

Funktionelle Analyse des Met196Arg- Polymorphismus im humanen TNF-Rezeptor 2

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ANDREAS TILL
(Dipl.- Biol.)

Kiel
September 2004

Diese Arbeit wurde in der Gruppe Zellbiologie der Arbeitsgruppe Mucosaimmunologie / des Instituts für Klinische Molekularbiologie (Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. S. Schreiber) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Zeit von November 2001 bis September 2004 angefertigt.

Referent/in:

Prof. Dr. K. Krupinska

Koreferent/in:

Prof. Dr. S. Schreiber

Tag der mündlichen Prüfung:

05.11.2004

Zum Druck genehmigt:

gez. Prof. J. Grotemeyer (Dekan)

Gewidmet

meinen Eltern,

meinen Brüdern,

meiner gesamten Familie

mit Dank

für die jahrelange Unterstützung

aus der Ferne.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis und englische Fachtermini	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
1 EINLEITUNG	
1.1 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie und ihre Liganden	1
1.2 Tumornekrosefaktor α	3
1.3 Vergleich zwischen TNFR1 und TNFR2	5
1.4 Signaltransduktion durch TNFR1	6
1.5 Signaltransduktion durch TNFR2	9
1.6 Der NF κ B-Signalweg	12
1.7 Rolle des Met196Arg Polymorphismus im humanen TNFR2	15
1.8 Zellbiologische und biochemische Hilfsmittel bei der Erforschung des TNFR2	17
1.9 Zielsetzungen dieser Arbeit	19
2 METHODEN	
2.1 Zellkultur	21
2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	21
2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen	21
2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	22
2.2.3 Reverse Transkription	23
2.2.4 RT-PCR	24
2.2.5 Herstellung von Konstrukten zur Überexpression und für Reporter-Gen-Assays	25
2.2.5.1 Amplifikation der Zielsequenzen	25
2.2.5.2 Aufreinigung der DNA	26
2.2.5.3 Enzymatischer Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
2.2.5.4 Ligation	27
2.2.5.5 Transformation von Bakterien	28
2.2.5.6 Identifizierung von positiven Klonen	28
2.2.5.7 Präparative Aufreinigung der Plasmid-DNA (Maxiprep)	29
2.2.5.8 Sequenzierungsreaktion	29
2.2.5.9 Ortsgerichtete Mutagenese	30
2.2.5.10 Übersicht über die hergestellten Konstrukte	31
2.3 Rekombinante Herstellung von TNF-Muteinen	33
2.3.1 Transformation und Isolierung erfolgreich transformierter Klone	33
2.3.2 Präparative Aufreinigung von TNF-Muteinen	34
2.4 Transfektion von Zellen	35
2.4.1 Methodische Grundlagen	35
2.4.2 Etablierung stabiler Zelllinien	36

2.4.2.1	Transfektion und Selektion	36
2.4.2.2	Isolierung und Kultivierung stabil transfizierter Zellen	36
2.4.2.3	FACS-Analyse der transfizierten Zellen auf TNFR2-Expression	37
2.5	Bindungsstudien mit ¹²⁵ Iod-TNF	37
2.6	Biochemische Methoden	38
2.6.1	Herstellung von Gesamtproteinlysate aus Zellen	39
2.6.2	Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	39
2.6.3	Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Westernblot)	40
2.6.4	Immundetektion von Proteinen	40
2.6.5	Detektion von löslichen Proteinen – ELISA-Messungen	41
2.6.6	Co-Immunpräzipitation von TNFR2 und TRAF2	41
2.7	Quantitative Zelltod-Messung	42
2.8	Detektion der Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS-Messung)	43
2.9	Reportergen-Assay	43
2.10	Fluoreszenz-Mikroskopie	44
2.11	Statistische Auswertung	44

3 ERGEBNISSE

3.1	Molekular- und zellbiologische Vorarbeiten	45
3.1.1	Herstellung der Konstrukte	45
3.1.2	Etablierung von Zelllinien mit stabiler TNFR2-Expression	47
3.1.3	Rekombinante Herstellung und Aufreinigung von TNF α -Muteinen	48
3.2	Funktionelle Analyse des Met196Arg Polymorphismus	49
3.2.1	Analysen zur Zytotoxizität unterschiedlicher TNF-ähnlicher Stimuli	49
3.2.2	Charakterisierung des TNF-induzierten Zelltods – Apoptosenachweis	52
3.2.3	Kinetik des <i>Shedding</i> -Verhaltens	55
3.2.4	Physikalische Bindungseigenschaften der TNFR2-Varianten	56
3.2.5	Signaltransduktionsprozesse durch TNFR2	58
3.2.6	Quantifizierung der NF κ B-Aktivierung	61
3.2.7	Analyse der durch die TNFR2-Varianten induzierten Genexpression	64
3.2.8	Regulation der MnSOD als Beispiel für ein differentiell exprimiertes TNF-Zielgen	67
3.2.9	Untersuchung der Rekrutierung von TRAF2 zu TNFR2	69

4 DISKUSSION

4.1	Ausgangsfragestellung und Intention	72
4.2	HeLa- Zellen und TNFR1 ^{-/-} /TNFR2 ^{-/-} - MEF als zellbiologisches Modell	73
4.3	Differenzierung des Signalgeschehens über die beiden TNFR-Subtypen	74
4.4	Funktioneller Vergleich der beiden TNFR2-Varianten	75

4.4.1	Shedding und biophysikalische Bindungseigenschaften	75
4.4.2	Die Mutation bedingt eine erhöhte Sensitivität zu TNF α	76
4.4.3	Der NF κ B-Signalweg wird durch Vorliegen der 196Arg-Variante negativ beeinflusst	77
4.4.4	Die TNFR2-induzierte Genexpression ist bei der 196Arg-Variante verringert	78
4.4.5	Die Mutation bewirkt eine geringere Fähigkeit zur TRAF2-Rekrutierung	79
4.4.6	Zusammenfassung des funktionellen Vergleichs der beiden TNFR2-Varianten	80
4.4.7	Pathophysiologische Relevanz des Polymorphismus	81
4.5	Ausblick	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	SUMMARY (engl.)	85
7	LITERATUR	86
	Anhang – verwendete Materialien	94
	Erklärung	100
	Lebenslauf	101
	Publikationen und Aktivitäten	102
	Danksagung	104

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. bidest.	Aqua (bidestilliert)
Abb.	Abbildung
Acc. No.	<i>accession number</i>
add	<i>addition to</i>
Amp	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ASK-1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	<i>concentration</i>
Casp	Caspase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA, "copy DNA"</i>
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CHX	Cycloheximid
c-IAP	<i>cytosolic inhibitor of apoptosis</i>
CK II	Caseinkinase II
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalievirus
cPLA2	zytosolische Phospholipase A2
cpm	<i>counts per minute</i>
CRD	<i>cysteine-rich domains</i>
CuZnSOD	Kupfer-Zink-abhängige Superoxiddismutase
Cys	Cystein
Da	Dalton
DCFH-DA	Dichlorfluoreszin-Diazetat
DCR	<i>decoy receptor</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DEPC	Diethylpyrocabonat
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DLA	Dual Luciferase Assay
DNA	desoxyribonucleic acid
Dnase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>Dpn I</i>	Restriktionsenzym aus <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
DR	<i>death receptor</i>
<i>Eco R1</i>	Restriktionsendonuklease von <i>Escherichia coli</i> R1
<i>Bam H1</i>	Restriktionsendonuklease von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>

ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
ERK(s)	<i>extracellular signal-regulated kinase(s)</i>
et al.	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence assisted cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain (protein)</i>
fg	<i>femtogramm (10^{-15} g)</i>
FLICE	<i>FADD-like interleukin-converting enzyme</i>
FLIP	<i>Flice- like inhibitory protein</i>
fmol	<i>femtomol (10^{-15} mol)</i>
g	Gramm
G	Guanin
<i>g</i>	<i>gravity</i> (Erdbeschleunigung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage stimulating factor</i>
G-Protein	GTP-bindendes Protein
gt	Ziege (Antikörperherkunft)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxymethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
<i>Hind III</i>	Restriktionendonuklease von <i>Haemophilus influenzae Rd</i>
His	Histidin
I κ B	<i>inhibitor of nuclear factor κB</i>
IFN	Interferon
IFX	Infliximab (Remicade®)
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible NO-synthase</i>
InsP3K	Inositol-3-Phosphat-Kinase
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktosid
¹²⁵ I-TNF α	¹²⁵ Iodotyrosyl-TNF α
J	Joule
JNK(s)	<i>cJun N-terminal kinase(s)</i>
Kana	Kanamycin
kb	kilobases (10^3 bp)
kDa	kilodalton (10^3 Da)
l	Liter
LB	Luria Broth; Bakterienmedium
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg	Lösung
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAPK(s)	<i>mitogen-activated protein kinase(s)</i>
MEF	<i>mouse embryonal fibroblasts</i>
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
MEKK	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>

memTNF	membrangebundenes TNF α
Met	Methionin
mg	milligramm (10^{-3} g)
MHC	multi-histocompatibility complex
min	Minute(n)
MKK	<i>MAPK kinase</i>
mm	Millimeter
mM	millimolar (10^{-3} mol/l)
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MMP	Magermilchpulver
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid, messenger-RNA</i>
ms	Maus (Antikörperherkunft)
ms	Maus-
MS	Multiple Sklerose
μ Ci	Mikrocurie
μ g	microgramm (10^{-6} g)
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar (10^{-6} mol/l)
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
neo	Neomycin-Resistenz
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
ng	nanogramm (10^{-9} g)
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NiNTA	Ni ²⁺ - <i>Nitriloacetic acid</i>
NK	<i>natural killer</i>
nm	Nanometer
NO	<i>nitric oxide</i>
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-desoxythymidin
<i>p</i>	<i>propability</i> (Wahrscheinlichkeit)
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PARP	poly(ADP-Ribose-)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pg	picogramm (10^{-12} g)
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKA	ProteinkinaseA
PKB	ProteinkinaseB/Akt
PLAD	<i>pre-ligand binding assembly domain</i>
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PPR	<i>proximal promoter region</i>
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
rb	Kaninchen (Antikörperherkunft)
RH	<i>Rel-homology</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
<i>rpm</i>	<i>rotations per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit cDNA als <i>Template</i> , im Anschluss an Reverse Transkription
s.	siehe
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt(e/er/es)
sTNF	lösliches TNF α
sTNFR2	löslicher TNFR2
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TACE	<i>tnf α converting enzyme</i>
T _{anneal}	Annealingtemperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Thr	Threonin
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TNFRE	<i>tnf responsive element</i>
TNFRSF	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TNFSF	<i>tumor necrosis factor superfamily</i>
TRADD	<i>tnf receptor associated death domain (protein)</i>
TRAF	<i>tnf receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>tnf-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TTBS	<i>Tris-buffered saline</i> + 0,1 % Tween20
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
W	Watt
w/v	<i>weight/volume</i>
WB	Westernblot
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Es wurden folgende Fachtermini aus dem englischen Sprachgebrauch verwendet, deren Übersetzung ins Deutsche schwierig und in der molekularbiologischen Literatur auch nicht üblich ist:

<i>annealing</i>	Anlagerung der <i>Primer</i> an einzelsträngige DNA aufgrund komplementärer Basenpaarung
<i>beads</i>	Agarosekügelchen zum Immobilisieren bestimmter Stoffe an ihrer Oberfläche, z.B. ProteinA/G für Immunpräzipitationen
<i>blot</i>	Experimenteller Aufbau zur Übertragung von DNA, RNA oder Proteinen auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran
<i>crosslinking</i>	hier: Stabilisierung von Protein-Protein-Assoziationen durch nichtkovalente Bindung, z.B. mit Hilfe eines bivalenten Antikörpers
<i>DNA-laddering</i>	internukleosomale Spaltung der DNA während des Apoptoseprozesses
<i>housekeeping gene</i>	Gen mit konstitutiver und zeitlich konstanter Expression, das zur Kontrolle bei semiquantitativen Expressionsanalysen benutzt wird
<i>kit</i>	kommerziell erhältliche Zusammenstellung aller Komponenten, die für eine Versuchsdurchführung benötigt werden
<i>knock-out</i>	Ausschaltung eines Gens durch gentechnologische Methoden
<i>ligand passing</i>	Weitergabe des Liganden an einen anderen Rezeptor-Typ aufgrund transienter physischer Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand
<i>mock</i>	engl. „nachgemacht“, „zum Schein“; im Zusammenhang mit Transfektionen: Benutzung des Transfektionsplasmids ohne Insert als Leer-Kontrolle
<i>multiple cloning site</i>	Region eines Plasmids mit Abfolge verschiedener Restriktionsschnittstellen zur Aufnahme von Insert-DNA
<i>plate</i>	Zellkulturschale
<i>primer</i>	Kurzes Oligonukleotid, komplementär zu DNA- oder RNA-Bereichen, dient zur gerichteten enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA- oder RNA-Abschnitte
<i>shedding</i>	proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne eines transmembranen Proteins
<i>stripping</i>	Entfernen der markierten Sonde bzw. der gebundenen Antikörper nach Detektion von Nukleinsäuren bzw. Proteinen
<i>tag</i>	Aminosäuremotiv zur Markierung eines rekombinanten Proteins
<i>target gene</i>	Zielgen eines Signaltransduktionsweges
<i>template</i>	DNA oder RNA, die als Ausgangssubstanz für die Amplifikation spezifischer Bereiche durch PCR benutzt wird
<i>well</i>	Reaktionstasche, -schale oder -napf

Abbildungsverzeichnis

Abb.1. Molekulare Mechanismen innerhalb der TNFRSF	1
Abb.2. Die Familie der humanen TRAF-Proteine	3
Abb.3. Hauptsignalwege über TNFR1	7
Abb.4. Signaltransduktionswege über TNFR2	10
Abb.5. Der klassische NF κ B-Signalweg	13
Abb.6. Schematischer Aufbau des TNFR2	16
Abb.7. Schema der PCR-basierten Amplifikation der Ziel-DNA	26
Abb.8. Schematischer Aufbau der TNFR2-Konstrukte	31
Abb.9. Schematischer Aufbau des EGFP-TRAF2-Fusionsproteins	31
Abb.10. Schematischer Aufbau des MnSOD-Gens	32
Abb.11. Verwendeter Vektor für MnSOD-Reportergenkonstrukte	32
Abb.12. Amplifikation der kodierenden Sequenz für TRAF2 aus cDNA	45
Abb.13. Abschätzung der DNA-Konzentrationen	46
Abb.14. Testverdau zur Identifizierung positiver Klone	46
Abb.15. FACS-Analyse der stabilen Zellpopulationen	47
Abb.16. Identifizierung des rekombinanten Proteins als humane TNF α -Mutante	48
Abb.17. Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Nickel-Chelat-Chromatographie	49
Abb.18. Zytotoxizität unterschiedlicher TNF α -ähnlicher Stimuli	50
Abb.19. Zytotoxizität von sTNF nach Vorstimulation mit Cys-R2TNF (6 h)	51
Abb.20. Nachweis der PARP-Spaltung durch TNF α -ähnliche Stimuli	52
Abb.21. <i>DNA-laddering</i> nach TNF α -Stimulation	53
Abb.22. Nachweis von ROS-Entstehung nach Stimulation mit sTNF	54
Abb.23. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den TNF α -induzierten Zelltod	54
Abb.24. <i>Shedding</i> -Kinetik der TNFR2-Varianten	55
Abb.25. Kompetitionstest der Bindung von ¹²⁵ Iod-TNF α an TNFR2-Varianten	56
Abb.26. Bestimmung der K _d -Werte für beide TNFR2-Varianten	57
Abb.27. Kinetik der Bindung von ¹²⁵ I-TNF α an TNFR2-Varianten	58
Abb.28. Signaltransduktionsprozesse durch TNFR2 – MAPK-Kaskade	59
Abb.29. Signaltransduktionsprozesse durch TNFR2 - NF κ B-Signalweg	60
Abb.30. NF κ B-Aktivierung durch TNF α -ähnliche Stimuli	61
Abb.31. NF κ B-Aktivierung in MEF	63
Abb.32. RT-PCR gegen TNF α -Zielgene nach Stimulation mit Cys-R2TNF	64
Abb.33. Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Analysen	65
Abb.34. ELISA-Messung von IL-6 und IL-8 nach 24 h Stimulation mit TNFR2-Mutein	66
Abb.35. Expressionsmuster der MnSOD durch Stimulation mit TNFR2-Mutein	67
Abb.36. Expression der MnSOD nach Stimulation mit sTNF	67

Abb.37. Aktivität der PPR nach 6 h Stimulation	68
Abb.38. Aktivität des TNFRE nach 6 h Stimulation	68
Abb.39. Co-Immunpräzipitation von TNFR2 und endogenem TRAF2	69
Abb.40. Kolokalisation von TNFR2 und EGFP-TRAF2	71

Tabellenverzeichnis

Tab.1. Vergleich zwischen TNFR1 und TNFR2	11
Tab.2. Parameter für die Isolierung von genomischer DNA	22
Tab.3. Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription	24
Tab.4. Zusammensetzung des RT- PCR-Reaktionsansatzes	25
Tab.5. Klonierungs-PCR mit Platinum® <i>Taq</i> High Fidelity	26
Tab.6. Zusammensetzung eines Verdauens von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
Tab.7. Zusammensetzung eines Ligationsansatzes	28
Tab.8. Primerdesign für die ortsgerichtete Mutagenese	30
Tab.9. Reaktionsansatz für die Mutagenese	30
Tab.10. Zusammenfassung der durch Klonierung hergestellten Konstrukte	33
Tab.11. Zusammensetzung der verschiedenen Transfektionsansätze	35
Tab.12. Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels	39

1 EINLEITUNG

1.1 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie und ihre Liganden

Die Gruppe der Tumornekrosefaktor- (TNF)-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) (Locksley et al., 2001) umfasst im humanen Organismus eine Gruppe aus 29 transmembranen Proteinen, die 19 Liganden aus der korrespondierenden TNF-Superfamilie (TNFSF) binden können (Armitage, 1994; Smith et al., 1994). Dieses Liganden-Rezeptor-System ist involviert in unterschiedlichste physiologische Prozesse wie Immunabwehr, Entzündungsmodulation und Organogenese sowie in pathophysiologische Prozesse wie septischen Schock, Kanzerogenese und Autoimmunerkrankungen (Aggarwal, 2003). Es kann je nach zellulärem und physiologischem Kontext entweder Proliferation und das Überleben von Zellen, aber auch der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert werden. Die Kontrolle von Pathogen-reaktiven Zellen des Immunsystems scheint hierbei eine Hauptfunktion des TNFSF/TNFRSF-Systems zu sein (Locksley et al., 2001; MacEwan, 2002).

Die Mitglieder der TNFRSF sind charakterisiert durch das Vorhandensein von ein bis sechs Cysteinreichen Domänen (*cysteine-rich domains*, CRD) in ihrem extrazellulären Teil, die typischerweise jeweils drei Cystein-Brücken ausbilden und strukturell für die Bindungseigenschaften des jeweiligen Rezeptors ausschlaggebend sind (Naismith and Sprang, 1998). Im Gegensatz hierzu zeigen die intrazellulären Domänen weit weniger Sequenzhomologie (s.u.)

Die generelle Funktionsweise der TNF-Rezeptoren und ihrer Liganden ist in Abb. 1 dargestellt: TNFSF-Liganden werden (von zwei Ausnahmen abgesehen) als transmembrane Proteine vom Typ II synthetisiert und bilden in der Zellmembran Homotrimere durch nicht-kovalente Bindungen. Die extrazellulären Domänen der biologisch aktiven Trimere werden durch Enzyme der Metalloproteasen-Klasse proteolytisch abgespalten und gelangen so als lösliche Liganden in den extrazellulären Raum. Die Ligandentrimere führen entweder zu einer Trimerisierung der Rezeptormonomere auf der Zielzelle oder zu einer Konformationsänderung vorgeformter Rezeptor-Homotrimere (wie im Fall von TNFR1 und TNFR2), was auf der intrazellulären Seite der Zielzelle über die Assoziation von Adaptor-Proteinen (s.u.) zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führt.

Nach Bindung des Liganden wird der Rezeptor entweder internalisiert und degradiert oder die extrazelluläre Rezeptor-Domäne wird durch Proteolyse abgespalten. Dieser Prozess, der zur Ausbildung von löslichen Liganden-Rezeptortrimeren und so zu einer physiologischen Inaktivierung des Liganden führen kann, wird als „*shedding*“ bezeichnet.

