quervernetzung des löslichen TWEAK verbessert die TRAF1-Induktion nicht

Um Flag-TWEAK zu vernetzen, wurde eine Titration des Flag-TWEAK in Anwesenheit oder Abwesenheit von Anti-Flag Antikörper (M2), (1 μ g/ml) eine Stunde vorinkubiert. Daraufhin wurden verschiedene Zelllinien mit einer Titration von normalen Flag-TWEAK oder mit quervernetzten Flag-TWEAK 16 Stunden stimuliert. Als Nächstes wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden verschiedene Proteine des alternativen NF κ B-Signalwegs durch Western Blot nachgewiesen.

Aus diesen Resultaten kann der Schluß gezogen werden, dass Prozesse an der Induktion von TRAF1 beteiligt sind, die unabhängig vom klassischen NF κ B-Signalweg erfolgen. Um diese Hypothese detaillierter zu untersuchen, wurden HT1080-Zellen mit Expressionvektoren transient transfiziert, die zum einen eine nicht-spaltbare, membranständige Mutante von TWEAK und zum anderen für eine nicht-membranständige lösliche Form von TWEAK kodieren (Abbildung 12B). Die Zellen, die die nicht-spaltbare, membranständige Mutante von TWEAK exprimierten, zeigten eine starke Induktion von IL8 und TRAF1. Jedoch zeigten die

Zellen, die lösliches TWEAK exprimierten, nur eine starke TRAF1-Induktion wohingegen die IL8-Induktion gering war (Abbildung 12B).

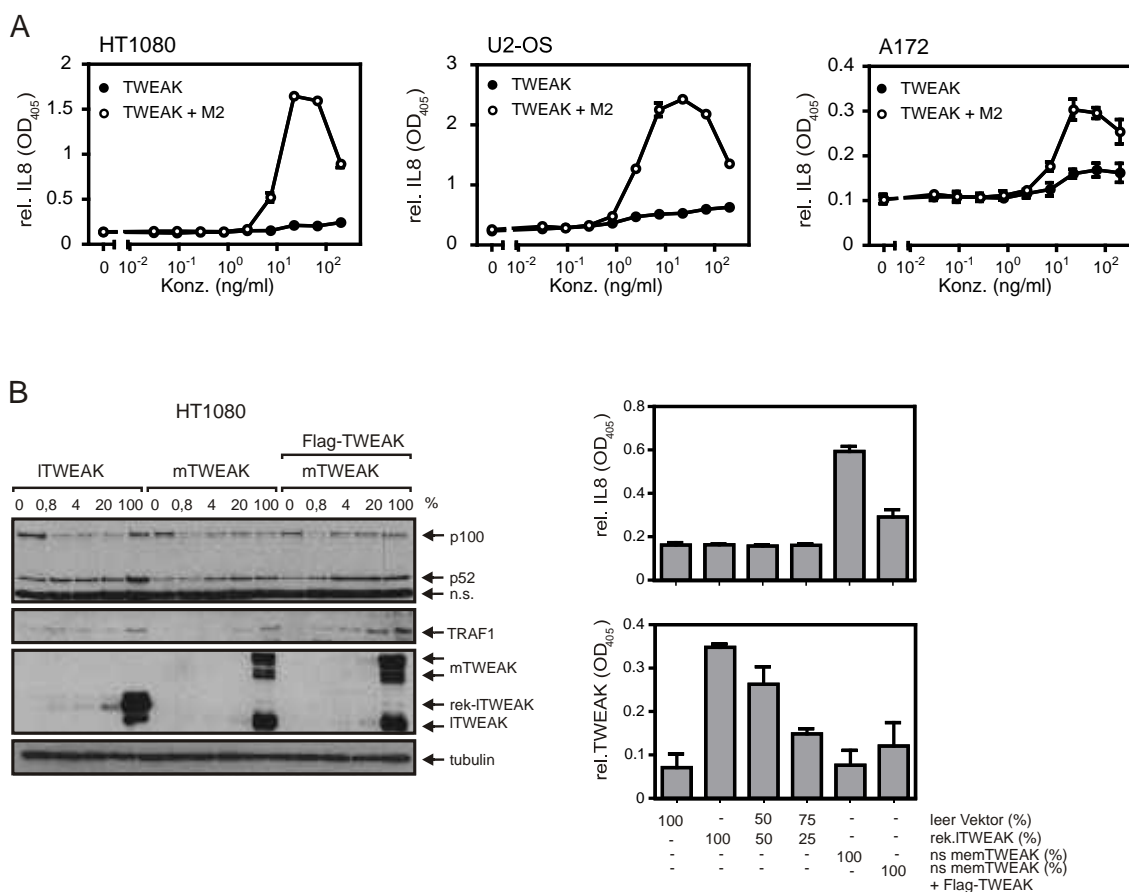


Abbildung 12. Aktivierung des alternativen NF|B-Signalwegs und IL8-Induktion durch Expression von löslichem und Membran-TWEAK

A. Eine zunehmende Titration von Flag-TWEAK (200 ng/ml) wurde in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Anti-Flag Antikörper 1µg/ml (eine Stunde vorinkubiert) zubereitet. Anschließend wurden die Zellen in der entsprechenden Titration 16 Stunden stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Überstände geerntet und analysiert. Die Werte zeigen die relative IL8-Freisetzung ins Medium.

B. HT1080-Zellen wurden transient mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Plasmide kodierten für lösliches Flag-TWEAK (ITWEAK) oder für eine nicht-spaltbare Mutante von membranständigen TWEAK (ns mem TWEAK) und leer Vektor. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und daraufhin auf jeweils 6-Wellplatten und 96-Wellplatten ausplattiert. Schließlich am dem nächsten Tag wurden die gesamte Zelllysaten aus den 6-Wellplatten durch Western Blot für die angegebene Proteine untersucht, und in den Überständen aus den 96-Wellplatten wurde die Anwesenheit von IL8 und TWEAK durch ELISA nachgewiesen.

In Vorarbeiten unseres Labors wurde nachgewiesen, dass der IKK2-spezifische Inhibitor TPCA-1 ausschließlich den TNF-induzierten klassischen NF κ B-Signalweg hemmt, aber auf den TWEAK-induzierten, IKK1-vermittelten alternativen Signalweg keinen Einfluß hat. In HT1080-, 786O-, U2OS-, OAW42- und A172-Zellen wurde die TNF-induzierte TRAF1-Induktion durch die Behandlung mit TPCA-1 vollständig blockiert (Abbildung 13). Das niedrige basale Niveau der TRAF1-Expression wurde durch die TPCA-1-Vorbehandlung sogar noch gesenkt.

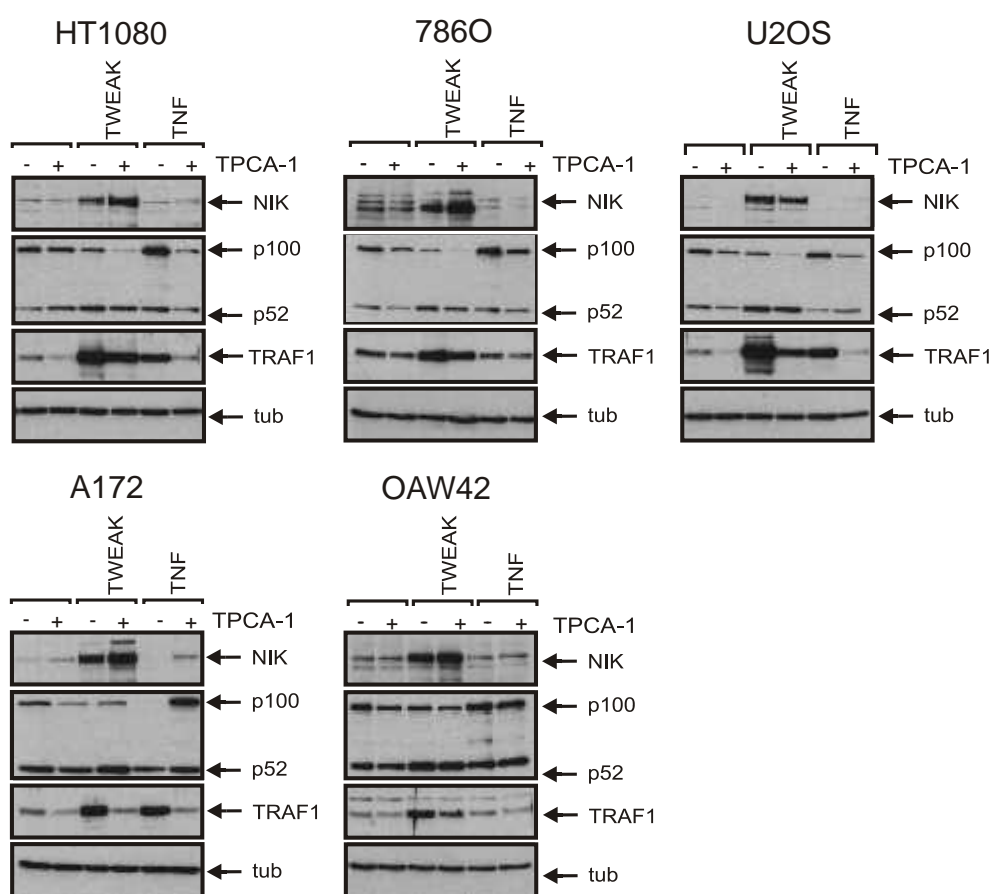


Abbildung 13. Effekt von TPCA-1 auf die TNF- und TWEAK-induzierte TRAF1-Expression
 HT1080-, 786O-, U2OS-, A172- und OAW42-Zellen wurden eine Stunde mit und ohne TPCA-1 (10 μ M) vorinkubiert. Schließlich wurden die Zellen jeweils mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) oder mit Flag-TNF (200 ng/ml) über Nacht stimuliert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und die TRAF1-Expression durch Western Blot untersucht.

Die Effekte von TPCA-1 auf die TWEAK-vermittelte TRAF1-Produktion hingegen erwies sich in den verschiedenen Zelllinien als unterschiedlich. So wurde in HT1080-, 786O-, sowie in OAW42- und U2OS-Zellen die TRAF1-Induktion durch TPCA-1 nur leicht gehemmt. Demgegenüber wurde in A172-Zellen nach TPCA-1 Behandlung die TWEAK-vermittelte TRAF1-Induktion vollständig inhibiert. Das deckt sich mit dem Befund, dass auch in A172-Zellen, die die nicht degradierbare I κ B α -Variante I κ B α -SR ektopisch exprimieren, die TWEAK-induzierte TRAF1-Expression vollständig reprimiert war (Abbildung 14A).