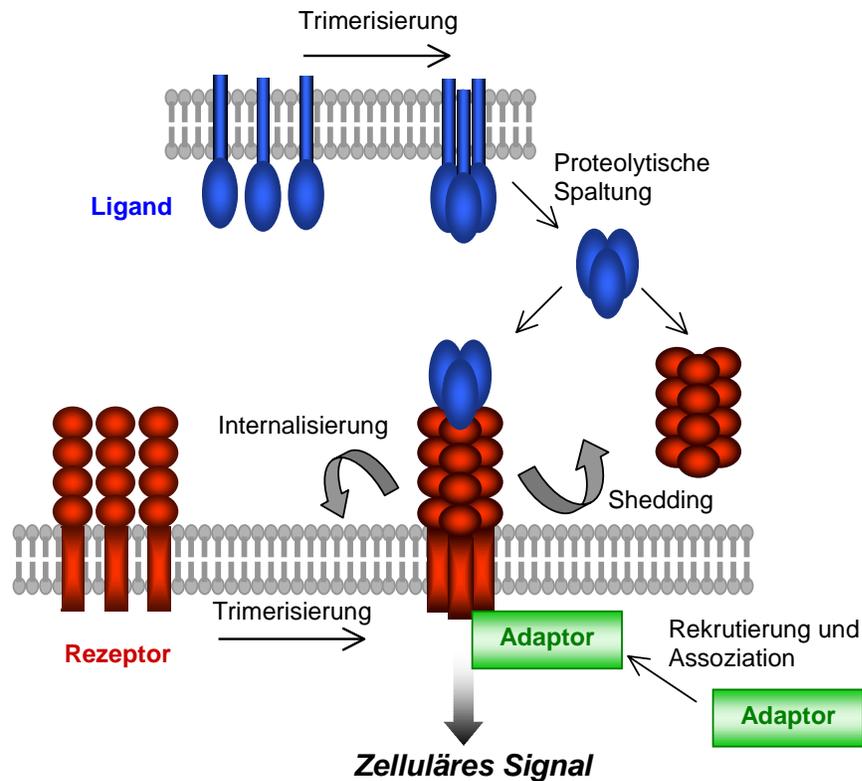


Abb. 1. Molekulare Mechanismen innerhalb der TNFRSF. Ligandentrimere bewirken eine Konformationsänderung der Rezeptoren, rekrutierte Adaptoren vermitteln das biochemische Signal. Die hypothetische Trimerstruktur der Adaptorproteine ist hier nicht dargestellt.

Die Genfamilie der TNFRSF lässt sich aufgrund des Aufbaus ihrer intrazellulären Domäne in drei Untergruppen gliedern: Die Gruppe der Todesrezeptoren (*death receptors*), zu denen u.a. TNFR1, Fas/CD95/Apo1 und die TRAIL-Rezeptoren TRAILR1/DR4 und TRAILR2/DR5 gehören, besitzen eine 60-80 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne, die sog. Todesdomäne (*death domain*, DD, (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993a)). Diese Struktur kann durch homophile Interaktion mit anderen zytosolischen DD-Proteinen (z.B. TRADD, FADD und RIP) direkt die proteolytische Caspasen-Kaskade aktivieren und so die Ausführung des programmierten Zelltods (Apoptose) initiieren.

Die Untergruppe der *Non-DD*-Rezeptoren, zu denen neben TNFR2 auch CD30, CD40, RANK, OX-40 u.a. gehören, besitzt keine Todesdomäne und kann deshalb in den meisten Fällen die Apoptosemaschinerie nicht direkt aktivieren. Allerdings kann durch Induktion von endogenen Todesliganden wie TRAIL, TNF α oder FasL indirekt Apoptose ausgelöst werden (Grell et al., 1999; Vercammen et al., 1995).

Wegen des völligen Fehlens einer intrazellulären Domäne ist die Gruppe der Decoy-Rezeptoren (TRAIL-R3/DCR1, TRAIL-R4/DCR2, DCR3, OPG) nicht zu direkter Signalgebung fähig und moduliert das Gesamtsignalgeschehen wahrscheinlich durch Konkurrenz mit den anderen Rezeptortypen um die gemeinsamen Liganden.

Da kein Mitglied der TNFRSF eine endogene Enzymaktivität besitzt, erfolgt die Vermittlung der Signaltransduktion (ausser im Fall der Decoy-Rezeptoren) über schrittweise Rekrutierung von Signalproteinen (s.o.). Dies geschieht durch Assoziation der Rezeptoren mit zytosolischen Adaptoren, die

entweder zur TRAF-(*TNF receptor associated factor*) Familie oder zur Gruppe der *Death-Domain*(DD)-Proteine gehören (Bradley and Pober, 2001; Locksley et al., 2001). Die TRAF-Familie umfasst im humanen System sechs Mitglieder (TRAF1-6, s. Abb.3), die durch das Vorhandensein einer C-terminalen TRAF-Domäne gekennzeichnet sind. Diese 150 Aminosäuren umfassende Domäne besitzt einen variablen N-terminalen Bereich (TRAF-N) und einen hochkonservierten C-Terminus (TRAF-C), der für Protein-Protein-Interaktionen mit spezifischen Motiven in TNF-Rezeptoren und für die Ausbildung von homo- und heterophilen Assoziationen zwischen TRAF-Proteinen untereinander essentiell ist. Die Möglichkeit zur Ausbildung von unterschiedlichsten Kombinationen von Heterodimeren bedingt die Vielfalt der TRAF-vermittelten Signalgebung. Ausser der TRAF-Domäne können die TRAFs noch andere Sequenzmotive wie eine RING-Domäne (ausser TRAF1) und mehrere Zinkfinger mit unterschiedlichsten, z.T. noch hypothetischen Aufgaben wie DNA-Bindung, Protein-Protein-Interaktionen und Ubiquitin-Ligase-Funktion (Bradley and Pober, 2001; Lorick et al., 1999) besitzen.

Durch die physische Interaktion zwischen TNFRs und TRAF-Trimeren (McWhirter et al., 1999) werden nachgeschaltete Proteinkinasen aktiviert und so die intrazellulären Signalwege der MAPKs (*mitogen activated protein kinases*, MAPKs) p38MAPK und JNK (*cJun-N-terminal kinase*) und der NF κ B-Signalkaskade aktiviert (Dempsey et al., 2003).

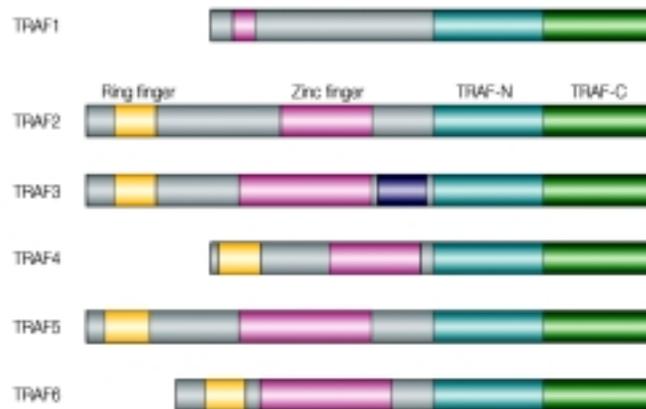


Abb. 2. Die Familie der humanen TRAF-Proteine. Charakteristikum ist die C-terminale TRAF-Domäne, die aus den Subdomänen TRAF-N und TRAF-C aufgebaut ist, und eine variable Anzahl von Zinkfinger-Motiven (aus AGGARWAL, 2003).

1.2 Tumornekrosefaktor α

Tumornekrosefaktor α (TNF α , früher auch TNF oder Cachectin) wurde zum ersten Mal 1985 als ein putativ bakterielles Produkt beschrieben, das Tumorgewebe bei infektiöser Kontamination zur Nekrose und zur Regression bringen konnte (Old, 1985). Erst später wurde erkannt, dass Antigene der kontaminierenden Mikroorganismen, hauptsächlich Lipopolysaccharide (LPS), in den Patienten für die Sezernierung eines körpereigenen Faktors verantwortlich waren, der in unterschiedlichsten Zelltypen, u.a. auch in einigen Tumorzellen, Lyse und Zelltod auslösen kann (Carswell et al., 1975; Fransen et al.,

1986; Granger et al., 1969). Für die erhoffte Verwendung in der Anti-Tumor-Therapie eignet sich TNF α allerdings wegen seiner hohen systemischen Toxizität nicht.

TNF α ist ein pleiotropes Zytokin, das hauptsächlich von aktivierten Monozyten/Makrophagen, aber auch von T-Lymphozyten, Neutrophilen, NK-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet wird (Idriss and Naismith, 2000; Wajant et al., 2003). Diese Zellen synthetisieren das Zytokin nach Stimulation mit Immunmodulatoren wie Interferonen (IFN γ und α/β), Interleukinen (IL-2, GM-CSF) oder LPS. Durch Bindung an zwei verschiedene Rezeptortypen (TNFR1 und TNFR2) vermittelt TNF α unterschiedliche Wirkungen bei der Regulation des Immunsystems und bei pathophysiologischen Prozessen (Aggarwal, 2003; Pfeffer, 2003). Dabei werden je nach zellulärem und physiologischem Zusammenhang entweder Überleben und Aktivierung/Differenzierung von Zellen oder aber programmierter Zelltod, resultierend u.a. in der Eindämmung von inflammatorischen Prozessen, vermittelt. Dieser funktionelle Antagonismus, in derselben Zelle entweder Aktivierung/Überleben oder Tod induzieren zu können, kann innerhalb der TNFSF nur für TNF α und dem verwandten Liganden TRAIL nachgewiesen werden (Wajant et al., 2003). TNF α wirkt im Organismus häufig synergistisch mit Interferonen und anderen Zytokinen und reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die entweder Differenzierung, Proliferation und Überleben der Zielzellen regulieren (z.B. IAPs, SOD, E-Selectin, Kollagenase, TRAFs, MHCII, fos, myc, Bcl-2) oder parakrin die Funktionen des Immunsystems modulieren (Interleukine, Interferone, Chemokine) (Wajant et al., 2003).

Wie auch andere Liganden der TNFSF wird TNF α als transmembranes Protein (membranständiges TNF α , memTNF, 26 kDa) synthetisiert. Die Metalloprotease TACE (*TNF α converting enzyme*) bewirkt durch proteolytische Spaltung die Freisetzung der löslichen Form des Liganden (*soluble TNF*, sTNF, 17 kDa) (Black et al., 1997), wobei sowohl memTNF als auch sTNF als Homotrimer vorliegen und die jeweiligen Rezeptoren aktivieren können (s.u.).

Die von TNF α vermittelte Signalantwort bewirkt in den Zielzellen die Aktivierung von drei Hauptsignalwegen: Über die MAPK p38 und JNK werden entweder proinflammatorische oder proliferationsassoziierte Gene induziert, durch die Aktivierung von Caspasen wird die Induktion des Apoptoseprogramms bewirkt, und über den Transkriptionsfaktor NF κ B werden sowohl antiapoptotische Überlebensgene als auch proinflammatorische Entzündungsgene reguliert (Pfeffer, 2003). Weiterhin können über TNF α andere Signalwege aktiviert werden. So wirkt die Inositol-Triphosphat-Kinase (InsP3K) über Proteinkinase B (PKB/Akt) auf die NF κ B-Aktivierung (Ozes et al., 1999). Über TNFR1 können ausserdem die Signalwege über Phospholipase C (PLC) / Proteinkinase C (PKC) und Sphingomyelinase aktiviert werden (Schutze et al., 1992; Wiegmann et al., 1992). In Endothelzellen wurde die Freisetzung von Arachidonsäure durch TNF α -induzierte Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) nachgewiesen (Clark et al., 1988), und in spezifischen Zelltypen (neutrophilen Granulozyten, Leukozyten, Fibroblasten) wird auch von einer Verbindung zwischen TNF α -Signalgebung und der Aktivierung von G-Proteinen (wie dem Protoonkogen *ras*) berichtet (McLeish et al., 1996; Scherzer et al., 1997; Trent et al., 1996).

TNF α ist essentiell für die Regulation der Immunzellen und eine funktionierende Immunantwort. Ein weiterer Hinweis auf diese entscheidende Bedeutung für Modulation pathophysiologischer Prozesse findet sich in der Tatsache, dass eine Dysregulation des TNF α -Haushalts zu einer Vielzahl von schweren

Erkrankungen führt. So konnte ein Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ bei der Pathogenese von zerebraler Malaria und degenerativen neuronalen Erkrankungen wie Multipler Sklerose (MS) und Morbus Alzheimer nachgewiesen werden (Kassiotis et al., 1999; Perry et al., 2001; Probert et al., 1997; Probert et al., 2000). Weiterhin spielt die $\text{TNF}\alpha$ eine entscheidende Rolle bei Entzündungsgeschehen, insbesondere des Gastrointestinaltraktes (Kollias et al., 1999; Kontoyiannis et al., 1999; Odeh et al., 2001; Schreiber et al., 1999), aber auch bei Septischem Schock, Asthma und Cachexie (Aggarwal, 2003; Holtmann et al., 2002b; Moreland, 2004; Tsuchiya et al., 2002).

Aus diesem Grund sind Therapieansätze, die die biologische Aktivität von $\text{TNF}\alpha$ beeinflussen, in den letzten Jahren zu einem wichtigen Forschungsschwerpunkt der medizinischen Biowissenschaften geworden. Der Einsatz von anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern (z.B. Infliximab IFX), löslichen $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren oder rekombinanten TNFR-Fc-Fusionsproteinen zeigt bei der Behandlung von Rheumatoider Arthritis und CED deutliche Therapieerfolge (Holtmann et al., 2002b; Hyrich et al., 2004; Maini et al., 2000; Moreland, 2004; Papadakis and Targan, 2000; Rutgeerts et al., 2004; Sandborn and Hanauer, 1999; Waetzig et al., 2002).

1.3 Vergleich zwischen TNFR1 und TNFR2

Bei den beiden Rezeptortypen für $\text{TNF}\alpha$ handelt es sich um transmembrane Glykoproteine mit vier Cystein-reichen Domänen (CRD) in ihrem extrazellulären Bereich (Banner et al., 1993; Brockhaus et al., 1990; Hsu and Chao, 1993; Naismith and Sprang, 1998; Pennica et al., 1993). Diese CRDs sind für die Ausbildung der Liganden-Bindungstasche (CRD1-3) und für die Interaktion der Monomere im Homotrimerkomplex (CRD4) verantwortlich. Beide Rezeptoren können sowohl $\text{TNF}\alpha$ als auch einen anderen Liganden der TNFSF, Lymphotoxin (LT) $\alpha = \text{TNF}\beta$, binden und zeigen eine Homologie von 28% in ihrer Aminosäuresequenz. Dabei sind die homologen Bereiche auf den extrazellulären Teil der Proteine, hauptsächlich die Region der CRDs, beschränkt, während der intrazelluläre Bereich keinerlei Ähnlichkeiten aufweist (MacEwan, 2002). Als Besonderheit innerhalb der TNF-Rezeptor-Superfamilie besitzen beide Rezeptoren eine zusätzliche extrazelluläre Domäne, die für die Liganden-unabhängige Ausbildung von Rezeptor-Trimeren verantwortlich ist. Diese sog. PLAD (*pre-ligand-binding assembly domain*) umfasst den N-Terminus und Teile der CRD1. Sie ist funktionell von der Liganden-Bindungsdomäne getrennt und bewirkt die Assemblierung von Rezeptorkomplexen, die bei Ligandenbindung ihre Konformation verändern (Chan et al., 2000).

Die beiden Rezeptoren für $\text{TNF}\alpha$ unterscheiden sich tiefgreifend in ihrem Expressionsmuster, ihren physikalischen Bindungseigenschaften, nachgeschalteten Signalwegen und physiologischer Bedeutung (s. Übersicht in Tab. 1). TNFR1 wird konstitutiv von fast allen Körperzellen exprimiert und stellt den hochaffinen Rezeptor für lösliches $\text{TNF}\alpha$ dar (Grell et al., 1995; Grell et al., 1993; Schulze-Osthoff et al., 1998), während TNFR2 induzierbar hauptsächlich von Zellen des Immunsystems und vom Endothel exprimiert wird (Aggarwal, 2003). Während membrangebundenes memTNF der Hauptligand für TNFR2 zu sein scheint (Grell et al., 1995), bindet TNFR2 den lösliche Liganden sTNF nur transient mit einer

deutlich niedrigeren Affinität und einer sehr kurzen Halbwertszeit ($T_{1/2}$) des Liganden-Rezeptor-Komplexes (Krippner-Heidenreich et al., 2002). Da TNFR1 in gleicher Weise durch sTNF und memTNF aktivierbar ist, TNFR2 allerdings hauptsächlich auf memTNF reagiert, kann man annehmen, dass einige der Hauptwirkungen des TNF/TNFR-Komplexes im Immunsystem eher von memTNF durch direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Immunzellen als durch sTNF hervorgerufen werden (MacEwan, 2002). Im Kontext von sTNF vermag TNFR2 allerdings durch seine transienten Bindungseigenschaften und schnelle Assoziations-/Dissoziations-Kinetiken die lokale Konzentration an sTNF in unmittelbarer Umgebung der Zelle deutlich zu erhöhen und so für TNFR1 den Zugang zu seinem Liganden zu erleichtern. Dieser Prozess des „*ligand passings*“ (Tartaglia et al., 1993a) weist auf eine modulierende Funktion von TNFR2 für TNF α -vermittelte Signalwege hin.

Ein tiefgreifender Unterschied der beiden Rezeptortypen liegt in der Fähigkeit, die apoptotische Caspasen-Kaskade direkt zu aktivieren. TNFR1 besitzt eine Todesdomäne (DD) in seinem carboxyterminalen Abschnitt und gehört deshalb zur Untergruppe der Todesrezeptoren, die durch die Fähigkeit zur Caspasenrekrutierung gekennzeichnet sind (Boldin et al., 1995). TNFR2 beinhaltet keine DD, kann allerdings in einigen Zelltypen durch die Induktion von endogenem TNF α das Apoptoseprogramm indirekt über TNFR1 initiieren (Aggarwal, 2003). Dies ist beispielsweise für die Rhabdomyosarkomzelllinie KYM-1 (Grell et al.) und murine Fibrosarkomzellen (Vercammen et al.) gezeigt worden.

Durch den Einsatz von Rezeptortyp-spezifischen Stimuli (s.u.) konnte in Zellen, die beide Typen von TNF α -Rezeptoren exprimieren, der Mechanismus des sog. „*receptor crosstalk*“ (Wajant et al.), (Fotin-Mleczek et al., 2002) aufgedeckt werden. Dieses Phänomen beschreibt die Verstärkung des TNFR1-vermittelten Todessignals durch Vorstimulation von TNFR2. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind hierbei noch nicht vollständig geklärt, in neuesten Arbeiten wird allerdings die Rekrutierung und IAP-vermittelte Degradation von TRAF2 nach TNFR2-Stimulation als Bestandteil des „*receptor crosstalks*“ diskutiert (Li et al., 2002).

1.3.1 Signaltransduktion durch TNFR1

Da TNFR1 wegen des Besitzes einer DD zu der Untergruppe der Todesrezeptoren gehört, ist die Aktivierung der Caspasen-Kaskade nach Bindung des Liganden sTNF oder memTNF einer der optionalen Signalwege.

Wie Abb. 4 in schematischer Weise darstellt, laufen in derselben Zelle mehrere Ereignisse parallel ab.

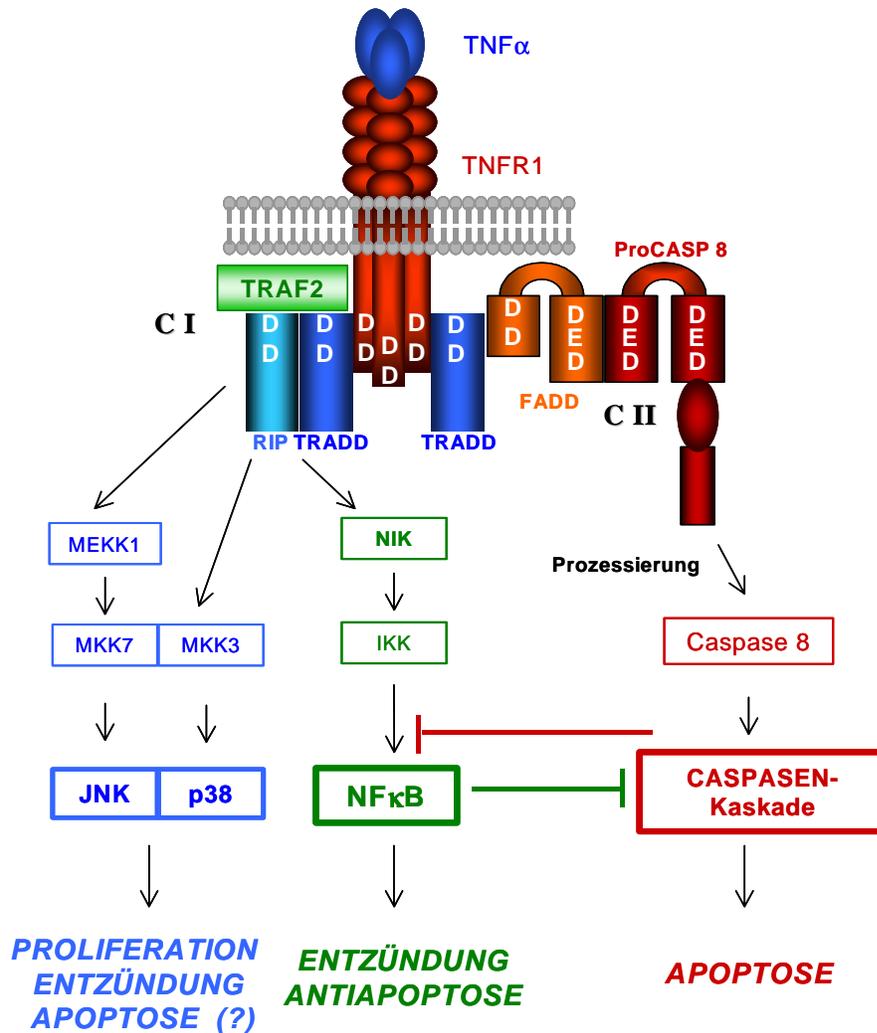


Abb. 3. Hauptsignalwege über TNFR1. Die MAPK-Kaskade ist *blau* dargestellt, der NF κ B-Signalweg *grün* und die Caspasen-Kaskade *rot*. Die letzteren beiden Signalwege können sich auf unterschiedlichen Ebenen gegenseitig inhibieren (dargestellt durch Blockpfeile). DD = *Death Domain*, DED = *Death Effector Domain*, C I markiert den antiapoptotischen Komplex I, C II den proapoptotischen DISC (*death-inducing signalling complex*). Nähere Erläuterungen im Text.

Über homophile Assoziation der beiden *death domains* (DD) bindet das Adaptorprotein TRADD (*TNF receptor-associated death domain protein*) an den zytosolischen Teil des TNFR1-Trimers und rekrutiert die DD-haltige Ser/Thr-Kinase RIP1 (*receptor-interactin protein 1*). TRAF2 komplettiert diesen Signalkomplex und ermöglicht die Aktivierung zweier Hauptsignalwege:

- (i) MAPK-Kaskade (*blau* in Abb. 3): Über MEKK1 (*MAP/ERK kinase kinase 1*) und MKK7 (*MAPK kinase 7*) werden JNKs aktiviert, während MKK3 die MAPK p38 aktiviert. MAPK-Aktivierung kann je nach zellulärem und physiologischem Kontext zur Initiierung von Proliferation, Entzündung oder proapoptotischer Genexpression führen.
- (ii) NF κ B-Signalweg (*grün*): Durch Vermittlung der Ser-Kinase NIK (*NF κ B-inducing kinase*) wird das IKK (*I κ B kinase*)-Signalosom aktiviert, was letztendlich für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B verantwortlich ist (Details: s.1.4).

Der dritte TNFR1-vermittelte Hauptsignalweg beruht auf der TRADD-vermittelten Assoziation des sogenannten Todes-induzierenden Komplexes DISC (*death inducing signalling complex*), der das physische Bindeglied zwischen TNFR1 und dem proapoptotischen Signalweg der Caspasen darstellt:

- (iii) Caspasen-Kaskade (rot in Abb. 3): Der Adaptor TRADD rekrutiert über seine DD das DD-Protein FADD (*Fas-associated death domain protein*), welches wiederum durch homophile Interaktion über seine DED (*death effector domain*) die inaktive Procaspase 8 bindet (Boldin et al., 1995; Tsukumo and Yonehara, 1999) (Medema et al., 1997). Durch den daraufhin induzierten Prozess der Autoprozessierung (*induced proximity model*) wird Caspase 8 proteolytisch von seiner Autoinhibition gelöst und katalysiert die Aktivierung von nachgeschalteten Caspasen, was zur Aktivierung von nachgeschalteten Effektor-Caspasen (Caspase 3/6/7) und zur Ausführung des Apoptoseprogramms führt.

Während die bisherige Modellvorstellung eine Zusammensetzung der TNFR1-DISC aus TNFR1/TRADD/FADD/Procaspase-8 postulierte, deuten neuere Arbeiten beruhend auf Co-Immunitäzitationen darauf hin, dass sich nach Bindung des Liganden hintereinander zwei verschiedene Multiproteinkomplexe formen: Komplex I (C I: TNFR1/TRADD/RIP1/TRAF2) ermöglicht die Aktivierung von MAPK und NF κ B, danach dissoziiert TRADD von diesem Komplex und bildet einen zytosolische Komplex II (C II: TRADD/FADD/Procaspase 8), der die Caspasen-Kaskade aktiviert (Harper et al., 2003) (Micheau and Tschopp, 2003).

Die biologische Wirkung der TNFR1-vermittelten Signalwege auf der zellulären Ebene hängt vom Gleichgewicht der unterschiedlichen miteinander konkurrierenden Signalwege ab. Die NF κ B-vermittelte Genexpression vermag das angeworfene Apoptoseprogramm auf verschiedenen Ebenen zu inhibieren (s.u.), während einige Elemente des antiapoptotischen Weges selbst Substrate für Caspasen sind (z.B. RIP, IKK β , p65NF κ B) und durch proteolytische Spaltung deaktiviert werden können. Das Nettoergebnis, das sowohl (a) Proliferation/Differenzierung als auch (b) Überleben/Entzündung oder (c) Apoptose bedeuten kann, wird entscheidend durch die kinetische und stöchiometrische Abfolge der einzelnen Teilschritte der Signalgebung beeinflusst.

1.3.2 Signaltransduktion durch TNFR2

TNFR2 gehört zur Gruppe der *non-DD*-Rezeptoren innerhalb der TNFRSF und ist deshalb in den meisten Zelltypen nicht in der Lage, die apoptotische Caspasen-Kaskade direkt zu aktivieren. Das Hauptadaptorprotein des TNFR2 ist TRAF2, das sowohl für die Aktivierung des NF κ B-Signalweges als auch für die Initiierung der JNK-Kaskade verantwortlich zu sein scheint (Haridas et al., 1998; Helms et al., 2001; Jupp et al., 2001; Reinhard et al., 1997).

Durch Bindung des Liganden erfolgt eine Konformationsänderung der vorgeformten TNFR2-Trimere, die zur Rekrutierung und Trimerisierung von zytosolischen TRAF2-Monomeren führt. Es existieren Hinweise darauf, dass TRAF2 die Proteinkinase NIK aktiviert, was zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalweges führt (s.u.).

Als alternativer Weg kann in derselben Zelle über TRAF2 die MAPK-Kaskade der JNKs aktiviert werden. TRAF2 aktiviert die vorgeschaltete MAP3K MEKK1, die wiederum über MKK7, eine MAP2K, JNK-Aktivierung bewirkt (Reinhard et al., 1997; Tournier et al., 1997). Die Proteinkinase JNK phosphoryliert ihr Hauptsubstrat, das Protein cJun, welches eine strukturelle Komponente des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 (*activator protein-1*) darstellt. Nach Heterodimersierung von cJun mit einem Protein der cFos- oder der ATF2-Familie findet eine Translokation des AP-1-Komplexes in den Kern statt, wonach durch Bindung an regulatorische DNA-Sequenzen die Expression AP-1-abhängiger Gene reguliert wird (Aggarwal, 2003; Minden and Karin, 1997; Vogt, 2001).

Als weitere Komponenten des TNFR2-Signalkomplexes werden die zytosolischen Apoptose-Inhibitoren IAP1 und IAP2 (= cIAP1 bzw. cIAP2, *cytosolic inhibitors of apoptosis*) beschrieben, die über ihre E3-Ligase-Aktivität an der Ubiquitinierung von TRAF2 beteiligt zu sein scheinen. Diese Modifikation scheint einerseits für das weitere Signalgeschehen essentiell zu sein, andererseits führt sie zur proteasomalen Degradation von TRAF2 und bewirkt so eine negative Regulation der TNFR2-induzierten Signalgebung (Duckett and Thompson, 1997; Li et al., 2002; Rothe et al., 1995). Die biologischen Konsequenzen dieser IAP-vermittelten TRAF-Degradation sind noch weitgehend ungeklärt. Einige Arbeiten berichten von der zusätzlichen Möglichkeit einer Bindung von TRAF1 an TNFR2 über TRAF2 als Brückenprotein, wobei TRAF1 eine negativ regulierende Wirkung auf die TNFR2-Signalgebung zugeschrieben wird (Rothe et al., 1994; Speiser et al., 1997).

Für T-Lymphocyten, die durch Antigenkontakt aktiviert sind, konnte eine indirekte TRAF2-vermittelte Assoziation von TNFR2 mit der DD-haltigen Proteinkinase RIP1 nachgewiesen werden (Pimentel-Muinos and Seed, 1999). Diese Interaktion bewirkt eine Rekrutierung und Aktivierung von apikalen Caspasen durch Interaktion von TNFR2 / TRAF2 / RIP1 mit FADD und Procaspase-8 und dadurch eine direkte Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Bei diesem Fall der Apoptose von aktivierten Immunzellen handelt es sich um einen physiologischen Mechanismus, mit dem die adaptive Immunantwort durch gerichtetes Ausschalten der klonal expandierten Lymphozyten-Populationen reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau des Adaptorproteins RIP1, das durch die Antigen-vermittelte Aktivierung erhöht wird, eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung dieses Prozesses innehat.

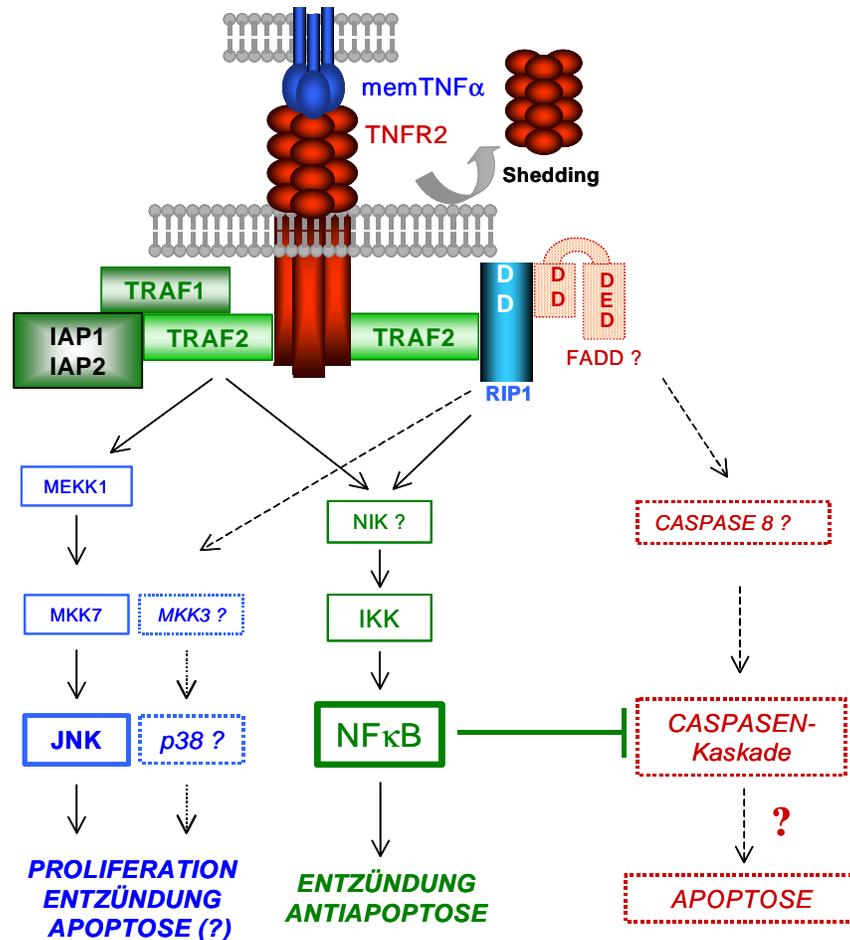


Abb. 4. Signaltransduktionswege über TNFR2. Die MAPK-Kaskade ist *blau* dargestellt, der NFκB-Signalweg *grün*. Die Aktivierung der Caspasen-Kaskade (*hellrot*) über RIP1/FADD und der MAPK p38 (*hellblau*) ist zelltypspezifisch (aktivierte T-Zellen) oder nicht gesichert. Der NFκB-Signalweg kann Caspasen-Aktivierung inhibieren (dargestellt durch Blockpfeile). TRAF1 und IAPs sind NFκB-abhängige antiapoptotische Faktoren, die an der TNFR2-Signalgebung beteiligt sein können.

Wie molekularbiologische Forschungsergebnisse und die Erfahrungen aus *knock-out*-Maus-Modellen zeigen, werden die meisten der bekannten Wirkungen von TNFα über TNFR1 vermittelt. Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass dem TNFR2 eine wichtige Rolle bei spezifischen zellulären Prozessen, insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen zukommt. So ist TNFR2 auf T-Zellen der Lamina propria von Morbus-Crohn-Patienten hochreguliert (Holtmann et al., 2002a), spielt eine Rolle bei der Pathogenese von HIV-Infektion (Butera et al., 1996; Nokta et al., 1997) und ist in antivirale Prozesse und die Induktion von Nekrose involviert (Chan et al., 2003). Weiterhin ist TNFR2 beteiligt an wichtigen Prozessen der Angiogenese und bei bakterieller Infektion (Pan et al., 2002) (Beck and Meyer, 2000). Genetische Assoziationsstudien zeigen zudem eine Relevanz der TNFR2-vermittelten Signalwege *in vivo*, weshalb eine genauere Untersuchung der Risikovarianten sinnvoll erscheint.

Zusammenfassung des Vergleichs zwischen TNFR1 und TNFR2:

Merkmal	TNFR1 (Acc.No. NM001065)	TNFR2 (Acc.No. NM001066)
Synonyme	p60/p55, TNFRSF1A, CD120a	p80/p75, TNFRSF1B, CD120b
Expression	konstitutiv von fast allen Körperzellen (Ausnahme: Erythrozyten)	nach Stimulation mit Interleukinen von Immunzellen und Endothelzellen
Rezeptordichte pro Zelle	< 3.000, konstant	5.000 – 15.000, fein regulierbar
Kd (37°C)	20 pM	300 pM
T _{1/2} für Ligand-Rezeptor	33 min	< 2 min
Todesdomäne DD	Ja	Nein
Affinität zu sTNF	+++	+
Affinität zu memTNF	++	++
Caspasenaktivierung	Ja	Nein (Ja über RIP1 / FADD ?)
MAPK-Aktivierung	JNK, p38	JNK (p38 ?)
NFκB-Aktivierung	Ja	Ja
Prozessierung nach Ligandenbindung	Internalisierung, (<i>shedding</i>) → Inhibition der Langzeitwirkung	<i>shedding</i> durch die Metalloprotease TACE → Neutralisierung von sTNF
Assoziierte TRAFs	TRAF2 über TRADD, (TRAF1 ?)	TRAF2 direkt, (TRAF1 über TRAF2)
Mit Rezeptor- <i>knock-out</i> oder Fehlfunktion gekoppelte Erkrankungen	Septischer Schock, tödliche Infektionen, Fehlentwicklung der Lymphorgane, Diabetes mellitus, Arthritis, periodische Fieberschübe, verstärkte Entzündungen, Autoimmunität	erhöhte Sensitivität für bakterielle Pathogene, verminderte Aktivierungsinduzierte T-Zell-Apoptose, mikrovaskuläre Endothelschäden, virale Infektionen, SLE, RA
nachgewiesene Aufgaben im Organismus	Proliferation, Differenzierung, Entzündungsmodulation, Apoptose	Erhöhung der TNFα-Sensitivität durch <i>ligand passing</i> , Neutralisierung durch <i>shedding</i> , Proliferation von Lymphozyten, Apoptose aktivierter T-Effektorzellen

Tab. 1. Vergleich zwischen TNFR1 und TNFR2.

1.4 Der NF κ B-Signalweg

Der NF κ B-Signalweg reguliert zentral die Reaktionen des Organismus auf unterschiedlichste Stressbedingungen und integriert die Signale zu einem physiologischen Ergebnis, das für die Einzelzelle Tod oder Überleben und für den Organismus Homöostase, lokale Entzündung aber auch Erkrankung bewirken kann.

Die Rel/NF κ B-Familie von Transkriptionsfaktoren umfasst bei Wirbeltieren fünf Mitglieder, RelA/p65, RelB, cRel, NF κ B1/p105/p50 und NF κ B2/p100/p52, die evolutionär stark konserviert sind und bis hin zu *Drosophila* Homologe zeigen (z.B. Relish, Dorsal). Das gemeinsame Charakteristikum dieser Genfamilie ist die N-terminale RH-(*Rel-homology*) Domäne (Hoffmann et al., 1999), die für DNA-Bindung, homophile Dimerisierung und die Interaktion mit Proteinen der Inhibitorenklasse I κ B (*inhibitor of NF κ B*, *Drosophila*-Homolog: Cactus) verantwortlich ist (Karin, 1999; Karin and Ben-Neriah, 2000).

Der Name dieser Proteinfamilie (*nuclear factor κ B*) geht zurück auf den Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die Genregulation der κ -Kette von Immunglobulinen in B-Lymphozyten und wurde ursprünglich für das prototypische p50/p65 Heterodimer verwendet (Sen and Baltimore, 1986a, b). Die Wichtigkeit der gesamten Genfamilie wird deutlich durch die Beobachtungen der letzten Jahre, dass eine Dysregulation des NF κ B-Signalweges an pathologischen Störungen von Hautentzündung über Diabetes mellitus bis hin zu Krebs beteiligt ist (Ben-Neriah and Schmitz, 2004).

Bezüglich des strukturellen Aufbaus ihrer C-terminalen Domäne und der daraus resultierenden mechanistischen Konsequenzen kann man die NF κ B-Familie in zwei Gruppen untergliedern: Die erste Gruppe umfasst NF κ B1 und NF κ B2 (und *Drosophila*-Relish), deren C-Terminus eine Domäne aus repetitiven Sequenzen beinhaltet, die für eine Autoinhibition der Proteinfunktion verantwortlich ist. Die Mitglieder dieser Gruppe wirken *per se* nicht als Transkriptionsaktivatoren, sondern nur in Form eines Heterodimers mit Faktoren der zweiten Gruppe. Zu dieser gehören RelA/p65, RelB und c-Rel (sowie Dorsal und DIF von *Drosophila*). Sie sind gekennzeichnet durch ihre C-terminale Aktivierungsdomäne, die ihre Funktionalität als Transkriptionsfaktoren bedingt (Baeuerle and Henkel, 1994; Siebenlist et al., 1994).

Beide NF κ B-Gruppen sind zur Bildung von Homo- und Heterodimeren fähig, die im Organismus ubiquitär exprimiert werden und als inaktiver zytosolischer Proteinkomplex, gebunden an Inhibitorproteine der I κ B-Klasse, vorliegen. Die I κ B-Proteine maskieren die nukleäre Lokalisationssequenz und die DNA-Bindungsdomäne des NF κ B-Komplexes und sind so massgeblich an der negativen Regulation des Signalgeschehens beteiligt (Baeuerle and Baltimore, 1996; Chen et al., 1998; Ghosh et al., 1995).

Zu den unterschiedlichen Aktivatoren des NF κ B-Signalweges gehören neben Zytokinen wie TNF α und IL-1 β vor allem allgemeine Stressfaktoren (Pathogenbefall durch Bakterien und Viren, UV-Strahlung, oxidativer Stress, Chemikalien) (Li and Stark, 2002). Während die Rezeptoren für TNFSF-Liganden und für IL-1 β Peptidliganden erkennen, dienen die Proteine der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und der NOD-Familie der zellulären Signalantwort auf molekulare Bestandteile von Bakterien und Viren. TLRs reagieren auf Bestandteile der Bakterienzellwand, doppelsträngige RNA oder unmethylierte prokaryontische DNA in der nahen Umgebung der Zelle (Beutler, 2004; Pasare and Medzhitov, 2003),

wohingegen die NOD-Proteine intrazelluläre Sensoren für Pathogenbefall darstellen (Girardin et al., 2003; Inohara and Nunez, 2003).

Von diesen vier Rezeptorklassen wird gemäss des klassischen NF κ B-Signalweges das IKK-(I κ B-Kinase) Signalosom aktiviert (Pahl, 1999). Dieser Proteinkomplex stellt eine Serin-Kinase aus drei monomeren Untereinheiten dar: IKK α und IKK β besitzen beide eine Kinaseaktivität, IKK γ = NEMO (*NF κ B essential modulator*) ist eine regulatorische Untereinheit, die für die Interaktion mit vorgeschalteten Kinasen verantwortlich ist (DiDonato et al., 1997; Yamaoka et al., 1998). Als *upstream*-Aktivatoren von IKK konnten bisher mehrere Proteinkinasen, darunter die MAP3-Kinasen MEKK1, MEKK2 und MEKK3 sowie TAK1 und NIK identifiziert werden. Im Kontext der TNF α -Signalgebung scheinen dabei NIK und MEKK3 die wichtigste Rolle zu spielen (Xiao et al., 2001; Yang et al., 2001).