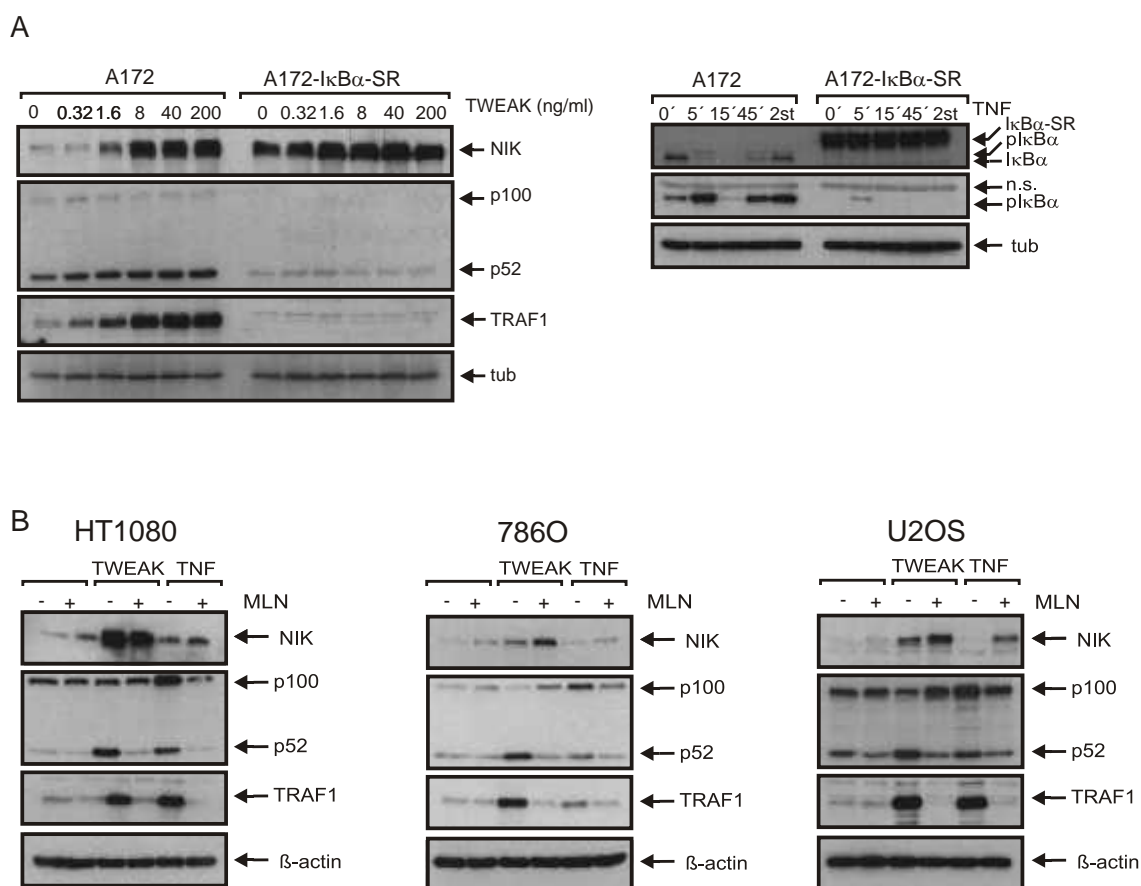


Abbildung 14. TWEAK induziert TRAF1 weitgehend unabhängig vom klassischen NF κ B-Signalweg

A. Kontrollvektor- und I κ B α -SR transfizierten A172-Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von Flag-TWEAK über Nacht stimuliert. Anschließend wurden die Gesamt-Zelllysaten durch Western Blot untersucht. Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs wurde mit der p100/p52- und NIK-Expression nachgewiesen (linke Seite). Die Effizienz der Repression des klassischen NF κ B-Signalwegs durch die I κ B α -SR Expression wurde durch die Analyse der I κ B α -Phosphorylierung und Degradierung in TNF-stimulierte Zellen analysiert. Die Zellen wurden 0, 5, 15, 45 und 120 min mit Flag-TNF (100 ng/ml) stimuliert (rechte Seite).

B. Die angegebenen Zelllinien wurden mit oder ohne MLN4924 (10 mM, 30 min) vorinkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen jeweils entweder mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) oder mit Flag-TNF (100 ng/ml) stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Gesamt-Zelllysaten bezüglich der Expression der angegebenen Proteine mittels Western Blot analysiert.

Diese gemachten Befunde sprechen dafür, dass TWEAK die Expression von TRAF1 weitgehend unabhängig vom klassischen NF κ B-Signalweg induziert. Untersuchungen mit dem NEDD8-aktivierenden Enzym (NAE) Inhibitor MLN4924 zeigten, dass sowohl die I κ B α -Degradation als auch die p100-Prozessierung sowie die TRAF1-Induktion komplett in allen Zelllinien inhibiert wurden (Abbildung 14B). MLN4924 zielt zwar auch auf andere Signalwege und den Zellzyklus. Diese Resultate können dennoch als ein weiterer Hinweis auf eine wichtige Rolle des alternativen NF κ B-Signalwegs in der TWEAK-vermittelten TRAF1-Expression gewertet werden.

4.3 TWEAK priming und ektopische TRAF1-Expression inhibieren die CD40-induzierte Signaltransduktion

4.3.1 TWEAK Vorstimulation inhibiert die CD40-Induzierten Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass lösliche TWEAK-Trimere in Gegensatz zu oligomerisierten, hexameren löslichen TWEAK oder membranständigen TWEAK nur eine geringfügige Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs induzieren können (Abbildung 15).

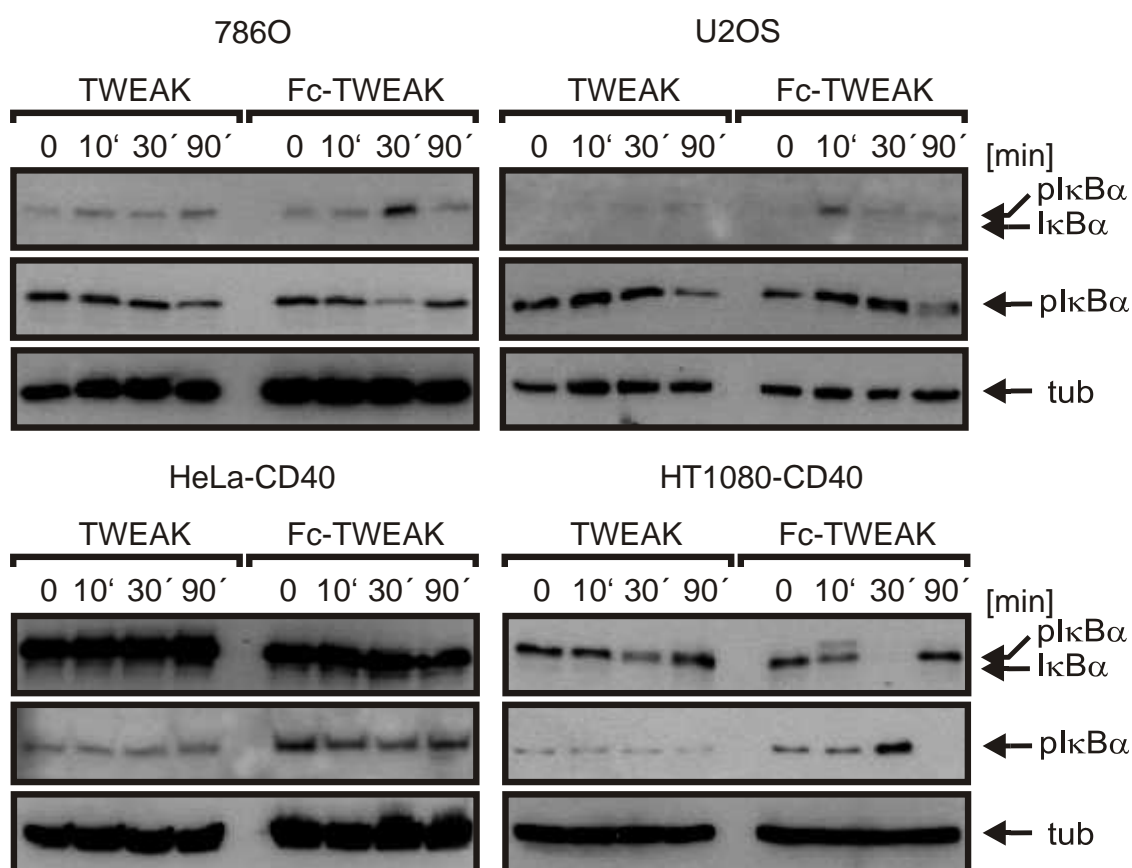


Abbildung 15. Trimeres und hexamerer lösliches TWEAK induzieren klassisches NF κ B unterschiedlich gut

Die gezeigten Zelllinien wurden jeweils mit dem trimeren Flag-TWEAK (200 ng/ml) oder mit hexamerem Fc-TWEAK (200 ng/ml) stimuliert. Alle Gruppen wurden zusammen geerntet. Anschließend wurden Degradation und Phosphorylierung von I κ B α mittels Western Blot nachgewiesen.

Lösliches trimeres TWEAK ist aber in der Lage die Depletion zytosolischer TRAF2-Komplexe zu induzieren (Wicovsky et al., 2009; Vince et al., 2008) was zu der bereits gezeigten starken Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs führt als auch zur Inhibition der TRAF2-clAP1/2-vermittelten Funktionen in TNFR1 Signaling (Wicovsky et al., 2009).

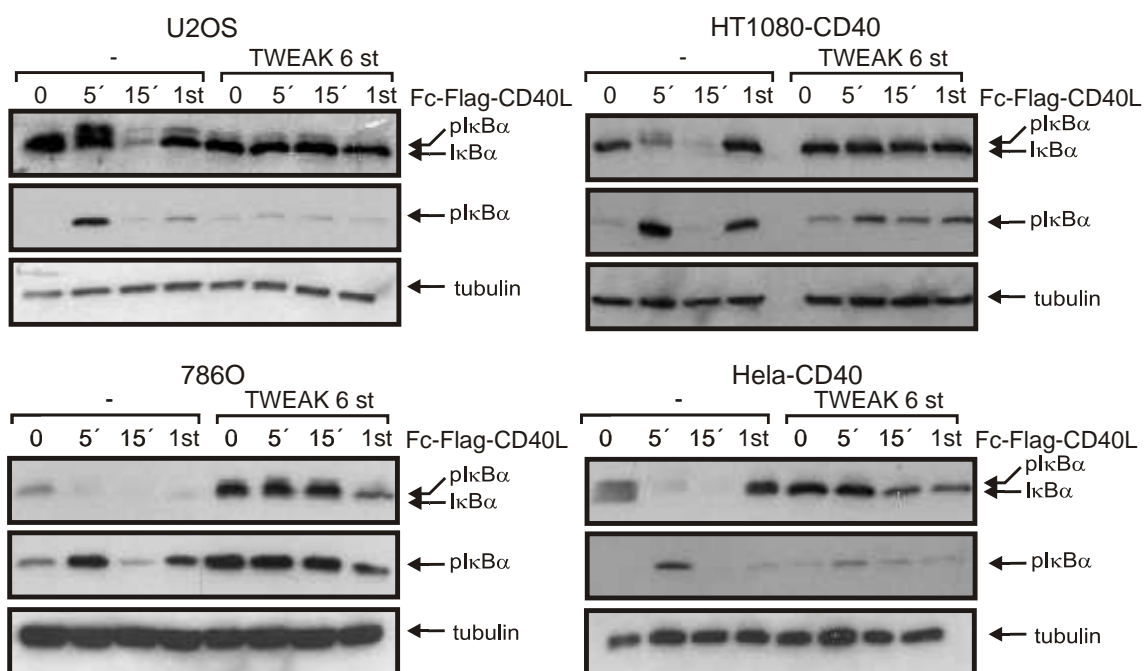


Abbildung 16. TWEAK-Priming inhibiert CD40-Signaling

U2OS-, HT1080-CD40-, HeLa-CD40- und 786O-Zellen wurden 6 Stunden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Fc-Flag-CD40L (200 ng/ml) 0, 5, 15, und 60 min stimuliert. Alle Proben wurden gleichzeitig geerntet. Die IκBα-Degradation wurde durch Western Blot nachgewiesen. tubulin diente als Ladekontrolle.