In folgender Abbildung sind die verschiedenen Ebenen der Aktivierung von NF κ B am Beispiel des p50/p65-Heterodimers dargestellt.

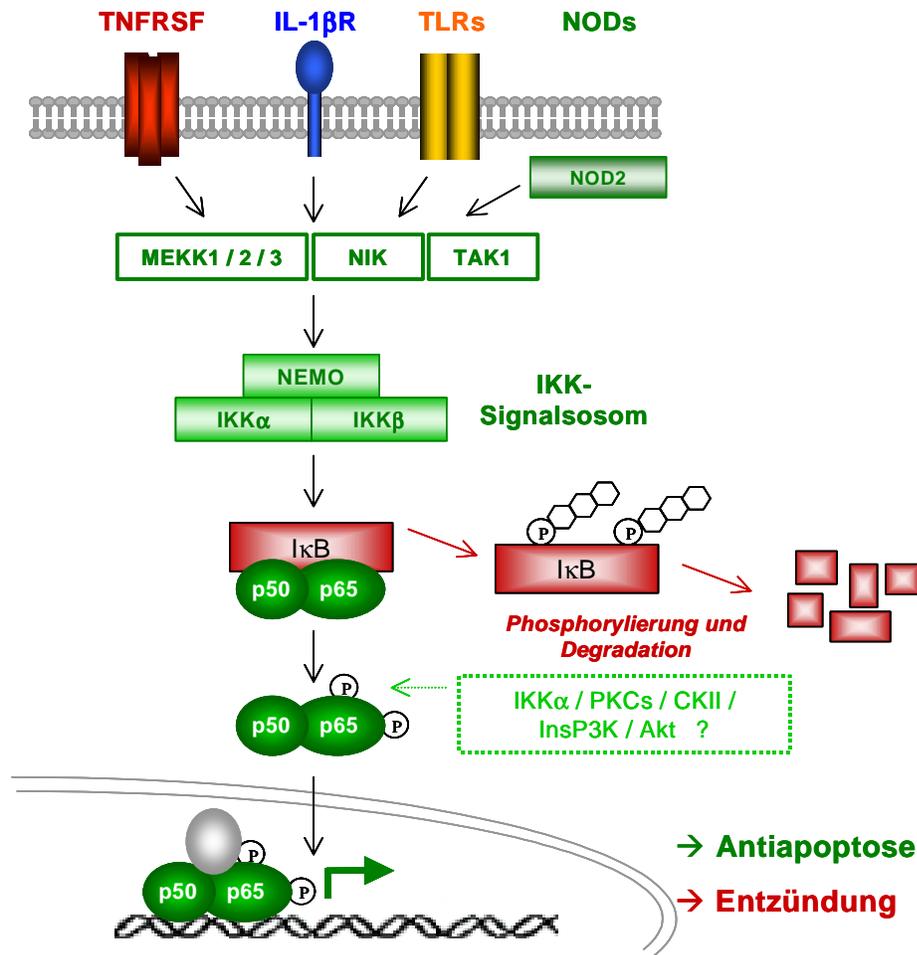


Abb. 5. Der klassische NF κ B-Signalweg. Nach Aktivierung des IKK-Signalosoms wird I κ B phosphoryliert, ubiquitiniert und über Proteasomen abgebaut. Dies führt zur Freisetzung von NF κ B (p50/p65), wobei die p65-Untereinheit durch verschiedene Proteinkinasen modifiziert werden kann. Nach Translokation in den Kern und Assoziation mit Co-Aktivatoren wird die Genexpression initiiert.

Nach Aktivierung phosphoryliert IKK zwei konservierte Serin-Reste von I κ B, was zu dessen Ubiquitinierung und zum Abbau über das Proteasom führt. Durch die Dissoziation von I κ B wird das nukleäre Lokalisationssignal von NF κ B (p50/p65) freigelegt, und es erfolgt eine Translokation in den Kern, wo nach Bindung an spezifische Konsensus-Sequenzen auf der DNA eine Aktivierung der Genexpression erfolgen kann (Karin and Ben-Neriah, 2000; Mercurio and Manning, 1999a, b; Read et al., 2000). Ein zweiter Level der NF κ B-Transkriptionskontrolle besteht in der Möglichkeit der Phosphorylierung von p65/RelA selbst und in der Interaktion mit Coaktivatoren wie CBP/p300. Über die Notwendigkeit und die Regulation dieses Vorgangs ist bisher relativ wenig bekannt, es wurden unterschiedlichste Kinasen, darunter IKK α selbst, p38MAPK, Proteinkinase ζ (PKC ζ), Caseinkinase II (CK II), Inositol-3-Phosphat-Kinase (InsP3K) und Akt als mögliche Kontrollelemente mit spezifischer Aktivität für einzelne Phosphorylierungsstellen von p65/RelA beschrieben (Bird et al., 1997; Madrid et al., 2001; Silverman and Maniatis, 2001; Sizemore et al., 1999; Vanden Berghe et al., 1998; Wang and Baldwin, 1998; Wang and Richmond, 2001; Zhong et al., 1998).

Die Aktivierung des NF κ B-Signalweges kann auf zellulärer und physiologischer Ebene verschiedene Auswirkungen haben, die allgemeine Stressantworten, die Regulation des Immunsystems und die Feinjustierung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen betreffen. Die unterschiedlichen Auswirkungen der NF κ B-Aktivierung lassen sich im wesentlichen auf zwei Hauptfunktionen der regulierten Gene zurückführen:

- (i) Proinflammatorische Gene: Von den über 200 identifizierten NF κ B-abhängigen Genen spielt ein beträchtlicher Anteil eine Rolle bei der Modulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort (Li and Stark, 2002). Hierzu zählt vor allem die Kontrolle der Expression unterschiedlicher Immunmodulatoren (Interleukine wie IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF; Chemokine, Mediatoren) und ihrer Rezeptoren, wichtiger Enzyme (iNOS, MMP-9, COX-2) und Adhäsionsmoleküle (E-Selektine) (Pahl, 1999). Mausmodelle für genetischen *knock-out* NF κ B-assoziiierter Gene deuten auf die entscheidende Rolle dieses Signalweges für die erfolgreiche Pathogenabwehr und die konzertierte Regulation des lokalen Entzündungsgeschehens hin (Ben-Neriah and Schmitz, 2004; Gerondakis et al., 1999).
- (ii) Antiapoptotische Gene: Die Expression NF κ B-abhängiger Gene spielt eine wichtige Rolle als molekularer Antagonist des physiologischen Zelltods: Eine effektive Aktivierung des NF κ B-Signalweges kann die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose verhindern. Die wichtigsten Beispiele NF κ B-abhängiger antiapoptotischer Proteine im Zusammenhang mit TNF α sind FLIP_L, TRAF1, A20, MnSOD und Mitglieder der IAP- und der Bcl2-Genfamilien (Chawla-Sarkar et al., 2004; Dempsey et al., 2003; Li et al., 1998; Micheau et al., 2001; Roy et al., 1997). Im folgenden sollen die antiapoptotischen Wirkungen dieser Proteine kurz aufgezeigt werden:
 - FLIP_L ist ein Caspase 8 -Analog mit einer Caspase-homologen Domäne ohne Enzymaktivität; es wirkt deshalb als dominant-negativer Inhibitor der apikalen Initiatorcaspase (Kreuz et al., 2001).
 - A20 ist ein Zinkfingerprotein, dass an der negativen *feedback*-Suppression des NF κ B-Signalweges beteiligt ist und in Endothelzellen und T-Lymphozyten

antiinflammatorisch und antiapoptotisch wirkt (Longo et al., 2003) (Malewicz et al., 2003).

- TRAFs sind, wie oben beschrieben, massgeblich an der antiapoptotischen Signalgebung über TNFRs beteiligt (Bradley and Pober, 2001)
- MnSOD ist ein mitochondriales Enzym, das die beim physiologischen Zelltod entstehenden reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) entgiftet (Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001).
- IAPs wirken als antiapoptotische Bestandteile des TNFR2-Signalkomplexes und unterbinden die Aktivität von Effektor-Caspasen wie Caspase 3 und Caspase 7 (Roy et al., 1997; Zou et al., 2004).
- Die Familie der antiapoptotischen Bcl2-Proteine (u.a. Bcl2, BclXL) kontrolliert die Stabilität der mitochondrialen Membran. Mitochondriale Proteine spielen im Laufe der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose als Bestandteil des sog. Apoptosom eine wichtige Rolle bei der Verstärkung des apoptotischen Geschehens (Green and Kroemer, 2004) (Ouyang and Giffard, 2004), weshalb die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität von grosser Bedeutung für die antiapoptotische Homöostase ist.

1.5 Rolle des Met196Arg Polymorphismus im humanen TNFR2

Das Gen *tnfrsf1b*, das für den humanen TNFR2 codiert, liegt auf Chromosom 1p36.2 in einer genetischen Kopplungsregion für die Immunerkrankungen SLE und RA und für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Gaffney et al., 1998; Tsuchiya et al., 2002). Es enthält 10 Exons und 9 Introns, wobei die ersten 22 Aminosäuren ein Signalpeptid für transmembrane Proteine darstellen und die Aminosäuren 258 – 287 die Transmembrandomäne des Rezeptors bilden (Beltinger et al., 1996).

Der biallelische SNP (*single nucleotide polymorphism*) im Exon 6 (RNA-Position T676 → G) des *tnfrsf1b*-Gens bewirkt eine Änderung des Codons für die Aminosäure an Position 196 (ATG → AGG), so dass im TNFR2-Protein ein Methionin durch Arginin ersetzt wird (Met196 → Arg) (Pantelidis et al., 1999). In genetischen Kopplungsstudien an unterschiedlichen Populationen wurden Assoziationen dieses SNPs mit einer grossen Anzahl von Erkrankungen nachgewiesen. So erhöht das Vorliegen des 196Arg-Allels die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung an oder die Schwere von SLE bei Japanern (Komata et al., 1999; Tsuchiya et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002), rheumatoider Arthritis bei Kaukasiern, Japanern, Briten und Südeuropäern (Barton et al., 2001; Dieude et al., 2002; Fabris et al., 2002; Tsuchiya et al., 2002), Hyperandrogenismus und polycystischem Ovarialsyndrom (Peral et al., 2002). Andere Studien berichten, dass das Ergebnis von Knochenmarksverpflanzungen, die Anfälligkeit für chronische Parodontitis, Narkolepsie, Alzheimer's Erkrankung und Colitis ulcerosa mit dem SNP assoziiert sind (Hohjoh et al., 2000; Ishikawa et al., 2002; Perry et al., 2001; Pierik et al., 2004; Shimada et al., 2004).

Die Aminosäure 196 befindet sich im extrazellulären Teil des Rezeptors innerhalb der vierten Cysteinereichen Domäne CRD4 und hat nach computergestützten Konformationsvorhersagen nur einen geringen Einfluss auf die dreidimensionale Struktur des Proteins. Obwohl sich dieser SNP in unmittelbarer Nähe zu

dem Prolinrest Pro211 befindet, der als essentiell für den *shedding*-Prozess beschrieben wurde (Herman and Chernajovsky), scheinen weder die Produktion löslichen Rezeptors noch die physikalischen Bindungsparameter für sTNF von der Substitution beeinflusst zu werden. Allerdings wurde die 196Arg-Variante mit einer erhöhten Sensitivität für TNF α -induzierte Apoptose in Zusammenhang gebracht, wenn auch durch einen bisher ungeklärten Mechanismus (Morita et al.).

Die CRD4 ist funktionell nicht an der Ausbildung der Liganden-Bindungstasche beteiligt, sondern befindet sich am „Schaft“ der extrazellulären Domäne in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kommt dieser Domäne eine Funktion bei der Assemblierung der Rezeptor-Trimere oder der Konformationsänderung nach Ligandenbindung zu, weshalb eine Aminosäuresubstitution in diesem Bereich Auswirkungen auf das nachgeschaltete Signalgeschehen haben könnte.

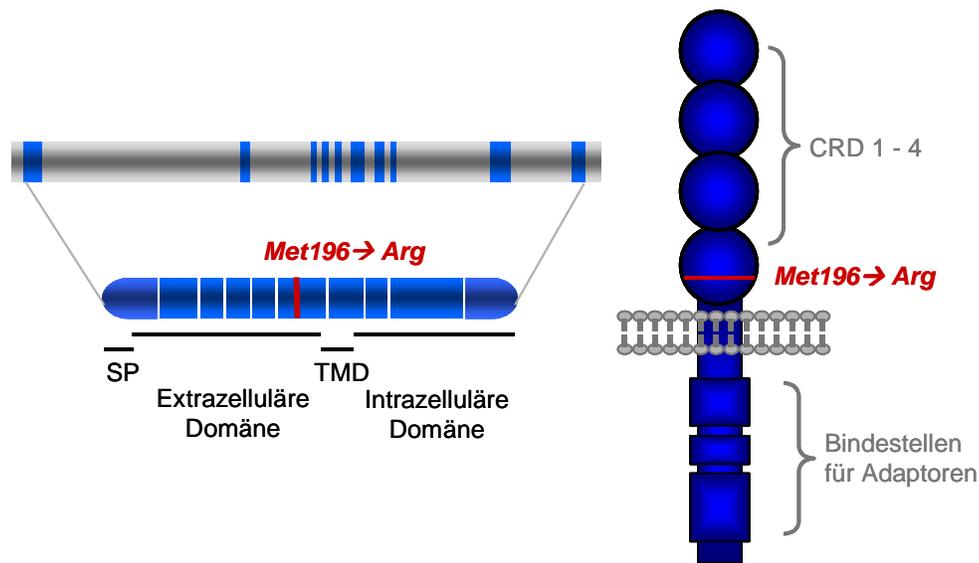


Abb. 6. Schematischer Aufbau des TNFR2 mit Lage des Met196Arg Polymorphismus. Die linke Hälfte zeigt den Zusammenhang zwischen Genstruktur und Proteinaufbau, SP = Signalpeptid, TMD = Transmembrandomäne. Rechts ist die Anatomie des reifen TNFR2-Proteins in der Zellmembran dargestellt, CRD 1-4 = Cystein-reiche Domänen. Die Position 196 liegt innerhalb der CRD4 in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran.

1.6 Zellbiologische und biochemische Hilfsmittel bei der Erforschung des TNFR2

Bei der funktionellen Charakterisierung der TNFR2-abhängigen Signalwege ergibt sich das Problem, dass durch das ubiquitäre Vorkommen, die erheblich stabileren Liganden-Rezeptorkomplexe und die höhere molare Bindungsaffinität des TNFR1 ein TNFR2-spezifisches Signal nur schwer zu detektieren ist. Folgende experimentelle Ansätze wurden deshalb gewählt, um diesem Phänomen Rechnung zu tragen:

- (i) Die Benutzung von immortalisierten embryonalen Fibroblasten (MEF) aus TNFR1^{-/-} / TNFR2^{-/-}-doppel-*knock-out*-Mäusen (Krippner-Heidenreich et al., 2002) mit anschließender stabiler Transfektion der TNFR2-Varianten war deshalb ein möglicher Weg, die Problemstellung zu bearbeiten. Da TNFR2 allerdings in den meisten Zelltypen keine endogene Apoptose-induzierende Kapazität besitzt (s.o.), musste auf ein anderes Zellsystem zurückgegriffen werden, um die Auswirkungen der Mutation auf TNF α -induzierten Zelltod näher untersuchen zu können.
- (ii) Die Cervix-Karzinomzelllinie HeLa (Puck et al., 1956) wurde erstmals 1951 isoliert und dient seit dieser Zeit als hervorragendes Modellsystem in der humanen Zellbiologie. Die adhärenenten Zellen wachsen einschichtig als Epithelverbund durch das Phänomen der sog. Kontaktinhibition (Paul, 1975), sind relativ leicht transfizierbar und bezüglich ihrer Genexpression und ihres apoptotischen Verhaltens gut charakterisiert. Zur Erforschung des TNFR2 eignen sie sich deshalb besonders gut, weil sie eine moderate TNFR1-Expression zeigen (einige Tausend Rezeptoren pro Zelle) und keinen endogenen TNFR2 exprimieren (Heller et al., 1992; Morita et al., 2001). Allerdings löst sTNF unter normalen Bedingungen in HeLa-Zellen keine Apoptose aus. Unter dem Einfluss einer niedrigen Konzentration des Proteinbiosynthese-Hemmstoffs Cycloheximid (CHX) werden HeLa-Zellen und andere Krebszelllinien allerdings für TNF α -induzierte Apoptose sensitiviert, ohne dass bei der verwendeten Konzentration die Hemmung der Proteinbiosynthese *per se* proapoptotische Effekte zeigt (Kreuz et al., 2001; Wajant et al., 2000). Der Mechanismus hinter diesem Phänomen ist noch nicht vollkommen geklärt, es wird aber vermutet, dass die Inhibition der Synthese von kurzlebigen antiapoptotischen Proteinen wie FLIP und IAPs (s.o.) die Zellen anfällig für TNF α -induzierte Apoptose macht (Kreuz et al., 2001; Wajant et al., 2000). Trotz des Modellcharakters haben sich HeLa-Zellen in den letzten Jahren als hervorragendes zell- und molekularbiologisches Hilfsmittel bei der Erforschung unterschiedlichster Aspekte der TNF α -Signalgebung bewährt.
- (iii) Die Beobachtungen, dass murines TNF mit gleicher Effizienz an beide Maus-TNFRs bindet, menschliches TNF α allerdings nur murinen TNFR1 aktivieren kann, und die daraus resultierende Erkenntnis, dass geringe Veränderungen in der Aminosäuresequenz von TNF α zu tiefgreifenden Änderungen in der Rezeptor-Affinität führen, eröffnete neue Möglichkeiten

bei der Erforschung Rezeptortyp-spezifischen Signalgeschehens. Durch die systematische Erforschung und molekularbiologisch-biochemische Herstellung von $\text{TNF}\alpha$ -Mutanten, sog. „Muteinen“, konnten Modellsysteme geschaffen werden, die die getrennte Untersuchung der Signalwege über TNFR1 und TNFR2 ermöglichen. Hierbei wird die Mutante TNF32W/86T (im weiteren mit „R1TNF“ bezeichnet) als hochspezifisch für exklusive TNFR1-Stimulation benutzt, während das Mutein TNF143N/145R eine TNFR2-spezifische Variante darstellt (Chainy et al., 1996; Shingarova et al., 1996; Tchorzewski et al., 1993; Van Ostade et al., 1994). Da TNFR2 zudem den Hauptrezeptor für memTNF darstellt und durch Einführung eines weiteren terminalen Cysteinrestes an ein Mutein eine Stabilitätserhöhung des Ligandentrimers und dadurch eine memTNF-ähnliche Wirkung erzielt werden kann, stellt das rekombinante Produkt Cys- TNF143N/145R (in dieser Arbeit „Cys-R2TNF“ genannt) ein wirkungsvolles Hilfsmittel zur Erforschung des TNFR2 dar.

- (iv) Ein weiteres methodisches Instrument liegt in der Benutzung von monoklonalen Antikörpern, die die Rezeptortrimere stabilisieren, ohne alleine eine Stimulation zu bewirken. Durch Quervernetzung („*crosslinking*“) des TNFR2-Komplexes mit dem monoklonalen Maus-anti-TNFR2-Antikörper 80M2 kann man die Affinität von sTNF an TNFR2 erheblich steigern, was sich in einer Verzehnfachung der Halbwertszeit des Liganden-Rezeptorkomplexes widerspiegelt (Krippner-Heidenreich et al., 2002). Hierdurch soll die Interaktion von TNFR2 mit membranständigem $\text{TNF}\alpha$, dem physiologischen Liganden des Rezeptors, simuliert werden.

Bei Benutzung dieser zellbiologischen Modelle in Verbindung mit rekombinanten $\text{TNF}\alpha$ -Mutanten und stabilisierenden Antikörpern ist natürlich zu beachten, dass es sich hierbei um ein rein künstliches experimentelles System handelt. Die Übertragbarkeit der hier gewonnenen Erkenntnisse auf die *in vivo* Situation ist wegen o.a. Gründe nicht trivial. Da das beschriebene experimentelle System jedoch seit einigen Jahren von vielen Arbeitsgruppen als hilfreiches Modell für generelle Aspekte der TNFR2-Signaltransduktion benutzt wurde und wird, erscheint es zur Bearbeitung der hier angesprochenen Fragestellung gut geeignet.