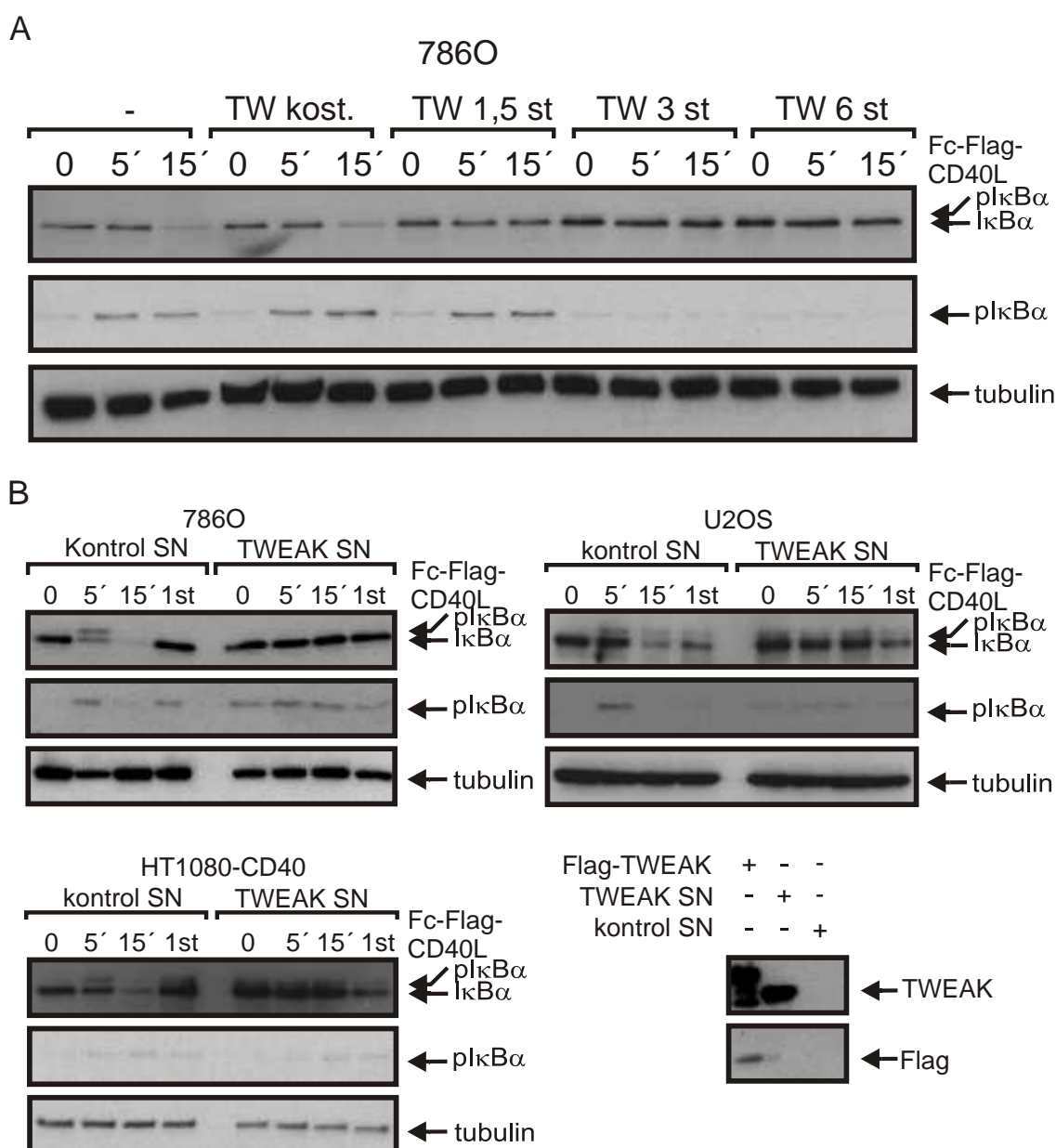


Abbildung 17. Natürliche prozessiertes lösliche TWEAK inhibiert CD40L-vermittelte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs

A. 786O-Zellen wurden mit Flag-TWEAK (200 ng/ml) für 6, 3 und 1'5 Stunden vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit Fc-Flag-CD40L für 5, 15, 60 min stimuliert. I κ B α - und pI κ B α wurden durch Blotting nachgewiesen.

B. Lösliches TWEAK wurde wie im Abschnitt 3.3 produziert. HT1080-CD40-, U2OS- und 786O-Zellen wurden mit Kontroll-Überstand (kontrol SN) oder TWEAK-überstand (TWEAK SN) 16 Stunden inkubiert. Folgenderweise wurden die Zellen mit Fc-Flag-CD40L stimuliert. Die Aktivität des klassischen NF κ B-Signalwegs wurde mit der I κ B α -Degradation nachgewiesen.

Um herauszufinden, ob die CD40-Signalwege in ähnlicher Weise durch TWEAK Vorstimulation beeinflusst werden wie die TNFR1-Signaltransduktion, wurden Versuche mit stabil transfizierten HeLa- und HT1080-CD40-Zellen, die CD40 ektopisch exprimieren und mit 786O- und U2OS-Zellen, die CD40 endogen exprimieren, durchgeführt. Nach der Stimulation mit der hexameren CD40L fand eine starke und schnelle Phosphorylierung und Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in allen vier Zelllinien statt. Allerdings führte ein Priming der Zellen mit Flag-TWEAK dazu, dass dieser CD40-vermittelte Signalweg effizient gehemmt wurde (Abbildung 16). Dieser TWEAK-vermittelte inhibitorische Effekt begann bereits nach 1,5-3 Stunden priming-Zeit klar ersichtlich zu werden (Abbildung 17A). Dies ist dadurch erklärbar, dass TWEAK-Priming eine Depletion der Fn14-assoziierten TRAF2-cIAP1/2 Komplexen hervorruft. Da eine solche Hemmung auch durch Überstände von Zellen, die lösliches TWEAK als Prozessierungsprodukte aus membranständigem TWEAK enthielten, sollte der beobachtete inhibitorische Effekt von TWEAK auf das CD40 Signaling durchaus auch physiologisch relevant sein (Abbildung 17B).

4.3.2 TWEAK inhibiert die CD40-vermittelte Aktivierung der MAPKs

CD40 aktiviert neben dem klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg auch die verschiedenen MAP-Kinase-Signalwege (Suttles and Stout, 2009; Chatzigeorgiou et al., 2009). Daher wurde auch die Wirkung des TWEAK-Primings auf diesen Zweig des CD40 Signalings untersucht. In allen untersuchten Zelltypen (HT1080-CD40-, HeLa-CD40-, 786O- und U2OS-Zellen) zeigte sich eine starke Aktivierung von p38 und JNK und in einem geringen Ausmaß auch von ERK nach CD40 Stimulation (Abbildung 18). Die CD40-abhängige Aktivierung aller drei MAP-Kinasen wurde durch TWEAK Priming stark gehemmt, woraus man den Schluß ziehen kann, dass neben $\text{NF}\kappa\text{B}$ auch andere durch CD40 induzierte Signalwege durch die TWEAK-induzierte TRAF2-cIAP1/2-Depletion inhibiert werden (Abbildung 18).

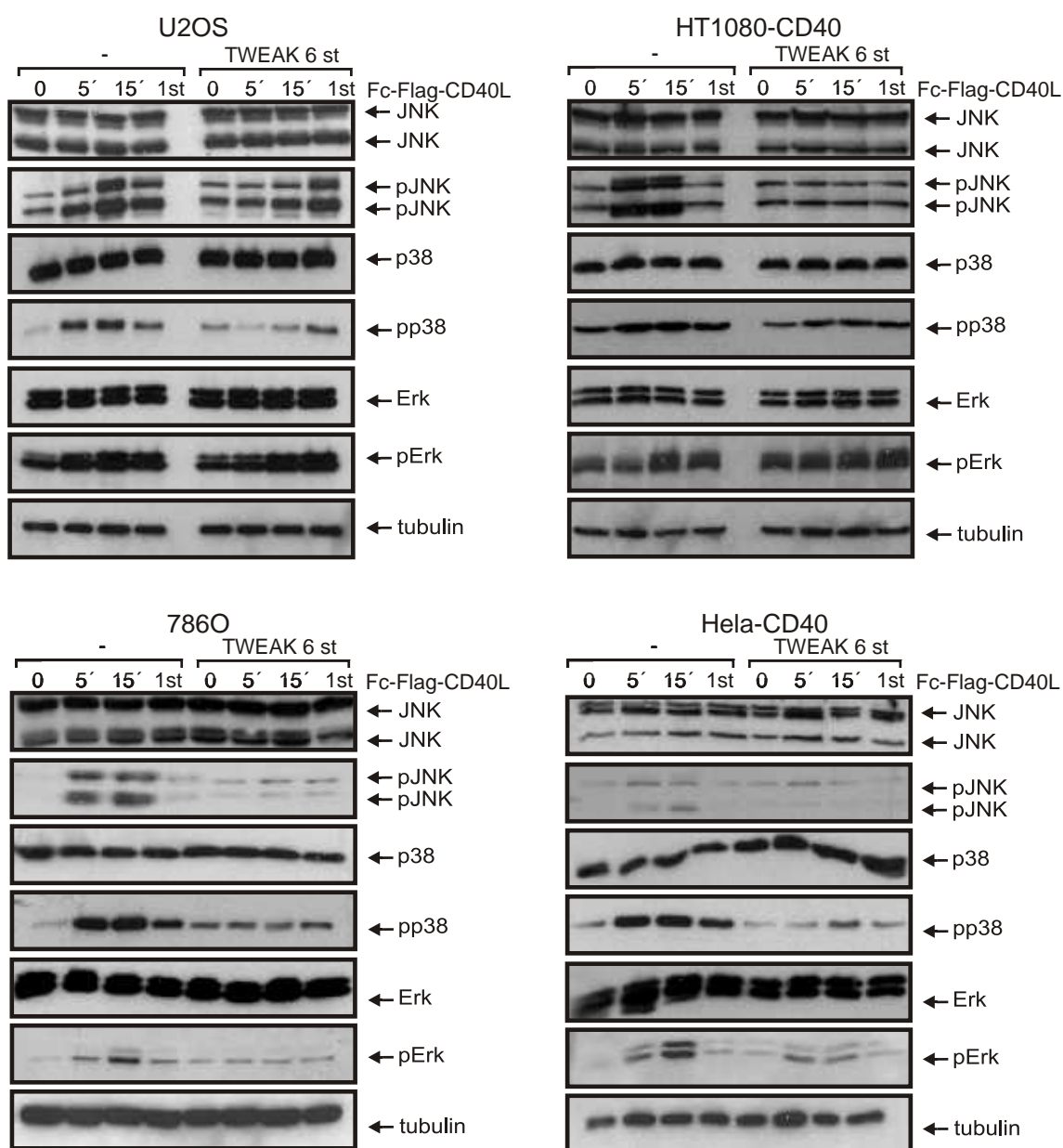


Abbildung 18. TWEAK-Priming inhibiert die CD40L-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen

Unbehandelte Zellen und mit Flag-TWEAK (200 ng/ml für 6 Stunden) vorstimulierte Zellen wurden mit Fc-Flag-CD40L (200 ng/ml) 0, 5, 15, und 60 min stimuliert. Die Aktivierung von JNK, p38, und ERK1/2 wurde mittels spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierten Formen der verschiedenen Kinasen nachgewiesen. JNK, p38, und ERK1/2 wurden auch detektiert, um mögliche Änderungen in der Proteinmenge festzustellen. tubulin diente als Ladekontrolle.

4.3.3 Die ectopische Expression von TRAF1 hat keinen Einfluß auf die Interaktion von CD40 mit seinem Liganden

Wie oben gezeigt wurde wird das CD40-Signaling nach TWEAK-Vorstimulation stark inhibiert (Abbildung 16, 17). Das Priming mit TWEAK führt zu einer Depletion der TRAF2–cIAP1/2-Komplexe, die für die CD40-Signaltransduktion wichtig sind. Die Heterotrimerbildung von TRAF1 mit TRAF2 ist nun bevorzugt verglichen mit der Bildung von TRAF2 Homotrimeren, wobei diese Heterotrimere auch stärker mit cIAP2, aber schwächer mit CD40 interagieren. (Zheng et al., 2010; Fotin-Mleczek et al., 2004).

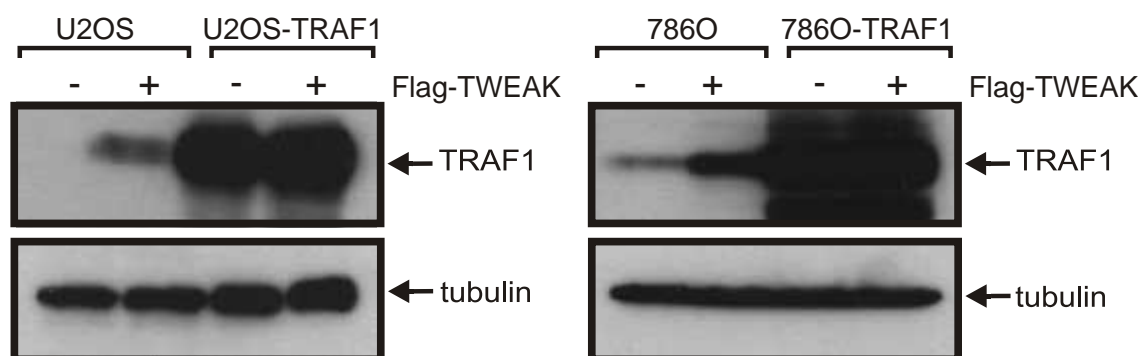


Abbildung 19. Herstellung von TRAF1 Stabil transfektant Zellen

Stabile 786O-TRAF1- und U2OS-TRAF1-Transfektanten wurden wie in Abschnitt 3.4 beschrieben hergestellt. Kontrollzellen und Transfektanten wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von Flag-TWEAK (200 ng/ml) 16 inkubiert. Die TRAF1-Expression wurde bei Western Blot analysiert. Tubulin diente als Kontrolle für die Proteinmenge.

Um zu untersuchen, welche Bedeutung die TWEAK-induzierte TRAF1-Expression für die CD40-Signaltransduktion hat, wurden 786O- und U2OS-Zellen stabil mit TRAF1 transfiziert (Abbildung 19). Eine TRAF1-Mutante wurde genutzt, die einerseits resistent gegenüber der Caspase-vermittelten Spaltung ist, deren Interaktionsfähigkeit mit anderen Proteinen aber unverändert ist.

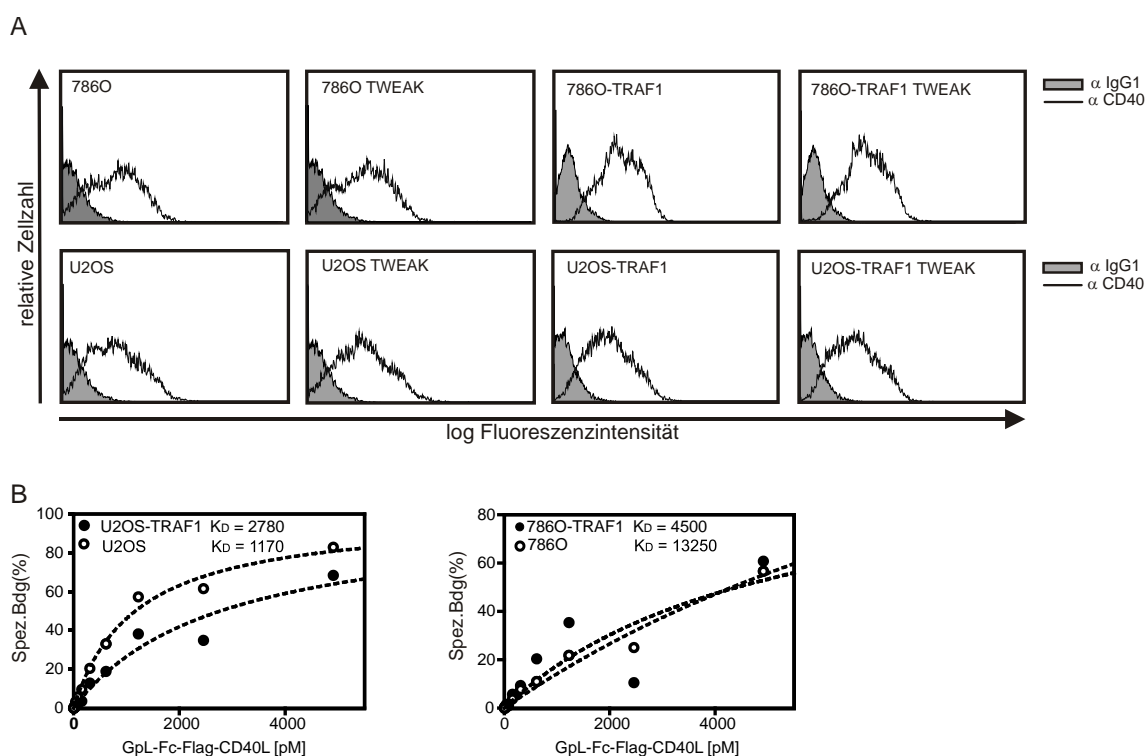


Abbildung 20. TWEAK Priming inhibiert nicht die CD40-CD40L-Interaktion

A. 786O- und U2OS-Zellen und dessen entsprechenden TRAF1-Transfektanten wurden mit löslichen TWEAK über die Nacht vorbehandelt oder blieben unbehandelt. Schließlich wurden die Zellen im FACS auf die Oberflächenexpression von CD40 untersucht.

B. 2×10^5 786O- und U2OS-Zellen und die TRAF1-Transfektanten wurden in 24-Wellplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Proben von jedem Zelltyp mit 2 mg/ml von Fc-Flag-CD40L 1 Stunde bei 37°C vorinkubiert. Daraufhin wurden die nicht vorbehandelten Zellen und Fc-Flag-CD40L-vorbehandelte Zellen paarweise mit einer zunehmenden Konzentration von GpL-Fc-Flag-CD40L 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dies ist ein Fusionsprotein von Fc-Flag-CD40L mit einem luciferase Domain von *Gaussia princeps* gekoppelt. Nach der Entfernung der ungebundenen CD40L Moleküle, wurden die Zellen in 50 ml RPMI (+ 0,5% FCS) abgekratzt. Schließlich wurde die zellassoziierte Luziferasenaktivität in einem ELISA Reader gemessen. Die spezifische Bindung wurde durch die Subtraktion der gesamten Bindung (Proben mit GpL-Fc-Flag-CD40L inkubiert) von der nichtspezifischen Bindung (Proben mit Fc-Flag-CD40L vorinkubiert) berechnet. Die Werte der spezifischen Bindung wurden mittels nicht-linearer Regression durch GraphPadPrism5 Software kalkuliert. Die Werte der spezifischen Bindung wurden nach dem maximalen kalkulierten Bindungswert normiert.

Sowohl die Expression von CD40 auf der Zelloberfläche als auch die Affinität von CD40L für seinen Rezeptor wurden durch TWEAK-Priming nicht (negativ) beeinflusst (Abbildung 20). Vergleichbare Resultate wurden auch mit Transfektanten, die TRAF1 stabil exprimierten, erzielt (Abbildung 20). Demnach können Veränderungen der CD40-Expression bzw. eine reduzierte

Ligandenaffinität nicht die inhibitorischen Effekte der TWEAK Vorbehandlung bzw. der ektopische TRAF1-Expression auf das CD40-Signaling erklären.

4.3.4 TRAF1 Überexpression verhindert CD40L-assoziierte Induktion von NF|B

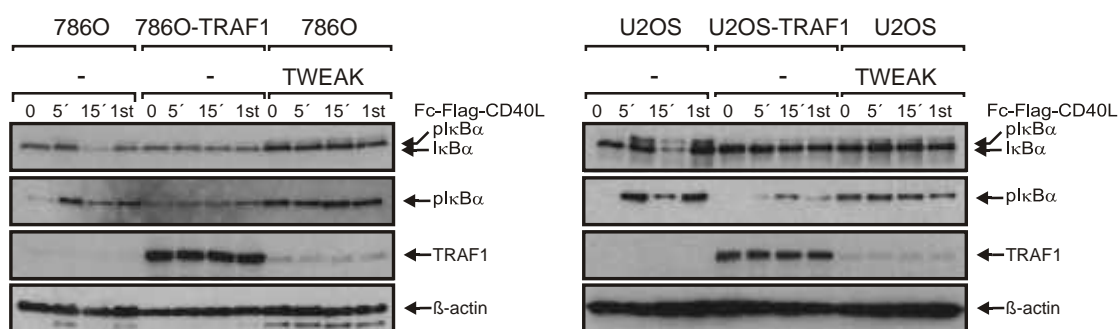


Abbildung 21. TRAF1 Überexpression verhindert die Aktivierung des klassischen NF|B-Signalwegs

U2OS- und 786O-Zellen mit und ohne TWEAK-Priming und TRAF1-Stabiltransfektanten U2OS und 786O wurden mit Fc-Flag-CD40L für 5, 15 und 60 min stimuliert. Anschließend wurden die Proben durch Western Blot analysiert um die angegebene Molekülen zu untersuchen. In dem Fall der TRAF1 Western Blots ist eine kurze Belichtung gezeigt, um TRAF1-Überexpression und TWEAK-induzierte TRAF1 besser zu sehen.

Eine Inhibition des klassischen NF κ B-Signalwegs nach TWEAK-Priming oder durch ektopische Expression von TRAF1 konnte durch Immunoblot Analysen der CD40-induzierten Phosphorylierung und nachfolgendem Abbau von I κ B α nachgewiesen werden. 786O- und U2OS-Zellen wurden über die Nacht mit löslichem TWEAK behandelt. Die vorstimulierten Gruppen hatten eine erhöhte Menge von phosphoryliertem I κ B α im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abbildung 21). Wichtiger allerdings ist der Fakt, dass die schnelle (5 -15 min) CD40L-induzierte Phosphorylierung und Degradation von I κ B α , die in unstimulierten 786O- und U2OS-Zellen detektiert werden kann, sowohl nach TWEAK-Priming als auch durch ektopische Expression von TRAF1 verhindert wird (Abbildung 21).

4.3.5 Verminderte IL6 und IL8 Synthese in TRAF1-Stabiltransfektanten

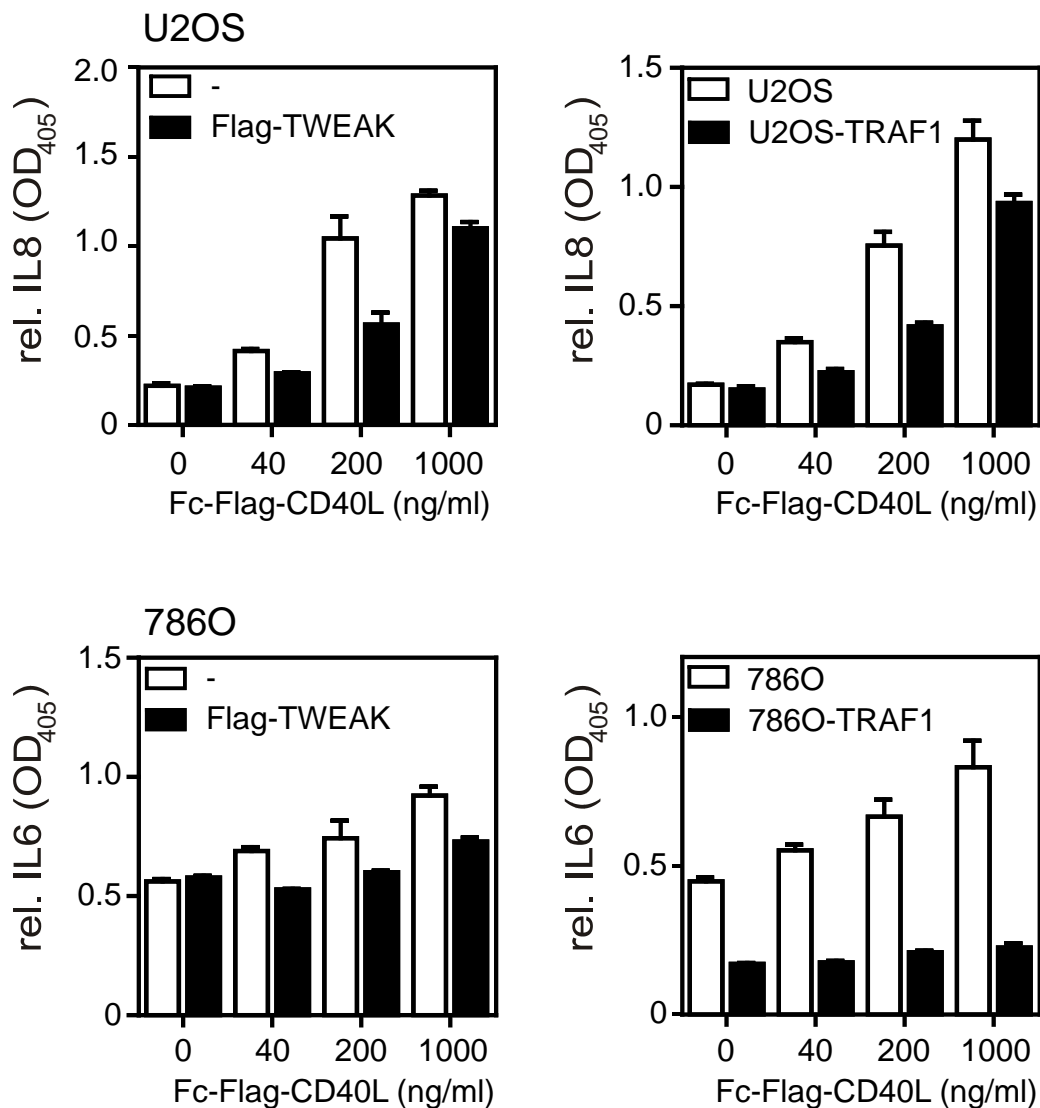


Abbildung 22. TRAF1-Überexpression inhibiert die CD40L-induzierte IL6- und IL8-Produktion

U2OS- und 786O-Zellen mit und ohne Vorbehandlung mit Flag-TWEAK (200 ng/ml, 6h) und die U2OS-TRAF1, 786O-TRAF1 Transfektanten wurden in Dreifachwerten in 96-well Platten mit Fc-Flag-CD40L (40 ng/ml, 200 ng/ml oder 1000 ng/ml) stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Überstände für die IL8- und IL6-Produktion durch die Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) analysiert.