1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, mögliche Auswirkungen des Met196Arg-Polymorphismus im humanen TNFR2 auf die Funktionen des TNFR2 und der damit zusammenhängenden Signatransduktion aufzuzeigen. Zu diesem Zweck sollten die beiden Varianten des Rezeptors, $TNFR2^{\text{wildtyp}} = TNFR2^{196\text{Met}}$ und $TNFR2^{\text{mutant}} = TNFR2^{196\text{Arg}}$ funktionell miteinander verglichen und mögliche Unterschiede in biochemischen und physikalischen Eigenschaften, apoptotischem Verhalten, Signaltransduktion und Genexpression analysiert werden. Mit Hilfe der gefundenen molekularen Mechanismen sollten Hypothesen für die genetische Assoziation des Polymorphismus mit chronisch entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen erstellt werden.

Hierfür mussten zuerst stabile Populationen von HeLa-Zellen und von TNFR-doppel-*knock-out*-MEF etabliert und das entsprechende zellbiologische Instrumentarium in Form von rezeptorspezifischen TNF α -Muteinen und Konstrukten für Überexpression und Reporter-Gen-Assays vervollständigt werden.

Im einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- *Shedding* und biophysikalische Eigenschaften

Zeigt die Substitution Met196 \rightarrow Arg einen Einfluss auf die *shedding*-Kinetik und das physikalische Bindungsverhalten des Rezeptors zu TNF α ? Werden zeitliche Abläufe der Liganden-Rezeptor-Interaktion beeinflusst ? Welchen Einfluss hat *crosslinking* mit 80M2 auf die Bindungseigenschaften der beiden TNFR2-Varianten ?

- Zytotoxizität – Apoptose oder Nekrose

Wie wirkt sich die Mutation auf die zytotoxische Wirkung von sTNF aus ? Kann TNFR2 in dem verwendeten Zellsystem alleine Zelltod induzieren ? Gibt es Unterschiede durch 80M2-Vorbehandlung ? Finden sich Anzeichen für veränderten *receptor crosstalk* zwischen TNFR1 und TNFR2 ? Handelt es sich bei dem beobachteten Todesgeschehen um Apoptose ?

- Signaltransduktion

Welche Signalwege lassen sich in diesem Zellsystem über TNFR2 aktivieren ? Wie verhält sich die TNFR2-Signalstärke zum Signalgeschehen durch TNFR1 ? Finden sich Unterschiede in der Signalgebung durch die beiden TNFR2-Varianten ? Kann man diese Unterschiede zwischen den Varianten statistisch abgesichert quantifizieren ?

- Genexpression

Lässt sich durch Einsatz von TNFR2-spezifischem TNF α -Mutein Genexpression in den benutzten Zellen nachweisen ? Welche Gene werden über TNFR2 reguliert ? Zeigen sich Unterschiede zwischen der induzierten Genexpression durch $TNFR2^{\text{wildtyp}}$ und $TNFR2^{\text{mutant}}$? Lässt sich die differentielle mRNA-Expression auch auf Protein-Ebene nachweisen ? Kann man die

Expressionsunterschiede exemplarisch bestimmten regulatorischen DNA-Bereichen eines Gens zuordnen ?

- Rekrutierung des zytosolischen Adaptors TRAF2

Kann man die Rekrutierung von TRAF2 an die TNFR2-Signalkomplexe nach rezeptor-spezifischer Stimulation nachweisen ? Bestehen Unterschiede in der TRAF2-Rekrutierung zwischen den beiden Rezeptor-Varianten ? Stehen diese Unterschiede in Einklang mit der Analyse der Signaltransduktion und der Genexpression ?

Durch die Nutzung stabiler Expression einerseits und transienter Transfektion von homogenen Populationen andererseits, und durch den Vergleich der beobachteten Effekte in zwei verschiedenen Zellsystemen (HeLa-Zellen und MEF) sollte eine Hypothese entwickelt werden, die auf zellbiologischer und molekularer Ebene die Assoziation des TNFR2-Polymorphismus Met196Arg mit den beschriebenen Erkrankungen verstehen hilft.

2 METHODEN

Eine Auflistung aller Puffer- und Medienzusammensetzungen sowie eine vollständige Liste der verwendeten Kits, Antikörper, Enzyme und Primer findet sich im Anhang. Die Zusammensetzung der in kommerziellen Kits enthaltenen Puffer wurde in den meisten Fällen vom Hersteller nicht bekanntgegeben.

2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, und für alle Arbeitsschritte wurden ausschliesslich sterile Materialien, Puffer und Medien verwendet. HeLa Cervix-Karzinomzellen stammten von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig), immortalisierte Fibroblasten (MEF) von TNFR1^{-/-}/TNFR2^{-/-}-Mäusen waren freundlicherweise von Frau Prof. Daniela Männel (Regensburg) zur Verfügung gestellt worden. Beide Zelllinien wurden in RPMI-Medium (Gibco BRL, Eggenstein) supplementiert mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin (jeweils 50 µg/ml) bei 37°C und 5 %CO₂ kultiviert, zwei- bis dreimal pro Woche mittels eines Inversmikroskops (h500, Hund, Wetzlar) optisch überprüft und bei etwa 80 %iger Konfluenz passagiert. Zum Passagieren wurden die adhärennten Zellen dreimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und nach Überschichtung mit 1X Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) 5 min bei 37°C abgelöst. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wurden die Zellsuspensionen in 50 ml-Röhrchen (Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg) überführt und für 5 min bei 1700 g in einer Zentrifuge (Varifuge3.0R, Heraeus, Hannover) sedimentiert. Nach Resuspendieren der Zellen in 1-2 ml Medium wurde ein entsprechender Anteil an Zellen zur weiteren Kultivierung in die 25-ml-Kulturflaschen (Falcon) überführt (HeLa 1:3 bis 1:5; MEF 1:5) bzw. ein Aliquot der Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer (VWR International GmbH, Darmstadt) ausgezählt und in entsprechender Konzentration für weitere Experimente über Nacht kultiviert. Für die Experimente wurden nur Zellen bis zur maximal 25. Passage verwendet, zudem wurden die Zellen routinemässig einmal pro Monat, bei neu in Kultur genommenen Zelllinien sofort nach Eintreffen auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen

Für die Amplifikation von genomischen DNA-Abschnitten und zur Überprüfung der Apoptose-typischen gerichteten Degradierung von DNA (*DNA-laddering*) wurde genomische DNA (gDNA) aus kultivierten Zelle isoliert. Tab. 2 gibt einen Überblick über die genauen Parameter in Abhängigkeit vom experimentellen Aufbau und Zweck der DNA-Isolierung.

	Genomische Amplifikation	Nachweis von <i>DNA-laddering</i>
Ausgesäte Zelldichte	$2 \times 10^6 / \text{well}$	$4 \times 10^5 / \text{well}$
Plattenformat	10 ml-Schale	6-well-Platte
PBS zum Pelletieren (μl)	3000	1000
DNA-Isolierungspuffer (μl)	3000	300
70 % Ethanol zum Waschen (μl)	2000	1000
TE (pH 7,6) zum Lösen (μl)	200	20

Tab. 2. Parameter für die Isolierung von genomischer DNA.

Im allgemeinen wurden HeLa-Zellen in der angegebenen Dichte (Tab. 2) ausgesät und über Nacht kultiviert. Die expandierten Zellen wurden entweder sofort oder nach einer zusätzlichen Stimulationszeit von 6 h (für den Nachweis von *DNA-laddering*) zweimal in vorgewärmtem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber von der Unterlage gelöst und durch Zentrifugation (1700 g, 5 min) pelletiert. Im Anschluss wurden die Proteine durch Inkubation des Pellets für 4 h bei 37°C in DNA-Isolierungspuffer + 0,2 mg/ml Proteinase K vollständig verdaut, und die DNA durch Zugabe von 1 Volumen eiskaltem Isopropanol bei –20°C über Nacht gefällt. Nach vorsichtigem Abheben des Überstandes wurde die DNA zweimal in 70 % Ethanol gewaschen, anschliessend für 1 h luftgetrocknet und schliesslich in 1X TE (pH 7,6) gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (UV-Vis Spectrophotometer DU530, Beckmann, München) bei 260 nm mit einem Umrechnungsfaktor von 50 ng/ μl (für eine optische Dichte von OD = 1,0) mit Wasser als Referenz bestimmt. Die DNA wurde bei –20°C gelagert.

Für die Detektion von Apoptose-assoziiierter DNA-Spaltung wurde die DNA 10 min bei 65 °C denaturiert, anschliessend bei 80 V für 1 h auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel (1,5 % (w/v) Agarose in 0,5X TAE) aufgetrennt und unter einer UV-Geldokumentationsanlage (BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen) dokumentiert.

2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Die RNA-Isolierung aus HeLa-Zellen und MEF wurde mit dem RNeasy-Kit von Qiagen (Hilden) nach einem optimierten Protokoll durchgeführt. Die Pufferzusammensetzungen wurden vom Hersteller nicht bekanntgegeben.

Stabil transfizierte HeLa-Zellen bzw. MEF wurden zu 5×10^5 Zellen/well in 3 ml Medium auf 6-well-Platte (Nunc GmbH, Wiesbaden) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit frisch angesetzten Verdünnungen von Cys-R2TNF (zwischen 0 und 100 ng/ml), wonach die Zellen in PBS gewaschen, abgeschabt und pelletiert wurden. Nach Resuspendieren des Pellets in 550 μl RLT (+10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ β -Mercaptoethanol) wurden die Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge Biofuge Fresco, Heraeus) über eine QiaShredder® -Säule (13.000 g, 2 min, RT) aufgeschlossen. Der Durchfluss wurde mit 550 μl Isopropanol versetzt und auf eine RNA-bindende

RNeasy® -Säule aufgebacht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (8.000 g, 1 min, RT) wurde die nun auf der Säule gebundene RNA durch zwei 30minütige Inkubationen mit DNase I -Lösung (pro Säule 10 µl DNase I in 70 µl RDD, Qiagen) von verbliebener genomischer DNA gereinigt. Es folgten drei weitere Waschschrte mit 700 µl RW1 und 2 X 500 µl RPE mit anschliessender Zentrifugation, wonach die Säule auf ein unbenutztes Auffangröhrchen überführt und nochmals zum Trocknen für 2 min bei 13.000 g zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde die nun trockene Säulenmatrix mit 30 – 50 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte durch einen letzten Zentrifugationsschritt (2 min, 13.000 g) in ein frisches RNA-Tube. Die Konzentration wurde im UV-Photometer (260 nm) mit einem spezifischen Umrechnungsfaktor von 40 ng/µl (für OD=1,0) bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei –80°C, alle weiteren Arbeitsschritte mit RNA wurden auf Eis durchgeführt.

Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurde je 1 µg auf einem 1 %igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel in 0,5X TAE bei 80 V für 90 min aufgetrennt. Die optische Überprüfung erfolgte mit Hilfe einer UV-Geldokumentationsanlage. Während bei intakten RNA-Proben lediglich die 18S- und 28S-Banden von ribosomalen RNAs zu erkennen waren, deuteten zusätzliche Banden oder ein Verschmieren der rRNA-Banden auf Degradation der RNA hin.

Um Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschliessen, wurde eine Test-PCR gemäss den Angaben in 2.2.4 durchgeführt. Nur RNA-Proben, die keine GAPDH-Bande beruhend auf Amplifikation genomischer DNA zeigten, konnten für Reverse Transkription verwendet werden. Kontaminierte Proben wurden nochmals auf eine RNeasy-Säule aufgebracht und mit DNase I behandelt.

2.2.3 Reverse Transkription

Durch den Prozess der Reversen Transkription wird die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus einem mRNA-Template ermöglicht. Für die vorliegende Arbeit wurden für diesen Zweck eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (=Reverse Transkriptase) aus dem Retrovirus *MMLV (moloney-murine leukemia virus)* und Oligo-(dT)₁₈ – Primer zum Binden an den 3'- Poly-A-Schwanz der mRNA benutzt. Alle Komponenten entstammten dem Advantage® RT-for-PCR-Kit von Clontech (BD Bioscience, Clontech, Heidelberg).

In einem ersten Schritt wurden 200 ng Gesamt-RNA mit 1 µl oligo(dT) in einem mit RNase-freiem Wasser aufgefüllten Gesamtvolumen von 13,5 µl für 2 min bei 70°C vorinkubiert, um das *Annealen* des Primers an die mRNA-Moleküle zu ermöglichen. Anschliessend wurden 6,5 µl eines Mastermixes hinzugefügt, der neben dem 5X RT-Puffer auch dNTPs, synthetischen RNase-Inhibitor und das Enzym *MMLV*-Reverse Transkriptase enthielt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen für 5 min auf 98°C inaktiviert. Die cDNA wurde durch Zugabe von 80 µl PCR-H₂O 1:5 verdünnt und bis zur weiteren Nutzung bei –80°C gelagert.

Komponente	Menge	Inkubation
Gesamt-RNA	200 ng	
Oligo-(dT) (20 μ M)	1 μ l	
DEPC-H ₂ O	ad 13,5 μ l	<i>2 min 70°C</i>
5X Puffer	4 μ l	
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 μ l	
RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l	
Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	1 μ l	<i>1 h 42°C + 5 min 98°C</i>

Tab. 3. Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription. Die rechte Spalte zeigt die Inkubationsschritte der jeweiligen Teilansätze.

2.2.4 RT-PCR

Um die Expression bestimmter potentieller TNF α -Zielgene in den verwendeten Zellsystemen auf mRNA-Ebene analysieren zu können, wurden genspezifische Primerpaare entworfen, von der Firma Eurogentec (Eurogentec GmbH, Köln) auf Bestellung synthetisiert und in Anlehnung an die Methode nach Mullis zur Amplifikation von DNA-Fragmenten benutzt (Mullis and Faloona, 1987).

Die Primerpaare wurden, basierend auf der Sequenzinformation der jeweiligen mRNA von der Genbank des nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen NCBI (Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) so gewählt, dass die Länge des resultierenden Amplikons zwischen 200 und 1000 bp betrug.

In Tab. 4 ist die Zusammensetzung einer typischen RT-PCR (alle Komponenten: *Taq* DNA-Polymerase-Kit, Qiagen) mit cDNA als Template, sowie ein darauf abgestimmtes PCR-Programm, durchgeführt in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer (Gene Amp. PCR System 9700, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt) dargestellt.

Komponente	Menge (μ l)
PCR-H ₂ O	10,75
10X PCR Puffer	2
5X Q-Solution	4
dNTPs (je 10 mM)	0,5
Primermix (je 10 μ M)	0,5
cDNA-template	2
<i>Taq</i> -Polymerase	0,25

Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklen
95	4 min	} 24 – 30 x
95	30 sec	
T _{anneal}	30 sec	
72	1 min	
72	7 min	
4	Pause	

Tab. 4. Zusammensetzung des RT-PCR-Reaktionsansatzes und entsprechendes PCR-Programm. Die benutzten Primerpaare mit Annealingtemperatur und Zyklenzahl sind im Anhang aufgelistet.

Die Zyklenzahl für jedes Gen wurde so niedrig gewählt, dass die Reaktion sich noch im linearen Bereich der Amplifikationskinetik befand, damit eine semiquantitative Auswertung möglich war.

Als Test für genomische Kontamination der isolierten RNA wurde eine Test-PCR mit 5 μ l RNA als Template, Primern für das *housekeeping*-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und 40 Amplifikations-Zyklen durchgeführt.

Nach Auftrennung des kompletten Reaktionsansatzes auf einem 1-2%igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel wurde die DNA mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers sichtbar gemacht und mit einer Software für densitometrische Auswertung (SigmaGel, Jandel Scientific Corp., Erkrath) quantifiziert. Die Expression entsprechender TNF α -Zielgene wurde als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Relation zur GAPDH- oder β -Actin-Expression berechnet.

2.2.5 Herstellung von Konstrukten zur Überexpression und für Reporter-Gen-Assays

Nach einer Darstellung der methodischen Vorgehensweise findet sich in 2.2.5.10 eine Zusammenfassung der verwendeten Konstrukte mit der jeweiligen Zielsetzung der Klonierung.

2.2.5.1 Amplifikation der Zielsequenzen

Für die Konstrukte pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp} und pEGFP-TRAF2 wurde cDNA von freiwilligen gesunden Blutspendern als Template für die Amplifikation der codierenden Bereiche benutzt, für pGL3-Konstrukte genomische DNA, die aus HeLa-Zellen isoliert worden war. Die Amplifikation wurde mit Platinum® *Taq*-DNA-Polymerase *High Fidelity* (Invitrogen), einer *Taq*-Polymerase mit zusätzlicher Korrekturleseaktivität, in zwei Schritten durchgeführt: Im ersten Schritt wurde mit Hilfe sequenzspezifischer Primerpaare die gesamte Zielsequenz voramplifiziert, im zweiten Schritt wurde die erste Reaktion als Ausgangstemplate für eine Amplifikation mit modifizierten Primern benutzt. Dieses zweite Primerpaar enthielt am 5'-Ende

zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme und diente der gerichteten Insertion des Amplikons in die MCS (*multiple cloning site*) des jeweiligen Zielvektors.

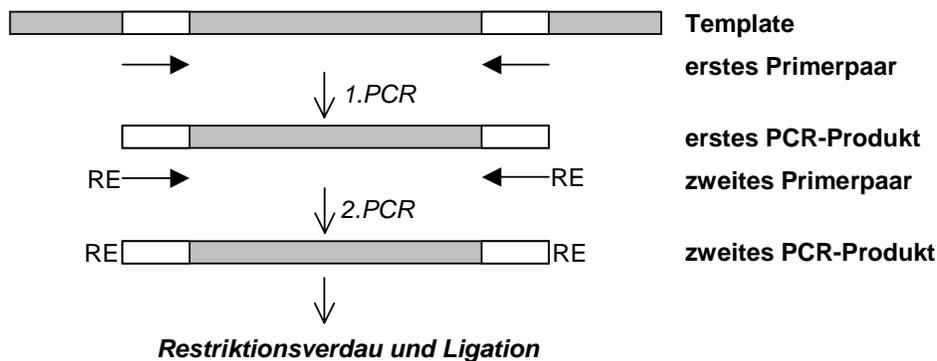


Abb. 7. Schema der PCR-basierten Amplifikation der Ziel-DNA mit Hilfe zweier Primerpaare. Die Pfeile stehen für die jeweiligen Primer, weiße Kästchen symbolisieren die Primer-Bindungsstellen, RE steht für zusätzliche Restriktionsschnittstellen an den 5'-Enden der Primer.

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung einer typischen Klonierungs-PCR mit Platinum® *Taq*. Die Amplifikation erfolgte mit 30 Zyklen bei der idealen Annealingtemperatur, die in Vorversuchen mit Hilfe eines Gradientencyclers ermittelt worden war. Im Anschluss an die PCR wurde die Hälfte des Reaktionsansatzes auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht analysiert.

Komponente	Menge (µl)
PCR-H ₂ O	35,8
10X PCR Puffer	5
MgSO ₄ (50 µM)	2
dNTPs (je 10 mM)	1
Primermix (je 10 µM)	1
Template	5
Platinum® <i>Taq</i>	0,2

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	4 min	} 30 x
95	30 sec	
T _{anneal}	30 sec	
68	2 min	
68	2 min	
4	Pause	

Tab. 5. Klonierungs-PCR mit Platinum® *Taq* High Fidelity. Die linke Tabelle zeigt die typische Zusammensetzung der PCR, wobei als Template entweder genomische DNA oder cDNA benutzt wurde. Rechts ist ein typisches PCR-Programm dargestellt. Die Annealingtemperatur richtete sich dabei nach den Klonierungsprimern (s. Anhang).

2.2.5.2 Aufreinigung der DNA

Um eine möglichst hohe Reinheit der Ziel-DNA zu erreichen, wurde die Bande mit der erwarteten Grösse mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des MiniElute DNA Kits

(Qiagen) aus dem Gelstück eluiert. Alle verwendeten Puffer entstammten dem verwendeten Kit, ihre Zusammensetzung wurde vom Hersteller nicht bekanntgegeben.

Das Gel wurde in Puffer QG für 10 min bei 50°C gelöst, wobei 3 µl QG/ mg Gel eingesetzt wurden. Der gesamte Ansatz wurde nach vollständigem Auflösen des Gelstücks mit einem Drittel des QG-Volumens an Isopropanol versetzt, auf eine MiniElute Säule aufgebracht und zentrifugiert (10.000 g, 1 min, Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg). Die auf der Säule fixierte DNA wurde durch zwei weitere Waschschrte mit QG und PE gewaschen und schliesslich nach fünfminütiger Inkubation in 11 µl EB eluiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5.3 Enzymatischer Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Es wurden 10 µl der eluierten Insert-Bande und 1 µl (ca. 1 µg) des jeweiligen Zielvektors mit derselben Kombination von Restriktionsenzymen verdaut.