Im Einklang mit den vorherigen Resultaten, schwächte das TWEAK-Priming sowohl die CD40L-vermittelte Induktion der Freisetzung von IL8 in U2OS-Zellen als auch

die CD40L-induzierte Expression des Zytokins IL6 in 786O-Zellen (Abbildung 22). Ein inhibitorischer Effekt auf die CD40L-induzierte Zytokinproduktion zeigte sich auch in den stabil mit TRAF1 transfizierten Zellen, die sogar bei sehr hohen CD40L-Konzentrationen eine drastisch reduzierte Synthese beider Zytokine zeigten (Abbildung 22).

5 Diskussion

5.1 Sowohl der klassische, als auch der alternative NF κ B-Signalwege spielen eine Rolle bei der TWEAK-induzierte TRAF1-Expression

Die Mitglieder der NF κ B-Familie (RelA/p65, RelB, cRel, p50, und p52) bilden homodimere und heterodimere Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung und Translokation in den Zellkern durch den klassischen (kanonischen) und alternativen (nicht-kanonischen) NF κ B-Signalweg reguliert wird (Razani et al., 2011; Hoesel and Schmid, 2013). In unstimulierten Zellen sind die NF κ B-Dimere exklusiv im Zytoplasma lokalisiert, auf Grund der Maskierung deren Kernlokalisationssequenz. Dies beruht auf zwei Mechanismen: erstens auf der Interaktion mit zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen der I κ B-Familie und zweitens auf der Aktivität von inhibitorischen Domänen in NF κ B-Vorläuferproteinen. Die p50 und p52 Vorläuferproteine p100 und p105 besitzen derartige Domänen. Viele Stimuli können die Aktivierung des klassischen NF κ B auslösen; darunter bakterielle und virale Antigene und verschiedene Zytokine (Hayden and Ghosh, 2012; Pahl, 1999). Proinflammatorische Zytokine aktivieren den klassischen NF κ B-Signalweg durch die Rezeptor-assoziierten E3-Ligasen TRAF2, cIAP1, cIAP2, und TRAF6. Dies führt zur Aktivierung von MAP3-Kinasen, wie z.B. TAK1 und MEKK1, und vom I κ B-Kinase (IKK)-Komplex (Hayden and Ghosh, 2014; Xie, 2013). Letzterer besteht aus den Kinasen IKK1 und IKK2 und dem regulatorischen Gerüstprotein IKK γ /NEMO (Tokunaga et al., 2009). Das IKK-Komplex vermittelt die Phosphorylierung und K48-Ubiquitinierung von I κ B-Proteinen. Infolgedessen werden die inhibitorischen I κ B-Proteine durch das Proteasom degradiert (Scheidereit, 2006). Dies führt zur Freisetzung und Kerntranslokation der NF κ B-Dimeren. Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs erfolgt typischer Weise sehr schnell, so dass die I κ B-Degradation und Kerntranslokation innerhalb weniger Minuten bzw. in unter einer Stunde nachweisbar sind (Wicovsky et al., 2009; Tanaka and Iino, 2015). Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs erfolgt durch bestimmte Liganden der TNF-Familie. Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs beruht auf der Akkumulation der MAP3-Kinase NIK. In unstimulierten Zellen wird NIK basal durch die E3-Ligasen cIAP1, cIAP2, und TRAF2 und TRAF3 für den proteasomalen

Abbau markiert (Liao et al., 2004; Sun, 2011). Wenn TNF-Rezeptoren, die den alternativen NF κ B-Signalweg aktivieren können, stimuliert werden, erfolgt eine Depletion dieser NIK-inhibitorischen E3-Ligasen was zu einer NIK-Akkumulation im Zytoplasma führt. Letztendlich wird dann IKK1 durch NIK phosphoryliert und damit aktiviert. Die aktivierte IKK1 triggert phosphoryliert dann p100 und stimuliert so dessen Prozessierung zu p52 und damit die Aktivierung von p52-haltigen NF κ B-Faktoren (Xiao et al., 2004). Der klassische NF κ B-Signalweg kann die Expression von TRAF1 induzieren. Dies erfolgt durch vielfältige Stimuli wie: CD40, IL1, TNF, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), LPS, und agonistische Antikörper für „B-cell receptor“ (BCR), und „T-cell receptor“ (TCR) (Schwenzer et al., 1999; Dunn et al., 1999; Carpentier and Beyaert., 1999). Ferner ist bekannt, dass lösliches TWEAK den klassischen NF κ B-Signalweg sehr viel schwächer als TNF stimuliert und entsprechende Zielgene wie z.B. IL8 und IL6 kaum induziert (Fick et al., 2012; Roos et al., 2010; Abbildung 5, 6). Die Resultate der vorliegenden Arbeit, die zeigen das TWEAK TRAF1, das durch Aktivatoren des klassischen NF κ B-Signalweg bekanntermaßen gut induziert wird, mindestens so gut oder sogar deutlich stärker induziert als TNF, waren daher sehr überraschend (Abbildung 7, 8). Die unerwartet starke Aktivierung der TRAF1-Expression durch TWEAK ist spezifisch, da lösliches TWEAK kaum andere durch den klassischen NF κ B-regulierte Gene induziert, wie z.B. das Gen für das Zytokin IL8 (Abbildung 6). Dies weist darauf hin, dass klassische NF κ B-unabhängige Mechanismen zur TWEAK-induzierten TRAF1-Expression stark beitragen. Bis jetzt war bekannt, dass die Stimulation mit TWEAK zur Depletion von TRAF2-cIAP2-Komplexen führt. Dies führt auch zur Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs und zur Verstärkung der TNFR1-induzierten Apoptose. Nach den vorliegenden Befunden könnte TWEAK daher die TRAF1-Induktion über den alternativen Signalweg vermitteln. Nach Quervernetzung, besitzt lösliches TWEAK vergleichbare biologische Aktivität wie membranständiges TWEAK und aktiviert dann den klassischen NF κ B-Signalweg was zur Induktion der IL-8 Synthese führt nicht aber zu einer weiteren Steigerung der TRAF1-Akkumulation wie sie durch nicht-aggregiertes lösliches TWEAK getriggert wird (Abbildung 11, 12A). Ein zweiter Punkt, der auf eine Beteiligung des alternativen Signalwegs hinweist, ist die langsamere Kinetik der TRAF1-Induktion durch TWEAK im Vergleich zu TNF (Abbildung 8). Diese

Ergebnisse werden durch die p100 Mutation p80HT bestätigt (Zhang et al., 2007). Ferner hemmt der selektive IKK2-Inhibitor TPCA-1 zwar die TNF-induzierte TRAF1 Expression komplett, die TWEAK-vermittelte TRAF1 Induktion aber nur teilweise (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu hemmt MLN4924, das beide NF κ B-Signalwege inhibiert, die TRAF1 Akkumulation vollständig (Abbildung 14B). In A172-Zellen wurde die TWEAK-induzierte TRAF1-Expression durch TPCA-1-Behandlung und Degradations-resistentes I κ B α -vollständig inhibiert (Abbildung 14A). Zusammengefasst, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass beide NF κ B-Signalwegen Zelltyp-abhängig an der TRAF1-Induktion durch TWEAK beteiligt sein können. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die neue Interaktionen zwischen dem alternativen und klassischen NF κ B-Signalweg, die in den letzten Jahren entdeckt wurden (Shih et al., 2011). So wurde eine NIK-induzierte c-Rel-Phosphorylierung und Aktivierung beschrieben (Sánchez-Valdepeñas et al., 2006). Das Vorläuferprotein p100 kann mit seiner C-terminalen Ankyrindomäne wie I κ B α wirken und klassische NF κ B-Dimere binden und inhibieren, so dass NIK und IKK1, d.h. der alternative NF κ B-Signalweg, aktivierend wirken können (Basak et al., 2007).

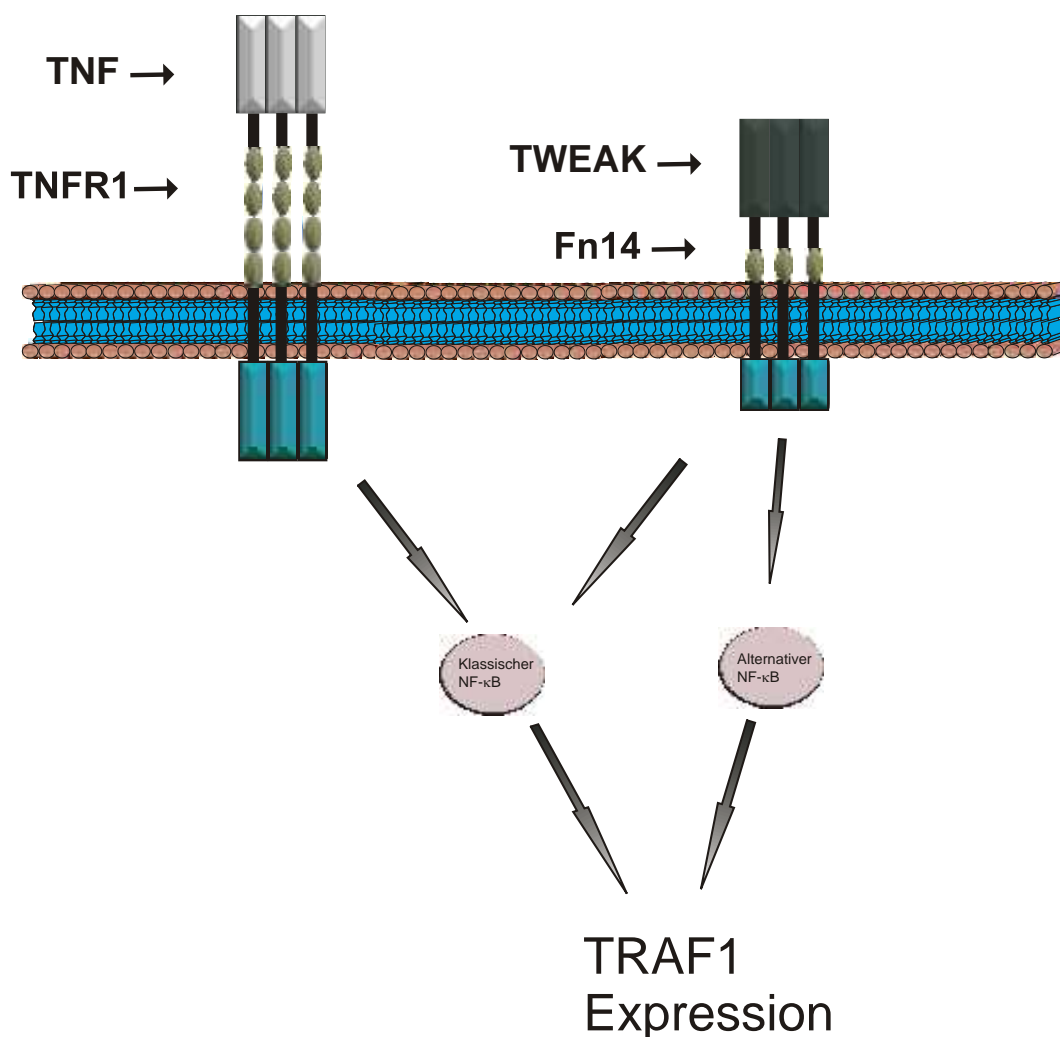


Abbildung 23. Schematisches vereinfachte Modell der TWEAK-vermittelte TRAF1-Induktion

Die TWEAK-vermittelte Induktion von TRAF1 erfolgt durch den klassischen und alternativen NF κ B-Signalwege. Im Gegenteil hierzu induziert TNF die TRAF1-Expression nur durch den klassischen NF κ B-Signalweg.

5.2 TWEAK-Stimulation und ektopische TRAF1-Expression inhibieren CD40-assozierte Signalwege

Die Vorbehandlung mit TWEAK für wenige Stunden kann die Induzierbarkeit proinflammatorischen Signalwegen reduzieren. In vielen Zelltypen werden die CD40, TNFR2 und TNFR1-assozierte entzündlichen Signalwege nach TWEAK Stimulation stark inhibiert (Salzmann et al., 2013; Wicovsky et al., 2009). Die Grundlagen dieses Effekts wurden noch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass eine

Depletion der zytosolischen TRAF2-clAP1/2-Komplexe nach TWEAK-Stimulation erfolgt (Vince et al., 2008; Wicovsky et al., 2009). Dies führt zu einer geringeren Rekrutierung dieser Komplexe für andere Rezeptoren. So rekrutiert der TNFR1 clAPs und TRAF2 während der Aktivierung des Rezeptors (Wajant and Scheurich, 2011). Dies ist die Voraussetzung für die K63-Ubiquitinierung von RIP und die folgende Rekrutierung des IKK-Komplexes (Wajant and Scheurich, 2011). Entsprechend ist in TWEAK-stimulierten Zellen die Rekrutierung von TRAF2, clAPs und IKK-Komplexes an den TNFR1, sowie die Ubiquitinierung von RIP streng beeinträchtigt. Dies führt zu einer Hemmung der TNFR1-induzierten Aktivierung von NF κ B (Wicovsky et al., 2009). CD40 verwendet gleichfalls TRAF2 und clAPs für die Aktivierung entzündlicher Signalwege (Fotin-Mleczeck et al., 2004; Hostager and Bishop, 2013; Gardam et al., 2011), weshalb die zytosolische Depletion der TRAF2-clAPs Komplexen auch die TWEAK-vermittelte Inhibition des klassischen NF κ B-Signalwegs durch CD40 erklären könnte. Wie Rezeptor-Immunpräzipitationen für den TNFR2 und TNFR1 gezeigt haben, wird nach TWEAK-Vorstimulation eine verminderte Menge von TRAF2, clAPs und IKK in die Rezeptorkomplex rekrutiert (Wicovsky et al., 2009; Salzman et al., 2013). Die Menge an TNFR1 bzw. TNFR2-Molekülen in den IPs bleibt dabei durch das TWEAK priming unverändert (Wicovsky et al., 2009; Salzman et al., 2013). In CD40 Immunpräzipitationen in TWEAK-vorstimulierten Zellen hingegen, blieb die CD40-Expression und die Affinität der CD40/CD40L Interaktion unverändert, obwohl wesentlich geringe Mengen von CD40 mit CD40L präzipitiert werden konnten (Salzman et al., 2013). Es ist daher zu vermuten dass TRAF2-Trimere mit den CD40L-CD40-Komplexen interagieren können und diese stabilisieren. Diese Interaktion könnte die Dissoziation der CD40L-CD40-Komplexe während der Immunpräzipitation verhindern. Es wurde nun nachgewiesen, dass CD40, anders als TNFR1 und TNFR2, eine höhere Affinität für TRAF2 Homotrimere als für TRAF2-TRAF1 Heterotrimeren hat (Fotin-Mleczeck et al., 2004). Die TWEAK-induzierte TRAF1-Expression könnte daher die TRAF2-Rekrutierung an CD40 verhindern und demzufolge die Stabilität oder das Entstehen der CD40L-CD40-Komplexen beeinträchtigen. Es wurde nachgewiesen dass TRAF11-TRAF22 Heterotrimeren eine größere Affinität als TRAF2 Homotrimere für clAP2 haben (Zheng et al., 2010). Die TRAF11-TRAF22-clAP-Komplexe binden allerdings wie bereits erwähnt schwächer als die TRAF2-clAP-Komplexen an CD40. Daraus

resultiert eine verminderte Rekrutierung von cIAPs an CD40, die den Effekt der Fn14-vermittelte Depletion der TRAF2-Komplexe weiter verstärken kann. TRAF1-TRAF2 Heterotrimere können an TNFR2 und das TNFR1-Adaptor Protein TRADD stark binden (Wicovsky et al., 2009). Deshalb sollte dieser Vorgang nicht relevant für den Crosstalk von TWEAK mit TNFR1 und TNFR2 sein. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass die ektopische Expression von TRAF1 eine ähnliche Wirkung bezüglich des CD40-Signalwegs wie das Priming mit löslichem TWEAK hat. Die CD40L-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs wurde sowohl durch ektopische TRAF1-Expression, als auch TWEAK-Behandlung stark inhibiert (Abbildung 21, 22). Die Expression von CD40 (Abbildung 20A) und die Interaktion CD40L-CD40 wurden durch beide Prozesse nicht beeinträchtigt (Abbildung 20B). Das lässt den Schluss zu, dass TRAF1 eine inhibitorische Rolle im Bezug auf die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs in CD40-Signaling spielt.

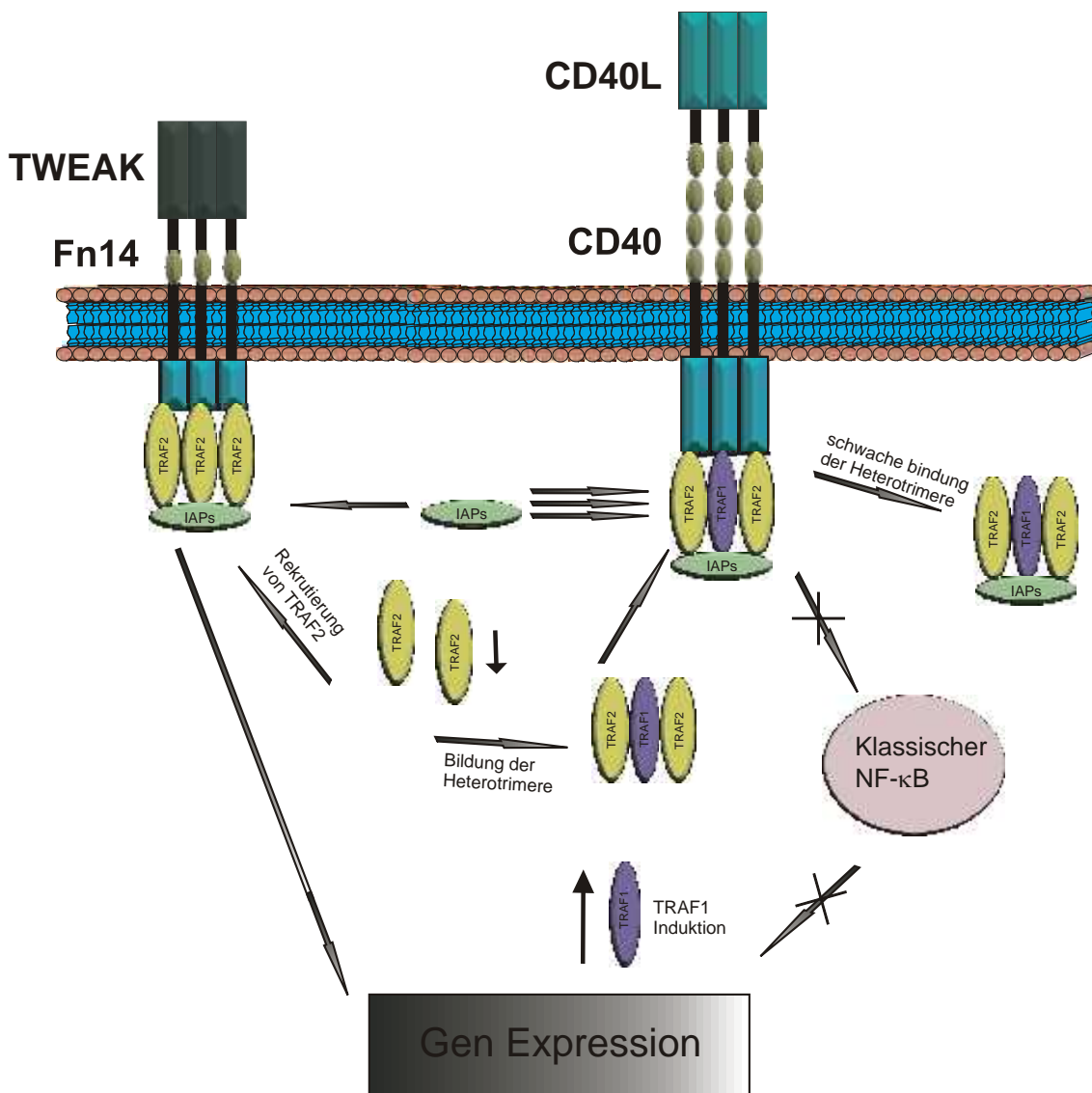


Abbildung 24. Schematisches Modell der TWEAK-vermittelte CD40-Inhibition

Nach TWEAK Stimulation erfolgen eine Rekrutierung von TRAF2 zu Fn14 und eine TRAF1-Induktion. TRAF2-TRAF1 Heterotrimere werden gebildet, die effizienter cIAPs als die TRAF2-Homotrimere binden. Jedoch TRAF2-TRAF1 Heterotrimere binden schwächer an den CD40 als die TRAF2-Homotrimere. Dies führt zu einer verminderten Rekrutierung von cIAPs an den CD40.

6 Zusammenfassung

TWEAK ist ein zu der TNF-Superfamilie (Tumor Necrosis Factor) zugehöriges Zytokin, welches in Form löslicher und membranständiger Moleküle vorkommt. Beide Formen des Liganden können an den Rezeptor (Fn14) binden. Viele verschiedene intrazelluläre Signalwege werden durch den Fn14 aktiviert, beispielweise Erk1/2, JNK, Jun und STAT3, vor allem jedoch das NF κ B. Lösliches und membranständiges TWEAK zeigen eine ähnliche Aktivierungseffizienz bezüglich des alternativen NF κ B-Signalwegs, wohingegen membranständiges TWEAK weit besser als lösliches TWEAK den klassischen NF κ B-Signalweg aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die TWEAK-vermittelte Induzierbarkeit von verschiedenen Zielgenen des NF κ B-Systems untersucht. Lösliches TWEAK zeigte einen weit schwächeren aktivierenden Effekt auf den klassischen NF κ B-Signalweg als TNF, das ein sehr guter Aktivator des klassischen NF κ B-Systems ist (Abb. 5, 6). Nichtsdestotrotz war TWEAK imstande eine stärkere TRAF1-Induktion als TNF herbeizuführen (Abbildung 7, 8). TRAF1 ist ein durch NF κ B-System stark reguliertes Gen. Um posttranskriptionelle TRAF1-Modifikationen als Ursache für die unerwartet gute TRAF1-Induktion durch lösliches TWEAK auszuschließen, wurde die TRAF1-Expression nach Proteasom- und Caspasen-Inhibition untersucht (Abbildung 9). Dies ergab keinen Hinweis auf einen Einfluss dieser Prozessen auf der TRAF1-Expression.

Mittels des IKK2-spezifischen Inhibitor TPCA-1 wurde die TWEAK-vermittelte TRAF1-Induktion Zelltyp-abhängig gehemmt, wohingegen die TNF-vermittelte Induktion von TRAF1 in allen Zelllinien vollständig inhibiert wurde (Abbildung 13). Versuche mit dem NEDD8-aktivierenden Enzym (NAE) Inhibitor MLN4924, resultierten in einer totalen Inhibition der TRAF1-Expression in allen TWEAK- und TNF-stimulierten Zellen (Abbildung 14). Diese Befunde sprechen dafür, dass bei der TWEAK-vermittelten TRAF1-Expression beide Zweige des NF κ B-Signalwegs Zelltyp-abhängig beteiligt sind.

Die Oligomerisierung der Liganden der TNF-Familie verstärkt oft ihre Aktivität. Oligomerisiertes TWEAK imitiert die biologische Aktivität von membranständigem TWEAK. Lösliches TWEAK wurde mit einem anti-Flag Antikörper oligomerisiert und die TRAF1-Induktion durch den alternativen NF κ B-Signalweg wurde analysiert

Oligomerisiertes TWEAK aktivierte Zelltyp-unabhängig den klassischen NF κ B-Signalweg stärker als lösliches TWEAK, wohingegen kein Effekt auf die TRAF1-Induktion oder auf die Aktivierung den alternativen NF κ B-Signalweg festgestellt wurde (Abbildung 11, 12). TWEAK ist imstande die TRAF2-vermittelte CD40-Induktion des klassischen NF κ B-Signalwegs zu hemmen (Abbildung 16, 17). Um den Beitrag von TWEAK-Induziertem TRAF1 zur CD40-Inhibition zu herauszufinden, wurden TRAF1-stabil transfizierte 786O- und U2OS-Zellen hergestellt (Abbildung 19). Die CD40-Induzierte I κ B α -Degradation und IL8/6 Produktion war in den TRAF1-Transfektanten als auch in mit löslichem TWEAK vorbehandelte Zellen stark inhibiert (Abbildung 21, 22), wobei die CD40-Expression und CD40/CD40L-Interaktion unverändert blieb (Abbildung 20). Diese Ergebnisse sprechen für einen wichtigen Beitrag des Adaptorprotein TRAF1 in der TWEAK-vermittelte Inhibition der CD40-induzierte Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs.