Komponente	Vektorverdau (µl)	Insertverdau (µl)
A.bidest.	21	12
10X Puffer	3	3
10X BSA (10 mg/ml)	3	3
Enzym1 (20 U/µl)	1	1
Enzym2 (20 U/µl)	1	1
DNA	1	10

Tab. 6. Allgemeine Zusammensetzung eines Verdaus von DNA mit Restriktionsendonukleasen.

Die Reaktion wurde auf Eis angesetzt und der Verdau für 1-2 h bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Im Anschluss wurde der Ansatz mit dem Insert gekühlt gelagert, während der Vektoransatz mit 1 µl Alkalischer Phosphatase CIP (NEB, Bad Schwalbach) versetzt und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert wurde, um durch die Dephosphorylierung die Selbstligation des Vektors zu minimieren. Nach einem Denaturierungsschritt (75°C, 10 min) wurden die kompletten Ansätze von geschnittenem Vektor und Insert zusammen mit ungeschnittenem Vektor zur Kontrolle des Verdaus auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel aufgereinigt.

2.2.5.4 Ligation

Um die DNA-Konzentration der geschnittenen und eluierten Banden semiquantitativ zu bestimmen, wurden je 1 µl von Insert und von Vektor mit 9 µl A.bidest. und 1 µl 10X DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit 5 µl eines Grössenmarkers (*Smart Ladder*, Eurogentec) auf einem 1-2%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch optischen Vergleich der Bandenstärke mit den bekannten Konzentrationen der

Markerbanden konnte die Konzentration der Ligationskomponenten abgeschätzt werden. Durch die Kenntnis der genauen Länge von Insert und Vektor wurde aus der Konzentration (in ng/μl) die molare Konzentration (in fmol/μl) berechnet nach der Formel

$$\text{molare Konzentration [fmol/}\mu\text{l]} = \frac{\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} \times 10^6}{\text{Länge [bp]} \times 649 \text{ [pg / fmol bp]}}$$

Für die nachfolgende Ligation wurden 15 fmol dephosphorylierter Vektor, 45 fmol Insert und 2,5 U T4-Ligase (Invitrogen) in 1X Ligationspuffer in einem Endvolumen von 20 μl eingesetzt. Die Ligation wurde für 15-30 min bei RT durchgeführt. Direkt im Anschluss wurden 5 – 8 μl des Ligationsansatzes für eine Transformation benutzt.

Komponente	Menge
A.bidest.	ad 20 μl
10X Ligationspuffer	2 μl
Vektor	15 fmol
Insert	45 fmol
T4 Ligase (2,5 U/μl)	1 μl

Tab. 7. Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

2.2.5.5 Transformation von Bakterien

Zur Klonierung wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* TOP10 – Zellen (Invitrogen) verwendet und nach Angaben des Herstellers transformiert:

Nachdem die Zellen auf Eis langsam aufgetaut worden waren, wurden sie mit 5 – 8 μl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert, danach für 45 sec einem Hitzeschock von 42°C unterzogen und direkt im Anschluss für 2-5 min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden in 250 μl vorgewärmten SOCS-Medium aufgenommen und für 1 h in einem Schüttelinkubator (Orbital Incubator SI50, Stuart Scientific, Watford Herts, GB) bei 37°C und 1800 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden je 125 μl der Bakteriensuspension mit Hilfe eines sterilen Drugalski-Spatels (VWR) auf einer LB-Agarplatte (mit dem entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht auf der umgedrehten Platte bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

2.2.5.6 Identifizierung von positiven Klonen

Für die Identifizierung positiver Klone wurden pro Ligation 6 – 12 Klone mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und in 2ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt. Nach einer 12 – 18stündigen Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C wurden 1,5 ml von jedem expandierten Klon in ein

Eppendorftube überführt und durch Zentrifugation bei 10.000 g für 1 min sedimentiert. Die Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep® -MiniPrep-Kits von Qiagen nach Anleitung des Herstellers: Das Bakterienpellet wurde in 250 µl P1 (+ RNase A) resuspendiert und unter Zugabe von 250 µl P2 lysiert. Nach Neutralisierung mit 350 µl N3 und mehrmaligem Invertieren des Tubes wurden die Zelltrümmer bei 10.000 g für 10 min abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA im klaren Überstand wurde an eine QIAprep-Säule gebunden, zweimal durch Zentrifugation (10.000 g, 1 min) mit 750 µl PE gewaschen, luftgetrocknet und nach fünfminütiger Quellphase in 30 µl Elutionspuffer EB eluiert.

Durch Restriktionsverdau bzw. PCR mit den Klonierungsprimern wurden die isolierten Plasmide auf die korrekte Insertion der Ziel-DNA überprüft.

2.2.5.7 Präparative Aufreinigung der Plasmid-DNA (Maxiprep)

Mit den als positiv identifizierten Klonen wurde eine 250 ml-LB-Kultur mit dem entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht expandiert. Im Anschluss wurden 5 ml Zellsuspension mit 800 µl sterilem Glycerol versetzt und die Bakterien als 1 ml-Glycerolstocks bei -80°C gelagert. Der Rest der Suspension wurde 15 min bei 4°C und 6.000 g zentrifugiert und das entstandene Zellpellet entweder zur späteren Aufbereitung bei -20°C gelagert oder direkt mit Hilfe des QIAGEN® Plasmid Maxi Kits einer Plasmidisolierung unterzogen. Dabei wurde im Prinzip wie unter 2.2.5.6 vorgegangen, nur wurden entsprechend grössere Puffervolumina und einige modifizierte Puffer eingesetzt. Resuspendieren und Lyse der Bakterien erfolgte in 10 ml P1 bzw. P2, gefolgt von Präzipitation der DNA für 20 min auf Eis nach Zugabe von 10 ml eiskaltem P3. Nach Reinigung des Präzipitats über eine QIA-Maxi-Cartridge durch 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 5.000 g wurde der Durchfluss auf eine QIAGEN-tip-500 pipettiert und zweimal durch Gravitationsfluss mit je 30 ml QC gewaschen. Die gebundene DNA wurde in 15 ml Elutionspuffer QF eluiert, anschliessend durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation (15.000 g, 30 min, 4°C) pelletiert, in 5 ml 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schliesslich in 100 – 400 µl TE (pH 8,0) gelöst.

2.2.5.8 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenz aller hergestellten Konstrukte wurde im Anschluss an die Aufreinigung mit Hilfe von „Taq-Cycle-Sequencing“, einer Modifikation der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977), überprüft. Hierfür wurde das „ABI PRISM™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Perkin Elmer) benutzt.

50 ng der zu sequenzierenden Plasmide wurden mit 1 µl Sequenzierprimer (1,6 pmol/µl) und 1 µl Big Dye™ Terminator-Reaction-Mix (+ Ampli™ Taq FS) in einem Gesamtvolumen von 10 µl einer Sequenzierungs-PCR unterworfen. Das zugehörige Programm beinhaltete neben den Standard-Denaturierungsschritten eine Annealingphase von 20 sec und eine Elongationsphase von 4 min bei 60°C. Die Zyklenzahl betrug 25. Nach dieser *Cycle Sequencing*-Reaktion wurden die Proben mit 20 µl PCR-Wasser versetzt und über eine DyeEx® -Säule (Qiagen) aufgereinigt. Die Proben wurden in eine *96-well-reaction-plate* (Micro-Amp® Optical, Perkin Elmer) überführt und auf einem ABI PRISM® 3700 Kapillarsequenzierer (Perkin Elmer) analysiert.

2.2.5.9 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Herstellung des Kontruktes pcDNA3.1-TNFR2^{mutant} wurde durch Mutagenese des Wildtyp-Konstruktes pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp} mit sequenzspezifischen Primern und dem Mutagenese-Kit QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Hierfür wurde ein Primerpaar hergestellt, das die zu mutierende Region überspannte und innerhalb der 38 bp Gesamtsequenz auf beiden Strängen die Sequenz für das mutierte Codon **AGG** (statt **ATG**) enthielt. Nach Amplifikation des gesamten Plasmids mit *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim), die im Vergleich zu herkömmlicher *Taq*-DNA-Polymerase eine deutlich höhere Temperaturstabilität und eine zusätzliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wurde die unmutierte Template-DNA (pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp}-Plasmid) durch die Restriktionsendonuklease *Dpn* I, die nur die methylierte bakterielle DNA erkennt, verdaut.

Primer	Sequenz 5' → 3'	bp	Tm [°C]
TNFR2_T676G_s	CATCCACGGATATTTGCA <u>GG</u> CCCCACCAGATCTGTAAC	38	76
TNFR2_T676G_a	GTTACAGATCTGGTGGGG <u>CT</u> GCAAATATCCGTGGATG	38	76

Tab. 8. Primerdesign für die ortsgerechte Mutagenese des TNFR2^{wildtyp} zur Erzeugung von TNFR2^{mutant}. Die Lage des Codons 196 ist markiert, der kursive Buchstabe entspricht dem Nukleotidaustausch T676G auf beiden DNA-Strängen.

Komponente	Menge
PCR-H ₂ O	ad 50 µl
10X Reaktionspuffer	5 µl
sense-Primer	125 ng
antisense-Primer	125 ng
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
Template-Plasmid	50 ng
<i>Pfu</i> -DNA- Polymerase	1 µl

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	30 sec	} 12 x
95	30 sec	
55	1 min	
68	7 min	
68	14 min	
4	Pause	

Tab. 9. Reaktionsansatz für die Mutagenese. Die linke Tabelle zeigt die Zusammensetzung der PCR-Reaktion, wobei als Template das Konstrukt pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp} benutzt wurde. Rechts ist das PCR-Programm dargestellt. Die Elongationszeit betrug 1 min pro kb Plasmid, in diesem Fall 7 min.

Im Anschluss an die Amplifikation wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl *Dpn* I (10 U/µl) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Das unverdaute mutierte Plasmid wurde wie in 2.2.5.5 beschrieben durch Transformation in *E. coli* kloniert.

2.2.5.10 Übersicht über die hergestellten Konstrukte

Der Vektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Leek, NL) diente zur konstitutiven Überexpression von beiden TNFR2-Varianten, wobei TNFR2^{wildtyp} aus cDNA von freiwilligen Spendern amplifiziert und die TNFR2^{196Arg} - Mutante durch ortsgerichtete Mutagenese aus diesem erzeugt wurde. Die Konstrukte pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp} und pcDNA3.1-TNFR2^{mutant} waren im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe angefertigt worden (Boye, 2002).

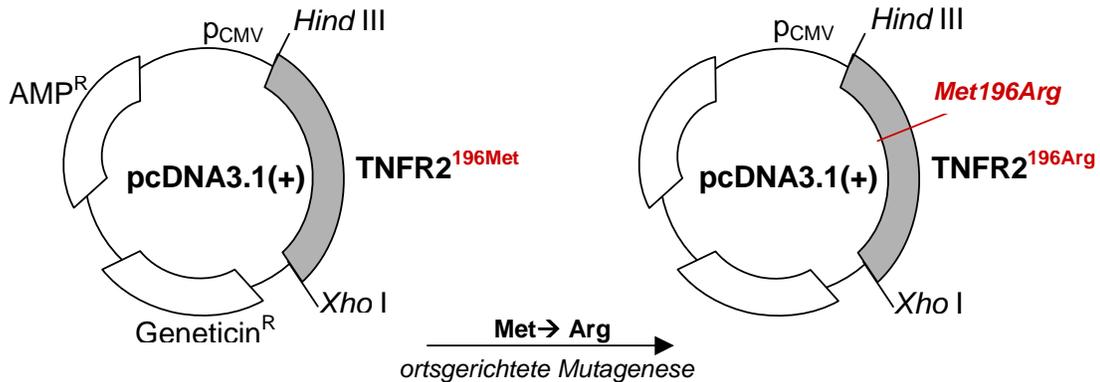


Abb. 8. Schematischer Aufbau der TNFR2-Konstrukte. pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp} (links) diente zur Herstellung von pcDNA3.1-TNFR2^{mutant} (rechts) durch spezifische Mutagenese des Codons 196 (ATG → AGG, Met → Arg). Zur Herstellung der Konstrukte wurden die Restriktionsschnittstellen für Hind III und Xho I benutzt.

Zur Expression von EGFP-TRAF2-Fusionsprotein wurde der codierende Bereich der TRAF2-cDNA im korrekten Leserahmen an den N-Terminus des modifizierten GFP- (*green fluorescent protein*) Derivats EGFP (*enhanced GFP*) kloniert. Hierfür wurde der Vektor pEGFP-N1 (Clontech) benutzt.

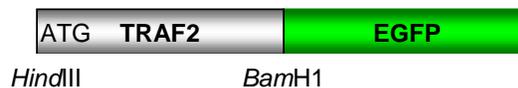


Abb. 9. Schematischer Aufbau des EGFP-TRAF2-Fusionsproteins. Die Bezeichnungen HindIII und BamH1 geben die Identität und die Lage der benutzten Restriktionsschnittstellen an.

Um die Auswirkungen unterschiedlicher TNF α -ähnlicher Stimuli auf die regulatorischen Regionen des gut charakterisierten TNF α -Zielgens MnSOD (Mangan-abhängige Superoxiddismutase) zu analysieren, wurden Bereiche aus dem Promoter und dem zweiten Intron, in dem sich ein TNF-responsives Element (TNFRE) (Bernard et al., 2001; Jones et al., 1997; Xu et al., 1999) befindet, in entsprechende Vektoren kloniert. Der 573 bp umfassende proximale Promoter-Bereich (PPR) wurde in den Vektor pGL3-Enhancer (Promega) inseriert, der zwar ein starkes Enhancer-Element, aber keinen Minimalpromoter enthält. Das TNFRE (465 bp) der MnSOD wurde in den Vektor pGL3-Promoter (Promega) kloniert und konnte hier als *Enhancer* die Aktivität des Minimalpromoters im Vektor beeinflussen. Beide Konstrukte beinhalten die Luziferase aus *Photinus pyralis* (Glühwürmchen) als Reportergen und wurden für *Dual Luciferase Assays* verwendet.

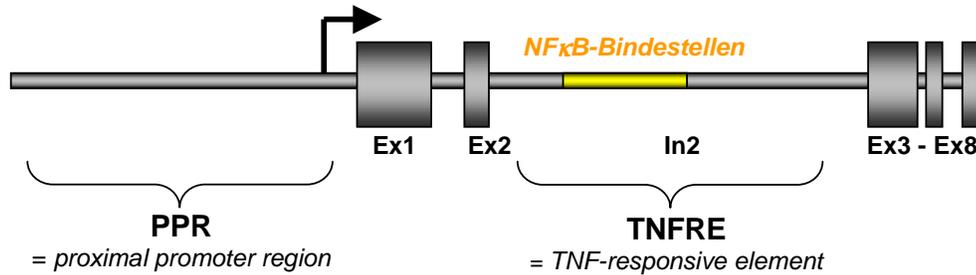


Abb. 10. Schematischer Aufbau des MnSOD-Gens mit Lage von PPR und TNFRE. Ex1 bis Ex8 steht für die Position der Exons. In2 steht für die Lage des zweiten Introns der MnSOD, das das TNFRE mit mehreren NF κ B-Bindungsstellen (hier gelb markiert) beinhaltet.

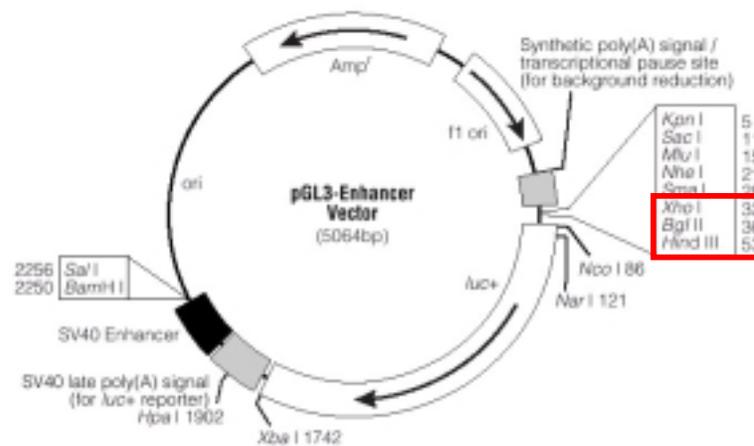


Abb. 11. Verwendeter Vektor für MnSOD-Reportergergenkontstrukture. MnSOD-PPR wurde in pGL3-Enhancer inseriert. Die Lage der verwendeten Restriktionsschnittstellen (*Xho* I und *Hind* III) ist durch einen roten Kasten markiert. Die Klonierung des MnSOD-TNFRE-Inserts in den Vektor pGL3-Promoter verlief analog mit den Schnittstellen für *Bam* H I und *Sal* I.

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte mit Angabe von Vektordaten, Insert-Herkunft und -Grösse sowie verwendeten Restriktionsenzymen aufgeführt.

Klonierungsprodukt:	pcDNA3.1-TNFR2	pEGFP-TRAF2	pGL3(E)-PPR	pGL3(P)-TNFRE
Vektor	pcDNA3.1(+)	pEGFP-N1	pGL3-Enhancer	pGL3-Promoter
Resistenz (Vektor)	Ampicillin	Kanamycin	Ampicillin	Ampicillin
Grösse Vektor (bp)	5400	4700	5064	5010
Insert	TNFR2 ^{wildtyp}	TRAF2	PPR der MnSOD	TNFRE der MnSOD
Herkunft des Inserts	cDNA, Blutspender	cDNA, Blutspender	gDNA, HeLa, Promoter der MnSOD	gDNA, HeLa, Intron2 der MnSOD
Grösse Insert (bp)	1400	1503	573	465
Enzym1	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Xho</i> I	<i>Bam</i> H1
Enzym2	<i>Xho</i> I	<i>Bam</i> H1	<i>Hind</i> III	<i>Sal</i> I
10X Puffer	NEB2	<i>Bam</i> H1	NEB2	<i>Bam</i> H1
BSA (+/-)	+	+	+	+

Tab. 10. Zusammenfassung der durch Klonierung hergestellten Konstrukte. „Enzym1“ bezeichnet die am 5´-Ende des Inserts verwendete Restriktionsschnittstelle, „Enzym2“ diejenige am 3´-Ende. Alle Enzyme, 10X BSA und die entsprechenden 10X Puffer stammten von der Firma NEB (Bad Schwalbach).

2.3 Rekombinante Herstellung von TNF α -Muteinen

2.3.1 Transformation und Isolierung erfolgreich transformierter Klone

Die Plasmide zur bakteriellen Expression von TNF32W/86T (R1TNF) und Cys-TNF143N/145R (Cys-R2TNF) wurden freundlicherweise von Prof. Peter Scheurich (Institut für Zellbiologie, Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Alle exprimierten Proteine enthielten ein 6X His-Tag zur Aufreinigung über Nickel-Chelat und wurden in früheren Veröffentlichungen beschrieben (Clauss et al., 1996; Haridas et al., 1998; Krippner-Heidenreich et al., 2002; Loetscher et al., 1993).

Escherichia coli (Stamm: M15 / pREP4, Qiagen) wurde wie oben beschrieben mit den Konstrukten pQE5-TNF32W/86T bzw. pQE5-Cys-TNF143N/145R transformiert. Es wurden 12 Einzelklone gepickt und über Nacht in 2 ml Kanamycin-haltigem LB-Medium (50 μ g/ml) expandiert. Die expandierte Kultur wurde mit LB-Medium auf 20 ml aufgefüllt, für 1 h inkubiert und anschliessend für 6 h durch Zusatz von 1 mM IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktosid, Sigma-Aldrich, München) stimuliert. Vor und nach IPTG-Stimulation wurde jedem expandierten Klon ein Aliquot von 1 ml entnommen, um den Einfluss der IPTG-Stimulation zu überprüfen. Die Bakterienaliquots wurden durch Zentrifugation pelletiert, in 100 μ l 1X NLB resuspendiert und durch fünfminütiges Aufkochen (98°C) und Ultraschallbehandlung (3 X 5 sec, Sonopuls HD200, Bandelin Electronic, Berlin) lysiert. Optional wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (16.000 g, 15 min, 4°C, Sigma 3K30 Zentrifuge, Braun Biotech, Melsungen) die lösliche Fraktion (L) als Überstand von der unlöslichen Membranfraktion (UL) abgetrennt, wobei letztere durch erneutes Aufkochen in denaturierendem 1X DLB mit anschliessender Ultraschallbehandlung weiter

lysiert wurde. Nach Versetzen von 20 µl des Lysates mit 5 µl 5X SDS-LB und kurzem Aufkochen wurden das Gesamtproteinlysat bzw. die unlösliche Fraktion (UL) der Bakterien einer SDS-PAGE (15% Acrylamid) unterworfen und durch Coomassie-Farbstoff (Coomassie-Brilliant Blue R250, Sigma) gefärbt. Die Klone, die eine starke Expression des Zielproteins zeigten, wurden für die präparative Aufreinigung (s.u.) des Proteins benutzt. Um für die native Aufreinigung die Fraktion zu bestimmen, in der sich das Zielprotein befindet, und um die Identität des Proteins zu verifizieren, wurden die unterschiedlichen Fraktionen auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit Hilfe eines universellen anti-TNF α -Antikörpers (Infliximab Remicade®, Centocor, Malvern, PA, USA) im Westernblot nachgewiesen. Nach sicherer Identifizierung wurde die entsprechende Aufreinigungsmethode für die präparative Aufreinigung benutzt.