7 Abstract

The multifunctional cytokine TWEAK belongs to the TNF-Superfamily. As typically for the members of this family TWEAK occurs in a membrane-associated and a soluble form. Both forms of TWEAK are able to bind their cognate receptor Fn14, but they differ in their capability to activate Fn14. The TWEAK/Fn14 axis activates various intracellular signaling pathways leading to the activation of Erk1/2, JNK, Jun or STAT3, but above all the two NF κ B-pathway. A superiority of membrane TWEAK over soluble TWEAK to activate the classical NF κ B pathway is well known, but both TWEAK forms show no significant difference in the activation of the non-canonical NF κ B pathway. Soluble TWEAK was compared with TNF, a typical and strong inducer of classical NF κ B in this work and showed a inferior ability in the production of IL8 and degradation of I κ B α (Figure 5, 6) two hallmarks of the classical NF κ B pathway. Nevertheless, soluble TWEAK induced more powerful than TNF the expression of TRAF1, a NF κ B-controlled protein participating in the signal transduction of several inflammatory signaling pathways (Figure 7). Experiments using proteasom- and caspase-inhibitors were performed and showed no significant contribution of these processes to the differential TRAF1-expression by TNF and soluble TWEAK (Figure 9).

The IKK2 inhibitor TPCA-1 blocked TNF-induced TRAF1 expression in all cell lines investigated. Contrary, soluble TWEAK-induced TRAF1 expression was only inhibited by TPCA-1 in a subset of cell lines (Figure 13). Experiments blocking both NF κ B pathways, performed with the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924, revealed a total inhibition of TWEAK- and TNF-induced TRAF1 expression (Figure 14). In sum, these results suggests that both NF κ B signaling pathways are able to induce TRAF1. Oligomerisation of ligands from the TNF-family often results in strong enhancement of their biological activity. Oligomerization of soluble Flag-tagged TWEAK with an anti-Flag antibody produced ligand complexes which mimics the biological features of membrane TWEAK. These complexes showed neither enhanced TRAF1 induction nor a stronger activation of the alternative NF κ B pathway compared to soluble TWEAK (Figure 11). However, oligomerized Flag-TWEAK revealed a strongly increased capability to trigger the activation of the classical NF κ B pathway. TWEAK-priming can inhibit TRAF2-mediated CD40-

induction of the classical NF κ B pathway (Figure 16, 17). In order to establish the contribution of the TWEAK-induced TRAF1 to this effect, TRAF1 stable transfectants were generated (Figure 19). CD40-induced degradation of I κ B α as well as CD40-associated production of IL8/6 were strongly inhibited in TWEAK-primed cells and TRAF1 transfectants (Figure 21, 22), although expression of CD40 and CD40/CD40L interaction were not affected (Figure 20). These results indicate a contribution of the adaptor protein TRAF1 to TWEAK-mediated inhibition of CD40-induced NF κ B activation.

8 Literaturverzeichnis

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

Altenburg, A., Baldus, S.E., Smola, H., Pfister, H., Hess, S. (1999). CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. *J Immunol* 162, 4140-4147.

Alturaihi, H., Hassan, G.S., Al-Zoobi, L., Salti, S., Darif, Y., Yacoub, D., El Akoum, S., Oudghiri, M., Merhi, Y., Mourad, W. (2015). Interaction of CD154 with different receptors and its role in bidirectional signals. *Eur J Immunol* 45, 592-602.

Annunziata, C.M., Safiran, Y.J., Irving, S.G., Kasid, U.N., Cossman, J. (2000). Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF kappa B pathway by a protease inhibitor. *Blood* 96, 2841-2848.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. (1999). *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.

Badran, B.M., Wolinsky, S.M., Burny, A., Willard-Gallo, K.E. (2002). Identification of three NFAT binding motifs in the 5'-upstream region of the human CD3gamma gene that differentially bind NFATc1, NFATc2, and NF-kappa B p50. *J Biol Chem* 277, 47136-47148.

Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S.L., Benedict, C.A., Ware, C.F., Ghosh, G., Verma, I.M., Hoffmann, A. (2007). A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 128, 369-381.

Beinke, S., Ley, S.C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 382, 393-409.

Bishop, G.A., Moore, C.R., Xie, P., Stunz, L.L., Kraus, Z.J. (2007). TRAF proteins in CD40signaling. *Adv Exp Med Biol* 597, 131-151.

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., Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729-733.

Blanco-Colio, L.M. (2014). TWEAK/Fn14 Axis: A Promising Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Front Immunol* 20, 5:3.

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

Bradley, J.R., Pober, J.S. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482-6491.

Brown, S.A., Richards, C.M., Hanscom, H.N., Feng, S.L., Winkles, J.A. (2003). The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *Biochem J* 371, 395-403.

Burkly, L.C., Michaelson, J.S., Hahm, K., Jakubowski, A., Zheng, T.S. (2007). TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 40,1-16.

Caamaño, J., Hunter, C.A. (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15, 414-429.

Cabal-Hierro, L., Lazo, P.S. (2012). Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 24, 1297–1305.

Carpentier, I., Beyaert, R. (1999). TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 460, 246-250.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180, 1263-1272.

Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J., (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.

Chatzigeorgiou, A., Lyberis, M., Chatzilymperis, G., Nezos, A., Kamper, E. (2009). CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors* 35, 474-483.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32401-32410.

Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H., Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115, 679-688.

Collart, M.A., Baeuerle, P., Vassalli, P. (1990). Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 10, 1498-1506.

Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

del Rio, M.L., Schneider, P., Fernandez-Renedo, C., Perez-Simon, J.A., Rodriguez-Barbosa, J.I. (2013). LIGHT/HVEM/LT R interaction as a target for the modulation of the allogeneic immune response in transplantation. *Am J Transplant* 13, 541-551.

Dunn, I.F., Geha, R.S., Tsitsikov, E.N. (1999). Structure of the murine TRAF1 gene. *Mol Immunol* 36, 611-617.

Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229, 152-172.

Etemadi, N., Holien, J.K., Chau, D., Dewson, G., Murphy, J.M., Alexander, W.S., Parker, M.W., Silke, J., Nachbur, U. (2013). Lymphotoxin induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor. *FEBS J* 280, 5283-5297.

Feng, S.L., Guo, Y., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., Bell, D.W., Testa, J.R., Peifley, K.A., Winkles, J.A. (2000). The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas. *Am J Pathol* 156, 1253-1261.

Fick, A., Lang, I., Schäfer, V., Seher, A., Trebing, J., Weisenberger, D., Wajant, H. (2012). Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem* 287, 484-495.

Fong, A., Sun, S.C. (2002). Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF-kappa B2/p100. *J Biol Chem* 277, 22111-22114.

Fotin-Mleczeck, M., Henkler, F., Hausser, A., Glauner, H., Samel, D., Graness, A., Scheurich, P., Mauri, D., Wajant, H. (2004). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 279, 677-685.

Gardam, S., Turner, V.M., Anderton, H., Limaye, S., Basten, A., Koentgen, F., Vaux, D.L., Silke, J., Brink, R. (2011). Deletion of cIAP1 and cIAP2 in murine B lymphocytes constitutively activates cell survival pathways and inactivates the germinal center response. *Blood* 117, 4041-4051.

Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J., Los, M. (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* 46, 497-510.

Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C., Kroczeck, R. A. (1995). A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 25, 1749-1754.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802.

Gruss, H.J., Dower, S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378-3404.

Guicciardi, M.E., Gores, G.J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J* 23, 1625-1637.

Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., Koschny, R., Komander, D., Silke, J., Walczak, H. (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF mediated gene induction. *Mol Cell* 36, 831-844.

Han, S., Yoon, K., Lee, K., Kim, K., Jang, H., Lee, N.K., Hwang, K., Young Lee, S. (2003). TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF-kappa B through TNF receptor-associated factors. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 789-796.

Hanissian, S. H., Geha, R.S. (1997). Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 6, 379-387.

Hassan, G.S., Stagg, J., Mourad, W. (2015). Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 41, 431-440.

Hayden, M.S., Ghosh, S. (2012). NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26, 203-234.

Hayden, M.S., Ghosh, S. (2014). Regulation of NF- B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 26, 253-266.

Häcker, H., Tseng, P.H., Karin, M. (2011). Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat Rev Immunol* 11, 457-468.

Hehlgans, T., Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.

Hoesel, B., Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF- B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12:86.

Hostager, B.S., Bishop, G.A. (2013). CD40-Mediated Activation of the NF- B2 Pathway. *Front Immunol* 4:376.

Hsu, Y.M., Lucci, J., Su, L., Ehrenfels, B., Garber, E., Thomas, D. (1997). Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes. *J Biol Chem* 272, 911–915.

Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.H., Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565–576.

Inoue, Ji., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., Yamamoto, T. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 254, 14-24.

Irmeler, M., Steiner, V., Ruegg, C., Wajant, H., Tschopp, J. (2000). Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 468, 129-133.

Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L., Chen, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15, 535-548.

Kantari, C., Walczak, H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1813, 558-563.

Kawai, T., Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.

Kehry, M.R. (1996). CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* 156, 2345-2348.

Koho, H., Paulie, S., Ben-Aissa, H., Jónsdóttir, I., Hansson, Y., Lundblad, M.L., Perlmann, P. (1984). Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. *Cancer Immunol Immunother* 17, 165-172.

Kowalczyk-Quintas, C., Schneider, P. (2014). Ectodysplasin A (EDA) - EDA receptor signalling and its pharmacological modulation. *Cytokine Growth Factor Rev* 25,195-203.

Kumar, M., Makonchuk, D.Y., Li, H., Mittal, A., Kumar, A. (2009). TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) activates proinflammatory signaling pathways and gene expression through the activation of TGF-beta-activated kinase 1. *J Immunol* 182, 2439–2448.

Lavrik, I.N. (2014). Systems biology of death receptor networks: live and let die. *Cell Death Dis* 5:e1259.

Lee, J.S., Hong, U.S., Lee, T.H., Yoon, S.K., Yoon, J.B. (2004). Mass spectrometric analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 ubiquitination mediated by cellular inhibitor of apoptosis 2. *Proteomics* 4, 3376-3382.

Leo, E., Deveraux, Q.L., Buchholtz, C., Welsh, K., Matsuzawa, S., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (2001). TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276, 8087-8093.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W., Sun, S.C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* 279, 26243-26250.

- Liu, C., Ding, H., Zhu, W., Jiang, S., Xu, J., Zou, G.M. (2013). LIGHT regulates the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 114, 346-353.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Loo, Y.M., Gale, M.Jr. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680-692.
- MacLennan, I., Vinuesa, C. (2002). Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 17, 235-238.
- May, M.J., Ghosh, S. (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8, 63-73.
- Mazzei, G.J., Edgerton, M.D., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, J.F., Bernard, A., Allet, B., Bonnefoy, J.Y. (1995). Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 270, 7025-7028.
- Moon, E.Y., Park, H. (2007). B cell activating factor (BAFF) gene promoter activity depends upon co-activator, p300. *Immunobiology* 212, 637-645.
- 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. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- . *Nature* 385, 733-736.
- Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshikawa, M., Yoshioka, Y., Tsunoda, S., Nakagawa, S., Yamagata, Y., Tsutsumi, Y. (2010). Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal* 3, 148.
- Naismith, J.H., Sprang, S.R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23, 74-79.
- Netea, M.G., van Tits, L.J., Curfs, J.H., Amiot, F., Meis, J.F., van der Meer, J.W., Kullberg, B.J. (1999). Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol* 163, 1498-1505.

Ostuni, R., Zanoni, I., Granucci, F. (2010). Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* 67, 4109-4134.

Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Paulie, S., Koho, H., Ben-Aissa, H., Hansson, Y., Lundblad, M. L., Perlmann, P. (1984). Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis. *Cancer Immunol Immunother* 17, 173-179.

Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., Robillard, N., Wijdenes, J., Bataille, R. (1996). CD11a-CD18 and CD102 interactions mediate human myeloma cell growth arrest induced by CD40 stimulation. *Cancer Res* 56, 1909-1916.

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

Pullen, S.S., Miller, H.G., Everdeen, D.S., Dang, T.T., Crute, J.J., Kehry, M.R. (1998). CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* 37, 11836-11845.

Randall, T. D., Heath, A. W., Santos-Argumedo, L., Howard, M. C., Weissman, I. L., Lund, F. E. (1998). Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibodysecreting cells in germinal centers. *Immunity* 8, 733-742.

Rao, S., Gerondakis, S., Woltring, D., Shannon, M.F. (2003). c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter. *J Immunol* 170, 3724-3731.