2.3.2 Präparative Aufreinigung von TNF α -Muteinen

Die als hochexprimierend identifizierten Klone wurden über Nacht in 50ml Kanamycin-haltigem LB-Medium angezogen, nach 18 h Wachstum auf 500ml Medium verdünnt und für 2 h expandiert. Danach wurde das Medium mit IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt und die Kultur über 8 h kultiviert. Die Bakterien wurden anschliessend sedimentiert (10.000 g, 10 min, 4°C, Ultrazentrifuge XL-100, Beckmann, München), das Pellet in 4ml nativem, kaltem Lysepuffer NLB resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (6 x 10 sec) lysiert. Nach Sedimentieren der Zelltrümmer (16.000 g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand gekühlt gelagert. Das Pellet wurde nochmals zwei Zyklen von Resuspendieren in 2 ml NLB, Ultraschall und Zentrifugation unterzogen, um das Zielprotein quantitativ aus den Membranfraktionen zu isolieren. Die entsprechenden Überstände wurden gepoolt und durch Bindung an eine Nickel-Chelat-Matrix aufgereinigt. Dazu wurden die Lysate mit 1 ml NiNTA-Agarose (Qiagen) versetzt und im Kühlschrank für eine Stunde unter ständigem Rollen inkubiert, um die Bindung des 6XHis-Tag an das Nickel-Chelat zu ermöglichen. Anschliessend wurde die Suspension auf eine sterile Säule aufgetragen und durch Gravitationsfluss von ungebundenen Proteinen getrennt. Bei diesem Schritt und der anschliessenden Aufreinigung über einen Imidazol-Gradienten (mittels steigender Konzentration des Imidazols in den Waschpuffern) wurden Fraktionen von 500 µl in Eppendorftubes aufgefangen und zur späteren Analyse gekühlt gelagert. Es wurden jeweils 500 µl der verschiedenen Waschpuffer WB10 bis WB50 verwendet, um unspezifisch gebundene Proteine auszuwaschen. Die Elution der 6XHis-getaggen Muteine erfolgte unter Zugabe von 6 x 500 µl EB250. Von den gesammelten Fraktionen (Rohlysat, W1 bis W8, E1-E6) wurden jeweils 20 µl mit 5 µl 5X SDS-LB versetzt, auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Fraktionen mit dem höchsten Reinheitsgrad und der grössten Zielproteinmenge wurden gepoolt und bis zur Endaufreinigung bei 4°C gelagert.

Um die Muteine von verbleibenden LPS-Kontaminationen zu befreien, wurden Detoxi®-Endotoxin-Removal-Columns der Firma Pierce (Pierce-PerbioScience, Bonn) verwendet. Obwohl der Verlust an Gesamtprotein bei ca. 40 - 50% lag, war dieser Schritt zwingend nötig, um eine Fehl-Stimulation der Zellen mit bakteriellen Zellwand-Bestandteilen zu verhindern. Zuerst wurden die Säulen mit 1 ml des Elutionspuffers EB250 äquilibriert, anschliessend wurden die Proteinlysate auf die Säule aufgetragen und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Die Elution von der Säule erfolgte durch Gravitationsfluss und Zugabe von zusätzlichen 500 µl EB250 am Ende des Vorgangs. Um die Proteinkonzentration für die Lagerung zu erhöhen und den Elutionspuffer gegen PBS auszutauschen, wurden die gereinigten Eluate

mittels Amicon-Ultrazentrifugations-Säulen (Millipore, Schwalbach) durch mehrmalige Zentrifugation (1.700 g, 15 min, 4°C, Varifuge, Heraeus) konzentriert.

Die Proteinkonzentration der nativ aufgereinigten Muteine wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe des DC Protein Assay (BioRad, München) bestimmt, die Muteine wurden in Aliquots (50 µl) bis zur Benutzung bei -80°C gelagert.

2.4 Transfektion von Zellen

2.4.1 Methodische Grundlagen

Alle Transfektionen wurden mit Hilfe des lipidbasierten Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche, Applied Science, Mannheim) durchgeführt. Je nach Art des anschliessenden Experimentes wurden unterschiedliche Zelldichten und Mengen an DNA, FuGENE 6 und Zellmedium benutzt (s. Tab. 11). Der Ablauf der Transfektion war stets gleich: Nach Aussäen der Zellen mit einer bestimmten Zelldichte auf den entsprechenden Kulturplatten (in Vollmedium = RPMI +10% FCS, +1% Pen/Strep) wurden die Zellen über Nacht inkubiert, so dass sie am Tag der Transfektion ca. 80% Konfluenz zeigten. Es wurde die entsprechende Menge DNA in ein Eppendorftube überführt und ein zweites mit Transfektionsmedium (RPMI ohne Serum oder Antibiotika) und FuGENE 6 vorbereitet. Hierbei war darauf zu achten, dass das Transfektionreagenz nicht in Berührung mit der Plastikwand des Tubes kam, sondern direkt in das Medium pipettiert wurde. Nach einmaligem Invertieren des Medium/Fugene6-Tubes wurde der Inhalt tropfenweise zu der DNA hinzugegeben und der Transfektionsansatz für 15 min bei RT inkubiert, damit sich DNA-FuGENE 6-Komplexe bilden konnten. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz einmal invertiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine 18-24-stündige Inkubation, wonach das Medium erneuert und entsprechend der weiteren Experimentplanung verfahren wurde.

Art des Experimentes	Ausgesäte Zelldichte (10 ⁶ /Ansatz)	Zellkulturformat	Medium im Ansatz (µl)	FuGENE 6 im Ansatz (µl)	DNA im Ansatz (µg)
Stabile Transfektion	1	10 ml-Schale	400	6	2
Stimulation für Protein- oder RNA-Isolierung	0,4	6-well-Platte	100	3	1
Dual Luciferase Assay (DLA)	0,015 (HeLa) 0,010 (MEF)	96-well-Platte	50	0,15	0,05
Fluoreszenz-Mikroskopie	0,3	6-well-Platte gläschen)	100	2	0,67
Co-IP	2	10 ml-Schale	400	12	4

Tab. 11. Zusammensetzung der verschiedenen Transfektionsansätze in Abhängigkeit von der Art des nachfolgenden Experimentes.

2.4.2 Etablierung stabiler Zelllinien

2.4.2.1 Transfektion und Selektion

HeLa-Zellen und MEF wurden wie oben beschrieben mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/Schale auf 10ml-Schalen ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. HeLa-Zellen wurden mit jeweils $2 \mu\text{g}$ der Konstrukte pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp} bzw. pcDNA3.1-TNFR2^{mutant} oder leerem Vektor pcDNA3.1 (als *mock*-Kontrolle) transfiziert, die Selektion erfolgte mit Hilfe der G418-Resistenz des pcDNA3.1-Plasmids. Da die Mausfibroblasten durch die SV40-Immortalisierung bereits eine endogene G418-Resistenz besitzen, wurde hier ein anderer Ansatz gewählt: MEF wurden mit $1 \mu\text{g}$ des jeweiligen Zielvektors und zusätzlich $1 \mu\text{g}$ des Vektors pBabe-Puro, der Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin vermittelt, transfiziert. Zur Überprüfung des Selektionserfolges wurde jeweils eine 10ml-Schale der betreffenden Zellen untransfiziert belassen und im weiteren Verlauf identisch behandelt.

Am Tag nach der Transfektion (frühestens nach 18 h) wurde das Medium mit zusätzlichem Selektionsantibiotikum ($800 \mu\text{g/ml}$ G418 für HeLa, $2,5 \mu\text{g/ml}$ Puromycin für MEF) versetzt. Es erfolgte eine Selektion über 3-5 Wochen mit dreimaligem Mediumwechsel pro Woche, bis die untransfizierten Zellen komplett abgestorben waren und sich auf den Transfektions-Schalen deutliche Kolonien von überlebenden Zellen bildeten. Nach Überführen der Zellen auf 25ml-Kulturflaschen und weiterer Expansion für mehrere Tage wurden die Zellen wie im folgenden beschrieben mittels entsprechender Antikörper gegen TNFR2 und eines FACS-Gerätes mit Sortierfunktion bezüglich ihrer TNFR2-Expression fraktioniert.

2.4.2.2 Isolierung und Kultivierung stabil transfizierter Zellen

Die Färbungsmethode für die FACS-Sortierung verlief wie unter 2.4.2.3 beschrieben, abweichend wurde eine sehr viel grössere Zellmenge und ein steriler Puffer ohne Azid eingesetzt, damit die Zellen nach der Messung weiterkultiviert werden konnten. Die Sortierung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Zellbiologie an der Universität Stuttgart und dem Forschungszentrum Borstel (Borstel, Schleswig-Holstein) durchgeführt.

Nach entsprechender Selektion und Expansion der Zellen wurde ein Aliquot ($5-10 \times 10^6$) in FACS-Puffer ohne Azid (PBS + 1% (w/v) BSA) mit monoklonalem Antikörper Maus-anti-TNFR2 und sekundärem AlexaFluor488-IgG-Konjugat gefärbt und mit einer Flussgeschwindigkeit von < 200 Zellen/sec auf einem FACStar+ (Becton Dickinson, Heidelberg) sortiert, wobei *mock*-transfizierte Zellen als Negativkontrolle (*gating control*) dienen. Die TNFR2-positiven Zellen wurden in reinem FCS aufgefangen und möglichst schnell wieder auf Kulturschalen ausgesät. Nach Heranwachsen einer genügend grossen Zellpopulation wurde der Vorgang noch zweimal wiederholt, bis die Endpopulation ausreichend homogen war ($> 80\%$ positive Zellen).

Stabil transfizierte HeLa-Zellen wurden weiterhin in Vollmedium + $250 \mu\text{g/ml}$ G418, MEF in Vollmedium + $1 \mu\text{g/ml}$ Puromycin kultiviert und expandiert, einmal pro Monat im FACS auf stabile TNFR2-Expression überprüft und bei zu geringem Expressionslevel verworfen.

2.4.2.3 FACS-Analyse der transfizierten Zellen auf TNFR2-Expression

Die zu überprüfenden Zellen wurden nach dreimaligem Waschen in PBS mit Trypsinlösung von der Kulturschale gelöst, abzentrifugiert und in PBS aufgenommen. Ein Aliquot von ca. 5×10^5 Zellen wurde in FACS-Puffer (PBS + 1% (w/v) BSA + 0.1% (w/v) Natriumazid) aufgenommen und für 30 min im Kühlschrank unter ständigem Rollen mit 4 μg monoklonalem Antikörper Maus-anti-TNFR2 (ab8161, Abcam, Cambridge, MA, USA) inkubiert. Nach zwei Waschschrritten, bestehend aus Verdünnen der Zellsuspension mit 5 ml FACS-Puffer, Zentrifugation (1.000 g, 10 min, 4°C) und vorsichtigem Abheben des Überstandes, wurden die Zellen mit 6 μg Sekundärantikörper AlexaFluor488-Chicken-anti-mouse-IgG (Molecular Probes, Göttingen) gefärbt und nochmals inkubiert. Die folgenden zwei Waschschrritte wurden mit reinem PBS durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur FACS-Messung kühl und dunkel gelagert. *Mock*-transfizierte Zellen und stabil transfizierte Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper behandelt worden waren, dienten als Negativkontrollen. Es wurden nach Verwerfen der ersten 5.000 Zellen jeweils mindestens 10.000 bei einer Flussgeschwindigkeit von 200 - 300 Zellen/sec auf einem FACS-Gerät (FACStar+, Becton Dickinson) gemessen.

Um eine differentielle Bindung des primären Antikörpers an die verschiedenen TNFR2-Varianten auszuschliessen, wurde die FACS-Messung mit unterschiedlichen Antikörpern gegen TNFR2 wiederholt und die Ergebnisse auf Konsistenz überprüft.

2.5 Bindungsstudien mit ^{125}I -TNF α

Um zu überprüfen, ob die Mutation im TNFR2 einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften zu sTNF hat, wurden Bindungsstudien mit ^{125}I -markiertem rekombinantem TNF α (^{125}I -TNF α) in Form von Scatchard-Analysen und Konkurrenzexperimente mit unmarkiertem TNF α durchgeführt.

HeLa-Zellen (HeLa-TNFR2^{wildtyp}, -TNFR2^{mutant} oder *mock*-HeLa) wurden zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/*well* in 500 μl Medium auf einer 24-*well*-Platte über Nacht kultiviert und am Folgetag das Medium durch Bindungsmedium (RPMI + 2% (w/v) BSA + 0,1%(w/v) Natriumazid + 20 mM HEPES) ersetzt. Für Konkurrenzexperimente wurden 5 – 250 ng/ml unmarkiertes sTNF für 30 min zugegeben, bevor 1 ng/ml radioaktiv markiertes ^{125}I -TNF α eingesetzt wurde. Für die Scatchard-Analyse wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen ^{125}I -TNF α (0,01 – 20 ng/ml) inkubiert. Die Zellen wurden mit diesem Ansatz für 2 h bei 4°C inkubiert, da bei niedriger Temperatur die Bindungsaffinität des endogenen TNFR1 deutlich vermindert gegenüber der Bindung bei 37°C ist (Grell et al., 1998) und so weniger Interferenzeffekte zwischen den Rezeptoren zu erwarten waren. Alle Experimente wurden in drei Parallelen durchgeführt, die Zellzahl wurde für die drei unterschiedlichen Zelltypen in Parallelansätzen bestimmt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, trypsinisiert und in 200 μl PBS in RIA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die Menge gebundenes ^{125}I -TNF α wurde in einem Gammacounter (LKB Wallac 127, Gammamaster) für 120 sec gemessen. Die Umrechnung von radioaktiven Zerfallssignalen (cpm = *counts per minute*) in molare Einheiten erfolgte über eine parallel erstellte Eichgerade (frisch angesetzte 1:3 Verdünnungen von ^{125}I -TNF α ausgehend von 100ng/ml) mit der Vorgabe

$$17,5 \text{ ng } ^{125}\text{I} - \text{TNF}\alpha = 1 \text{ pmol}$$

Die unspezifisch gebundene (d.h. TNFR2-unabhängige) ^{125}I -TNF α -Menge wurde durch die Bindung an *mock*-transfizierte HeLa-Zellen bestimmt und von den Werten der TNFR2-Zellen abgezogen. Somit ergab sich unter Einbeziehung der Zelldichte für jeden Zelltyp für die spezifisch gebundene Menge ^{125}I -TNF α :

$$\text{TNF}_{\text{spec bound}} = \text{TNF}_{\text{bound}} / n_{\text{TNFR2}} - \text{TNF}_{\text{unspec bound}} / n_{\text{mock}}$$

$\text{TNF}_{\text{spec bound}}$ = spezifisch gebundenes TNF α pro 10^6 Zellen [fmol/ 10^6 Zellen]

$\text{TNF}_{\text{bound}}$ = von TNFR2- Zellen insgesamt gebundenes TNF α [fmol]

n_{TNFR2} = Zellanzahl (TNFR2-Zellen) im Bindungsansatz [10^6 Zellen]

$\text{TNF}_{\text{unspec bound}}$ = von *mock* -Zellen insgesamt gebundenes TNF α [fmol]

n_{mock} = Zellanzahl (*mock*-Zellen) im Bindungsansatz [10^6 Zellen].

Für den Kompetitionsansatz wurden die gemittelten Ergebnisse von $\text{TNF}_{\text{spec bound}}$ gegen den molaren Überschuss an unmarkiertem Kompetitor aufgetragen. Für die Scatchard-Analyse wurde eine Dosis-Bindungskurve erstellt, indem $\text{TNF}_{\text{spec bound}}$ [fmol/ 10^6] gegen die eingesetzte ^{125}I - TNF α -Konzentration $\text{TNF}_{\text{input}}$ [ng/ml] aufgetragen wurde. Zusätzlich wurde der Quotient aus spezifisch gebundenem und eingesetztem TNF α ($\text{TNF}_{\text{spec bound}} / \text{TNF}_{\text{input molar}}$ [nM]) gegen $\text{TNF}_{\text{spec bound}}$ aufgetragen und somit die erste Ableitung der Bindungskurve erstellt. Die negative reziproke Steigung der hieraus resultierenden abfallenden Geraden entspricht der Bindungskonstante K_d (in nM) des TNFR2 für den Liganden sTNF.

Zur Bestimmung der Bindungskinetik von TNF α an die beiden TNFR2-Varianten unter physiologischen Bedingungen (37°C) wurden stabil transfizierte MEF-Zellen verwendet. Für die Assoziationskinetik wurden 4×10^5 Zellen in 50 μl vorgewärmtem Bindepuffer (37°C) + 10 ng/ml ^{125}I -TNF α resuspendiert und für 10 sec bis 10 min inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen durch eine Mineralölschicht (Dibutyl-Phtalat : Bis-(2-Ethyl-Hexyl)-Phtalsäure-Ester 1: 0,89 , spez Dichte 1,014 g/l) zentrifugiert (15 sec, 14.000 g), um das ungebundene TNF α abzutrennen. Die Spitze des Tubes wurde zusammen mit den pelletierten Zellen abgeschnitten, in ein RIA-Röhrchen überführt und im Gammacounter gemessen.

Die Dissoziation des TNF α -TNFR2-Komplexes wurde analysiert, indem 4×10^5 Zellen für 2 h bei 4°C in 50 μl Bindepuffer + 20 ng/ml ^{125}I -TNF α vorinkubiert, anschliessend zu 50 μl vorgewärmtem Bindepuffer mit 100-fachem molaren Überschuss an unmarkiertem TNF α (2 $\mu\text{g/ml}$) pipettiert und für unterschiedliche Zeitpunkte (10 sec bis 10 min) bei 37°C inkubiert wurden. Diese Inkubation bewirkte die Dissoziation des ^{125}I -TNF α von den TNFR2-Komplexen durch Competition mit TNF α im Überschuss. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie oben beschrieben pelletiert und die gebundene Aktivität gemessen.

Um den Einfluss des Antikörpers 80M2 auf die Dissoziationskinetik zu analysieren, wurden die Zellen in Gegenwart von 2 $\mu\text{g/ml}$ 80M2 mit 20 ng/ml ^{125}I -TNF α in Bindepuffer für 2 h bei 4°C inkubiert, bevor die Dissoziationszeit wie oben beschrieben ermittelt wurde.

Alle Experimente wurden in Doppelansätzen durchgeführt, die unspezifische Bindung wurde durch Koinkubation (2 h, 4°C) von 4×10^5 Zellen mit 10 ng/ml ^{125}I -TNF α und 200-fachem molarem Überschuss an unmarkiertem TNF α bestimmt und von den experimentellen Werten subtrahiert.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Gesamtproteinlysate aus Zellen

Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^5 /well auf 6-well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen dem Experiment entsprechend stimuliert, danach zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Gummischabers in 1 ml PBS von der Platte gelöst. Nach Ernte der Zellen durch Zentrifugation (1.700 g, 3 min, RT) wurde der Überstand verworfen, und die Zellen wurden je nach Grösse des Pellets in 70-100 μl gekühltem Lysepuffer 1X DLB + 1% Phosphatase-Inhibitor Cocktail II (Sigma) + 2% 50X Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) resuspendiert. Nach Aufkochen der Zellen (99°C, 5 min) und Ultraschallbehandlung (2x 5 sec) mit zwischenzeitlicher Kühlung wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (16.000 g, 15 min, 4°C, Sigma 3K30, Braun Biotech). Der Überstand (= denaturiertes Proteinlysate) wurde bis zur weiteren Verwendung gekühlt gelagert.

Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Für Langzeitlagerung wurden die Proteinlysate bei -20°C (einige Tage bis Wochen) oder bei -80°C (mehrere Wochen bis Monate) aufbewahrt.