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

Razani, B., Reichardt, A.D., Cheng, G. (2011). Non-canonical NF- B signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev* 244, 44-54.

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

Saleh, M. (2011). The machinery of Nod-like receptors: refining the paths to immunity and cell death. *Immunol Rev* 243, 235-246.

Salzmann, S., Lang, I., Rosenthal, A., Schäfer, V., Weisenberger, D., Carmona Arana, J.A., Trebing, J., Siegmund, D., Neumann, M., Wajant, H. (2013). TWEAK inhibits TRAF2-mediated CD40 signaling by destabilization of CD40 signaling complexes. *J Immunol* 191, 2308-2318.

Sánchez-Valdepeñas, C., Martín, A.G., Ramakrishnan, P., Wallach, D., Fresno, M. (2006). NF-kappaB-inducing kinase is involved in the activation of the CD28 responsive element through phosphorylation of c-Rel and regulation of its transactivating activity. *J Immunol* 176, 4666-4674.

Säemann, M.D., Diakos, C., Kelemen, P., Kriehuber, E., Zeyda, M., Böhmig, G.A., Hörl, W.H., Baumruker, T., Zlabinger, G.J. (2003). Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3. *Am J Transplant* 3, 1341-1349.

Scheidereit, C. (2006). IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705.

Schwenzer, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R.M., 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.

Sen, R., Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.

Shi, G., Wu, Y., Zhang, J., Wu, J. (2003). Death decoy receptor TR6/DcR3 inhibits T cell chemotaxis in vitro and in vivo. *J Immunol* 171, 3407-3414.

Shih, V.F., Tsui, R., Caldwell, A., Hoffmann, A. (2011). A single NF B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* 21, 86-102.

Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.

Speeckaert, M.M., Speeckaert, R., Laute, M., Vanholder, R., Delanghe, J.R. (2012). Tumor necrosis factor receptors: biology and therapeutic potential in kidney diseases. *Am J Nephrol* 36, 261-270.

Sun, S.C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 21, 71-85.

Suttles, J., Stout, R.D. (2009). Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin Immunol* 21, 257-264.

Tai, Y.T., Podar, K., Mitsiades, N., Lin, B., Mitsiades, C., Gupta, D., Akiyama, M., Catley, L., Hideshima, T., Munshi, N.C., Treon, S.P., Anderson, K.C. (2003). CD40 induces human multiple myeloma cell migration via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/NF- κ B signaling. *Blood* 101, 2762-2769.

Tanaka, T., Iino, M. (2015). Nuclear Translocation of p65 is Controlled by Sec6 Via the Degradation of I κ B. *J Cell Physiol*.

Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., Iwai, K. (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol* 11, 123-132.

Tong, A.W., Stone, M.J. (2003). Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther* 10, 1-13.

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

van Kooten, C., Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67, 2-17.

Vince, J.E., Chau, D., Callus, B., Wong, W.W., Hawkins, C.J., Schneider, P., McKinlay, M., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Chunduru, S.K., Yeoh, G., Brink, R., Vaux, D.L., Silke, J. (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF α . *J Cell Biol* 182, 171-184.

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

Wajant, H., Gerspach, J., Pfizenmaier, K. (2013). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett* 332, 163-174.

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

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

Wickremasinghe, M.I., Thomas, L.H., O'Kane, C.M., Uddin, J., Friedland, J.S. (2004). Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell-specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. *J Biol Chem* 279, 27199-27210.

Wicovsky, A., Henkler, F., Salzmann, S., Scheurich, P., Kneitz, C., Wajant, H. (2009). Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28, 1769-1781.

Wicovsky, A., Salzmann, S., Roos, C., Ehrenschwender, M., Rosenthal, T., Siegmund, D., Henkler, F., Gohlke, F., Kneitz, C., Wajant, H. (2009). TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ* 16, 1445-1459.

Wiley, S.R., Cassiano, L., Lofton, T., Davis-Smith, T., Winkles, J.A., Lindner, V., Liu, H., Daniel, T.O., Smith, C.A., Fanslow, W.C. (2001). A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity* 15, 837-846.

Williams, T.W., Granger, G.A. (1973). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: mechanism of human lymphotoxin-induced target cell destruction. *Cell Immunol* 6, 171-185.

Winkles, J.A. (2008). The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov* 7, 411-425.

Wyzgol, A., Müller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G.U., Pfizenmaier, K., Wajant, H. (2009). Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol*. 183, 1851-1861.

Xiao, G., Fong, A., Sun, S.C. (2004). Induction of p100 processing by NF- κ B-inducing kinase involves docking I κ B kinase (IKK) to p100 and IKK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-30105.

Xie, P. (2013). TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J Mol Signal* 8, 7.

Yang, M., Hase, H., Legarda-Addison, D., Varughese, L., Seed, B., Ting, A.T. (2005). B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol* 175, 2814-2824.

Yoon, J.H., Cho, Y.J., Park, H.H. (2014). Structure of the TRAF4 TRAF domain with a coiled-coil domain and its implications for the TRAF4 signalling pathway. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70, 2-10.

Yu, M., Levine, S.J. (2011). Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. *Cytokine Growth Factor Rev* 22, 63–72.

Zaman, S., Wang, R., Gandhi, V. (2014). Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 55, 1980-1992.

Zarnegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W.C., Mak, T.W., Korneluk, R.G., Cheng, G. (2008). Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 9, 1371-1378.

Zhang, B., Wang, Z., Li, T., Tsitsikov, E.N., Ding, H.F. (2007). NF-kappaB2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 110, 743-751.

Zhang, G. (2004). Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol* 14, 154-160.

Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y., Cheng, G., Wu, H. (2010). Crystal structures of the TRAF2:cIAP2 and the TRAF1:TRAF2:cIAP2 complexes: affinity, specificity and regulation. *Mol Cell* 38, 101-113.

Zotti, T., Vito, P., Stilo, R. (2012). The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J Cell Physiol* 227, 1280-1284.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

41BB	TNFRSF9
41BBL	41BB Ligand
°C	Grad Celsius
A	Ampere
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6sulfonsäure)
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
BAFF	<i>B-cell-activating factor</i>
BAFF-R	<i>B-cell-activating factor receptor</i>
Bak	<i>Bcl2 agonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl2-associated X protein</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>Bcl2-like protein</i>
BCMA	<i>B-cell maturation factor</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i>
BH3	<i>Bcl2 Homology domain 3</i>
BID	<i>Bcl2 homology domain 3-interacting domain</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Caspase	<i>cysteine aspartat specific protease</i>
CD	<i>cluster of Differentiation</i>
CD27	<i>T-cell activating antigen S152</i>
CD27L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 7</i>
CD30	TNFRSF8
CD30L	CD30 Ligand
CD40	TNFRSF5

CD40L	CD40 Ligand, CD154, TRAP, gp39
CD95	TNFRSF6, <i>apoptosis-mediating surface antigen Fas</i>
cFLIP	<i>cellular FLICE inhibitory protein</i>
CHX	Cycloheximid
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	<i>cysteine-rich domain</i>
cREL	<i>V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B</i>
DcR3, 2, 1	<i>decoy receptor 3, 2, 1</i>
DD	<i>death domain, Todesdomäne</i>
Diablo	<i>Direct IAP-Binding protein with Low PI</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleotiden
DR(s)	<i>death receptor(s)</i>
DR3	<i>death receptor 3</i>
DR6	<i>death receptor 6</i>
E3	<i>ubiquitin-protein ligase</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDA-A1	<i>ectodermal dysplasia protein 1</i>
EDA-A2	<i>ectodermal dysplasia protein 2</i>
EDAR	<i>ectodysplasin A receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ev.	eventuell
F	Farad
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>

Fas	<i>FS7-associated surface antigen</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i> , konstanter Antikörperteil
FCS	fötales Kälberserum
Flag	Polypeptid Protein-tag (DYKDDDDK)
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme</i>
Fn14-Rezeptor	<i>fibroblast growth factor-inducible 14</i>
g	Gramm
G418-Sulfate	<i>Geneticin disulfate</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
GITRL	<i>glucocorticoid-induced TNF-related ligand</i>
GpL	<i>Gaussia princeps</i> Luciferase
HCl	Chlorwasserstoff
hMSC	Mesenchymale humane Stammzellen
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator A</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>IκB (inhibitor of NFκB) Kinasekomplex</i>
IKK	<i>inhibitor of NFκB-Kinase alpha</i>
IKK	<i>inhibitor of NFκB-Kinase beta</i>
IL	Interleukin
I κ B α , β , δ , ϵ	<i>Inhibitor of NFκBα, β, δ, ϵ</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton = 10 ³ Dalton
konz.	Konzentration
l	Liter
LIGHT	<i>herpes virus entry mediator ligand</i>
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
LT	<i>lymphotoxin alpha</i>
LT 1 2	<i>lymphotoxin alpha 1/beta2</i>
LT	<i>lymphotoxin beta</i>
LT R	<i>lymphotoxin beta receptor</i>

LUBAC	<i>linear ubiquitin chain assembly complex</i>
m	milli (tausendster Teil; 10 ⁻³)
M	Molarität (Mol/Liter)
m ²	Quadratmeter
M2	Anti-Flag mAb
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MG132	benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leu-aldehyde benzyl
min	Minute(n)
MLN	<i>Pevonedistat</i>
mol	Stoffmenge
MSCGM-CD	<i>Mesenchymal Stem Cell Growth Medium - Chemically Defined</i>
n	nano (milliardster Teil, 10 ⁻⁹)
nm	Nanometer
n.s.	<i>nonspecific</i>
ns	<i>nonsoluble</i>
NEMO	<i>NF B essential modifier</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
NIK	<i>NF B-inducing kinase</i>
NK	natürliche Killerzellen
NLS	Kernlokalisationssequenz
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
OX40	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 4</i>
OX40L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 4</i>
p	pico (10 ⁻¹²)
P	Phosphat
p100	<i>NF B2</i>
p105	<i>NF B1</i>
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
p50	<i>NF B1</i> , Untereinheit p50

p52	<i>NF B2, Untereinheit p52</i>
p65	<i>transcription factor p65</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PLAD	<i>pre-ligand assembly domain</i>
RANK	<i>receptor activator of NF B</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF B ligand</i>
rel.	relativ
RelA	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i>
RelB	<i>transcription factor RelB</i>
RELT	<i>receptor expressed in lymphoid tissues</i>
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RIP-1	<i>receptor interacting protein-1</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (Medium)</i>
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SN	<i>supernatant (Überstand)</i>
SODD	<i>silencer of death domain</i>
SR	<i>super-repressor</i>
st	Stunde
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3,</i>
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
TAB(2,3)	TAK1)-binding protein (2,3)
TAK	<i>TGF-β-activated Kinase</i>
tBID	<i>truncated BID</i>
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THD	<i>TNF homology domain</i>
TL1A	<i>TNF ligand related molecule 1</i>
TM	Transmembran Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor, TNFSF2
TNFR1, 2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1, 2,
TNFRSF	<i>Tumor necrosis factor superfamily</i>
TPCA-1	2-[(Aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide
TRADD	<i>TNFR associated death domain</i>
TRAF	<i>TNFR associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRAILR(1-4)	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor(1-4)</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TROY	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i>
tub	tubulin
TWEAK	<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurate
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vgl.	Vergleich
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WD	<i>beta-transducin repeats</i>
XEDAR	<i>X-linked ectodysplasin-A2 receptor</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
z.B.	zum Beispiel
	Anti
μ	millionster Teil, 10 ⁻⁶
z-VAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton (pan-Caspaseinhibitor)
β-TrCP	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>

9.2 Publikationen

Carmona Arana J.A., Seher A, Neumann M, Lang I, Siegmund D, Wajant H. (2014). TNF Receptor-Associated Factor 1 is a Major Target of Soluble TWEAK. *Front Immunol* 5:63.

Salzmann, S., Lang, I., Rosenthal, A., Schafer, V., Weisenberger, D., **Carmona Arana, J.A.**, Trebing, J., Siegmund, D., Neumann, M., Wajant, H. (2013). TWEAK inhibits TRAF2- mediated CD40 signaling by destabilization of CD40 signaling complexes. *J Immunol* 191, 2308-2318.

Trebing, J., **Arana, J.A.**, Salzmann, S., Wajant, H. (2014). Analyzing the signaling capabilities of soluble and membrane TWEAK. *Methods Mol Biol* 1155, 31-45.