2.6.2 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese in Anlehnung an die Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dabei wurden die Proben in einem Sammelgel (pH 6,8, 3% Acrylamid) fokussiert und anschliessend in einem Trenngel mit geeigneter Zusammensetzung (7,5 - 15 % Acrylamid, pH 8,8) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Proteingrösse (kDa)	50-200	30-120	20-100	10-60		
<i>Acrylamid</i>	7,5%	10%	12%	15%	<i>Acrylamid</i>	3%
A.bidest (ml)	5	4,15	3,5	2,5	A.bidest (ml)	1,95
4X Trenngelpuffer (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	4X Sammelgelpuffer (ml)	0,75
(Bis-)Acrylamid (ml)	2,5	3,35	4	5	(Bis-)Acrylamid (ml)	0,3
TEMED (μl)	10	10	10	10	TEMED (μl)	3
10%(w/v) APS (μl)	100	100	100	100	10%(w/v) APS (μl)	30

Tab. 12. Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels. Die Zusammensetzung des Trenngels (*links*) richtete sich nach der Proteingrösse des Zielproteins, das Sammelgel (*rechts*) enthielt immer 3% Acrylamid. Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung 30:0,8 (w/v) stammte von BioRad, TEMED und APS von Sigma.

Während der Polymerisation der Gelkomponenten wurden die Proteinproben vorbereitet, indem gleiche Proteinmengen mit 0,2 Volumen 5X SDS-LB versetzt, kurz vor Beladen des Gels 3 min aufgekocht und anschliessend auf Eis gelagert wurden. Es wurden 15 µg/Tasche aufgetragen und zusammen mit 5 µl eines Proteingrössenmarkers (BioRad) elektrophoretisch aufgetrennt (Gelkammer: Multigel G44, Biometra). Nach einem Sammellauf von 30 min bei 15 mA/Gel (PP 3000 High Voltage Power Pack, Biometra) wurde je nach Prozentigkeit und Grösse des zu detektierenden Proteins ein Trennlauf von 45 min bis 2 h bei 30 mA/Gel durchgeführt und anhand der Markerbanden dokumentiert.

2.6.3 Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Westernblot)

Für die anschliessende Immundetektion durch Antikörper wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf einer chemisch inerten PVDF-Membran (Millipore) immobilisiert (Towbin et al., 1979). Die PVDF-Membran wurde 10 sec in Methanol aktiviert, anschliessend mind. 5 min in A.bidest. äquilibriert und danach 5 min in Anodenpuffer 1 aufbewahrt. Jeweils ein Filterpapier (Whatman, Dicke 3mm) wurde für 5 min in einem der frisch angesetzten Blotpuffer (Kathodenpuffer, Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2) zum Quellen belassen. Nach Ende des Gellaufs wurde das Gel aus der Blotkammer entfernt, von unpolymerisierten Gelresten gereinigt und blasenfrei mit dem Filterpapier_{Kathode} bedeckt. Der „Blot-Sandwich“ wurde nach Umdrehen des Gels durch blasenfreies Aufbringen von PVDF-Membran, Filterpapier_{Anode 1} und Filterpapier_{Anode 2} vervollständigt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 300 W und 11 mA/cm² für 1 – 2 h mit Hilfe einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad).

2.6.4 Immundetektion von Proteinen

Die Detektion der immobilisierten Proteine wurde mit Hilfe spezifischer Primärantikörper und HRP- (*horseradish peroxidase*) gekoppelter Sekundärantikörper nach dem ECL- (*enhanced chemiluminescence*) Verfahren durchgeführt.

Nach Ende des elektrophoretischen Transfers wurde die PVDF-Membran zunächst in 3 – 5%igem (w/v) Magermilchpulver (MMP) in TTBS bei 4°C über Nacht inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Im Anschluss wurde der Blot zuerst für 1 h bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert, danach 3 x 10 min in TTBS gewaschen und anschliessend für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 3 – 5 %igem MMP in TTBS oder 3 – 5% BSA (w/v) in TTBS mit einer Verdünnungsfaktor von 1:500 bis 1:2000. Nach weiterem dreimaligem Waschen in TTBS wurde der Blot mit ECL-Reagenz-Mix (ECL™ PLUS, Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet und 3 min bei RT inkubiert. Nach anschliessender Trocknung der Membran (3 – 4 min) erfolgte ein Belichten von Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia) für 45 sec – 10 min und maschinelles Entwickeln der Filme (Curix 60, GFA, Leverkusen).

Um Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen und gleichmässigen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, konnten die gebundenen Antikörpern durch „Strippen“ von der Membran entfernt und diese bis zu dreimal zur wiederholten Immundetektion benutzt werden. Das Strippen erfolgte durch Inkubation der PVDF-Membran für 45 min bei 55°C in Stripping-Puffer, gefolgt von mehrmaligem Waschen in TTBS und Wiederholung des Inkubationsprozesses mit Antikörpern, die entweder gegen die

unphosphorylierte Form des Zielproteins oder gegen ein gut charakterisiertes *house-keeping*-Gen (β -Actin, GAPDH) gerichtet waren.

Eine vollständige Liste der hier benutzten Antikörper mit Angaben zu Verdünnung, Ursprungsspezies und Bezugsfirmen findet sich im Anhang.

2.6.5 Detektion von löslichen Proteinen - ELISA-Messungen

Zur Detektion von löslichem sTNFR2 und Zytokinen (IL-6, IL-8, GM-CSF) wurden passende Antikörperpaare sowie rekombinantes Protein zum Erstellen einer Eichkurve von der Firma R&D bezogen (R&D Systems, Wiesbaden).

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $8 \times 10^4/\text{well}$ auf eine 24-well-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen erfolgte eine Stimulation für einige Minuten bis zu 24 h, wobei die Verdünnungen des Stimulans (Cys-R2TNF) für den Nachweis einer Dosisabhängigkeit durch serielle Verdünnung des Proteins in Vollmedium (RPMI + FCS + Pen/Strep) erfolgten. Jedes Experiment wurde als Doppelansatz durchgeführt. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde der Überstand der Zellen abgehoben, durch Zentrifugation (16.000 g, 15 min, 4°C) gereinigt und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei -80°C gelagert. Die relative Zellzahl wurde nach einem modifizierten Kristallviolett-Inkorporationsprotokoll ermittelt (s. 2.7). Der Nachweis der Zielproteine im Überstand erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Optische Dichte (OD) des Reaktionsansatzes wurde bei 450 nm mit Hilfe eines *ELISA-plate-readers* (Milenia Kinetic, DPC Biermann, Bad Nauheim) bestimmt und durch Messung der Standardkurve in absolute Konzentrationen umgerechnet.

2.6.6 Co-Immunpräzipitation von TNFR2 und TRAF2

Um die durch die Liganden-Bindung induzierte Rekrutierung des zytosolischen Adaptor-Proteins TRAF2 durch den Rezeptor TNFR2 zu analysieren, wurden Immunpräzipitationen des TNFR2-Signalkomplexes mit anschließender Immundetektion von TRAF2 durchgeführt. Zum Präzipitieren wurden monoklonale anti-TNFR2-Antikörper (ab8161, Abcam Ltd., Cambridge, GB bzw. goat-anti-TNFR2, R&D Systems) und Agarose-*Beads* mit immobilisiertem ProteinA/G (Santa Cruz, Heidelberg) benutzt.

TNFR2^{wildtyp} - , TNFR2^{mutant} - oder *mock*-transfizierte HeLa-Zellen wurden mit einer Dichte von $4 \times 10^6/\text{Schale}$ auf einer 10ml-Schale ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 min mit 10ng/ml bzw. 100ng/ml Cys-R2TNF stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach Waschen und Sedimentieren der Zellen wurde das Zellpellet in 300 μl eiskaltem IP-Lysepuffer + Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) resuspendiert. Die Lyse erfolgte unter Kühlung durch dreimaliges Vortexen der Zellen für 45 sec. Das native Lysat wurde mit 10 μl ProteinA/G-Agarose-*Beads* versetzt, gevortext und durch Zentrifugation (16.000 g, 15 min, 4°C) von Membrantrümmern und unspezifisch bindenden Proteinen getrennt. Das dabei entstehende Pellet wurde zur Erhöhung der Ausbeute nochmals in 100 μl IP-Lysepuffer der gleichen Prozedur unterzogen. Die Überstände der Lyseschritte wurden gepoolt, native TNFR2-Protein-Komplexe wurden durch Inkubation mit 2 μg anti-TNFR2-IgG für 2 h bei 4°C, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit 20 μl immobilisierter ProteinA/G-Agarose präzipitiert. Die Agarose-*Beads* mit den daran gebundenen TNFR2-Komplexen

wurden durch Zentrifugation (1.000 g, 1 min, RT) pelletiert und dreimal in kaltem IP-Lysepuffer gewaschen. Die Elution der Proteinkomplexe erfolgte durch Zugabe von 40 µl 2X SDS-LB, anschliessendem Aufkochen (5 min, 99°C), Zentrifugation und Abheben des Überstandes. Die denaturierten Proteinlysate wurden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit entsprechenden Antikörpern (Rabbit-anti-TNFR2-IgG, R&D, Rabbit-anti-TRAF2-IgG, Santa Cruz) auf die Anwesenheit von präzipitiertem TNFR2 und copräzipitiertem TRAF2 überprüft. Als Kontrollen dienten Lysate von untransfizierten HeLa-Zellen und Antikörper ohne Lysatkontakt.

2.7 Quantitative Zelltod-Messung

Die quantitative Bestimmung des induzierten Zelltodes erfolgte mit Hilfe des Kristallviolett-Inkorporations-Assays (Bard et al., 1978; Rothman, 1986). Dieses Protokoll beruht auf der Aufnahme eines Farbstoffs von lebenden Zellen, welche anschliessend fixiert, gewaschen und getrocknet werden, wogegen tote oder apoptotische Zellen ungefärbt bleiben. Der inkorporierte Farbstoff wird durch Methanol eluiert und die Optische Dichte (OD) auf einem *ELISA-reader* bestimmt, wobei die OD proportional zum Anteil überlebender Zellen ist.

Stabil transfizierte HeLa-Zellen wurden zu $1,5 \times 10^4$ Zellen/*well* über Nacht auf einer 96-*well*-Platte kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen in einigen Fällen einer Vorbehandlung unterzogen:

- (i) Vorinkubation mit 2 µg/ml 80M2 (37°C, 30 min)
- (ii) Vorstimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Cys-R2TNF für 6 h
- (iii) Inkubation mit Inhibitoren: NFκB-Inhibitor MG132 (50 µM), pan-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk (500 µM)

Nach Zugabe von frisch hergestellten seriellen Verdünnungen von sTNF, R1-TNF oder Cys-R2TNF wurden die Zellen 24 h inkubiert. Alle Experimente wurden in Anwesenheit von 2,5 µg/ml CHX in drei Parallelansätzen durchgeführt. Zusatz von Staurosporin (5 µM im Endansatz) diente als Positivkontrolle für Apoptose-Induktion.

Nach 24 h Inkubation folgten drei Waschschrte mit vorgewärmtem PBS. Anschliessend wurden die Zellen für 15 min bei 37°C in 50 µl Kristallviolett-Lösung (20% MetOH, 0.5% (w/v) Kristallviolett, Sigma) inkubiert. Der uninkorporierte Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen entfernt, die fixierten Zellen 15 – 30 min an der Luft getrocknet, und der Farbstoff schliesslich mit 50 µl Methanol für 5 min bei RT eluiert. Mit Hilfe eines *ELISA-readers* wurde die OD bei 550 nm bestimmt, die Staurosporin-Kontrolle diente dabei als Leerwert. Der Anteil überlebender Zellen wurde als Prozentsatz der unstimulierten Zellen berechnet, Parallelexperimente wurden gemittelt.

2.8 Detektion der Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS-Messung)

Zur Bestimmung der zellulären Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) wurde der redox-sensitive Farbstoff DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluoreszin-Diazetat, Molecular Probes) verwendet. Dieses Fluoreszin-Derivat ist membrangängig und wird innerhalb der Zelle durch endogene Esterasen zum Fluoreszenz-Farbstoff DCFH (Dichlorofluoreszin) umgewandelt, der durch Oxidation und daraus resultierende Fluoreszenzsteigerung die Bildung von ROS anzeigt.

Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^5 /well auf 6-well-Platten ausgesät, über Nacht kultiviert und am folgenden Tag dem Experiment entsprechend stimuliert. Im Anschluss wurden die stimulierten Zellen für 30 min in Medium + DCFH-DA (25 μ M) inkubiert, dreimal in PBS gewaschen und sedimentiert. Die in PBS resuspendierten Zellen wurden in einem FACS-Gerät auf Fluoreszenz-Änderung hin analysiert.

2.9 Reporter-Gen-Assay

Zur quantitativen Analyse der NF κ B-Aktivierung und Aktivität der regulatorischen Sequenzen der MnSOD unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurde transiente Überexpression der TNFR2-Varianten mit Co-Transfektion von Reporter-Genen verwendet. Der Reportervektor pNF κ B-LUC (Clontech) beinhaltet das Reporter-Gen *Firefly-Luziferase* (aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*) unter Kontrolle eines Minimalpromoters mit drei NF κ B-consensus-Enhancer-Elementen und setzt die Aktivierung des NF κ B-Signalweges durch Expression des Zielgens in Luziferase-Aktivität um. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und der Zellvitalität wurde der Kontrollvektor pRL-TK (Promega) mit einem moderat konstitutiven Promoter (Thymidinkinase-Promoter) und dem davon abhängigen Luziferase-Gen des marinen Cnidariers *Renilla reniformis* benutzt.

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/well (HeLa) oder 8×10^3 Zellen/well (MEF) auf einer 96-well-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit pcDNA3.1_TNFR2^{wildtyp}, pcDNA3.1_TNFR2^{mutant} oder pcDNA3.1 ohne Insert (*mock*-Kontrolle) zusammen mit 12ng pNF κ B-LUC und 3ng pRL-TK transfiziert (s.2.4). Zur Analyse der MnSOD-Regulation wurde statt des NF κ B-LUC-Konstruktes die entsprechende Menge pGL3(E)_PPR bzw. pGL3(P)_TNFRE verwendet. Alle experimentellen Ansätze (Transfektion + anschließende Stimulation) wurden in Triplets durchgeführt.

Nach 18 h – 24 h Inkubation wurden die Zellen entweder

- (i) mit 2 μ g/ml 80M2 (30 min),
- (ii) mit unterschiedlichen Mengen Cys-R2TNF (6 h)
- (iii) mit NF κ B-Inhibitor MG132 (50 μ M, 30 min) oder
- (iv) mit normalem Medium

vorbehandelt, wonach eine Stimulation mit sTNF, R1TNF oder Cys-R2TNF durch serielle Verdünnung (Konzentration ≤ 100 ng/ml) erfolgte.

Nach 18 h (HeLa) oder 6 h (MEF) Stimulation wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in 25 μ l 1X PLB (Promega) lysiert. Die Messung der Luziferase-Aktivitäten erfolgte mit Hilfe eines MicroLumatPlus-Luminometers (Berthold, Deutschland) durch automatisierte Zugabe von 75 μ l Firefly-Luziferase-Substrat (Promega) mit anschließender Messzeit von 10 sec, gefolgt von Zugabe von 75 μ l Stop-and-Glow-Lösung (Promega) und Messung für weitere 10 sec.

Als Leerkontrollen dienten untransfizierte Zellen. Die relative Luziferase-Aktivität (RLU) wurde nach Abzug der Leerkontrollwerte als Quotient aus LUC_{firefly} und LUC_{renilla} berechnet und aus den Parallelexperimenten gemittelt.

2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Assoziation zwischen TNFR2 und TRAF2 auf zellulärer Ebene optisch zu überprüfen, wurde transiente Transfektion von TNFR2 und einem EGFP-TRAF2-Fusionsprotein und konfokale Laserscanning-Mikroskopie verwendet.

HeLa-Zellen wurden zu 2×10^5 Zellen/well auf sterile Deckgläschen in einer 6-well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie mit 170 ng/well pEGFP-TRAF2 und 330 ng/well eines der beiden pcDNA3.1-Konstrukte (pcDNA3.1-TNFR2^{wildtyp} oder pcDNA3.1-TNFR2^{mutant}) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 10 min bei 37°C mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml Cys-R2TNF stimuliert oder unstimuliert belassen.

Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 20 min bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Alle folgenden Schritte wurden unter Schwachlichtbedingungen durchgeführt, um ein Verblässen der EGFP-Fluoreszenz zu unterbinden. Nach Blocken der unspezifischen Bindungen in PBS + 0,1 % BSA(w/v) für 30 min bei RT wurden die TNFR2-Komplexe extrazellulär durch Inkubation mit 2 μ g/ml 80M2 (in PBS/BSA) für 30 min und goat-anti-mouse-IgG-Cy3-Konjugat (Molecular Probes) gefärbt. Im Anschluss an eine 30minütige Inkubation wurden die Deckgläschen vorsichtig aus den wells gehoben, in A.bidest. eingetaucht und mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen PBS/Glycerol (1:1) auf einem Objektträger aufgebracht. Nach 18stündiger Inkubation bei 4°C zur Reduzierung des Hintergrundsignals wurden die fixierten Proben unter einem TCS-SP1 konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica) bei einer Vergrößerung von 40.000 betrachtet. Die Anregungswellenlängen betragen 543 nm für Cy3 (TNFR2) und 488 nm für EGFP (TRAF2) mit einer Intensität von jeweils ca. 70%. Untransfizierte Zellen und solche ohne Behandlung mit Primärantikörper wurden als Referenzen benutzt, die Auswertung der Translokationsexperimente erfolgte mit der *Leica Confocal Software* (Leica).

2.11 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde ein kommerzielles Tabellenkalkulationsprogramm (Excel™, Microsoft, München) verwendet. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen, DLAs und ELISAs wurden als arithmetisches Mittel \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanzen für Unterschiede zwischen TNFR2^{wildtyp} und TNFR2^{mutant} erfolgte mit Hilfe des doppelseitigen T-Tests für Gauss'sche Normalverteilung. Ein Signifikanzniveau mit einem p -Wert von $p < 0,05$ wurde hierbei als signifikant, $p < 0,01$ als hochsignifikant definiert.

3 Ergebnisse

Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse der zell- und molekularbiologischen Vorarbeiten dargelegt, bevor die Resultate der funktionellen Analyse von $TNFR2^{196Met} = TNFR2^{wildtyp}$ und $TNFR2^{196Arg} = TNFR2^{mutant}$ in den neuetablierten Zellsystemen vorgestellt werden.

3.1 Molekular- und zellbiologische Vorarbeiten

3.1.1 Herstellung der Konstrukte

Die Konstrukte für Überexpression von $TNFR2^{wildtyp}$ und $TNFR2^{mutant}$ waren vor Beginn dieser Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit angefertigt worden. Das Expressionskonstrukt pEGFP-TRAF2 zur Expression eines TRAF2-EGFP-Fusionsproteins wird hier exemplarisch für die Herstellung anderer Konstrukte dargestellt.

Die Amplifikation der gesamten codierenden Sequenz von TRAF2 aus cDNA lieferte nach Optimierung der PCR-Bedingungen die erwartete Bande ($TRAF2_{full\ length}$) von 1503 bp korrespondierend zur Proteinsequenz von 501 Aminosäuren. Auch die nachfolgende PCR mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende der Primer lieferte ein Amplikon mit der erwarteten Grösse ($TRAF2_{+RE}$).

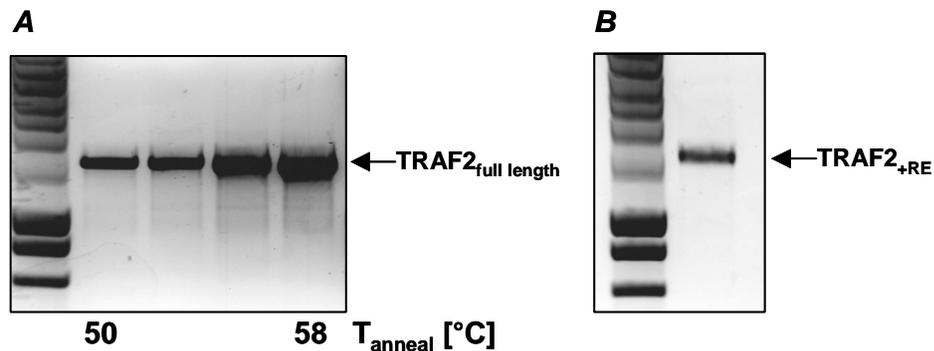


Abb. 12. Amplifikation der kodierenden Sequenz für TRAF2 aus cDNA. A zeigt die erste Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern und unterschiedlichen Annealing-Temperaturen, B zeigt das Resultat der PCR mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende der Primer.

Nach enzymatischem Verdau der gereinigten DNA und Dephosphorylierung wurden Insert ($TRAF2_{dig}$) und Vektor ($pEGFP_{dig-cip}$) zur Quantifizierung auf ein Agarosegel aufgetragen. Abb. 13 zeigt die entsprechenden Banden im Vergleich zu den bekannten Konzentrationen eines DNA-Markers. Aus dem Vergleich der Bandenstärke wurde die Konzentration für Insert und Vektor abgeschätzt, in diesem Fall 90 ng/ μ l für $TRAF2_{dig}$ und 70 ng/ μ l für Vektor $pEGFP_{dig-cip}$.

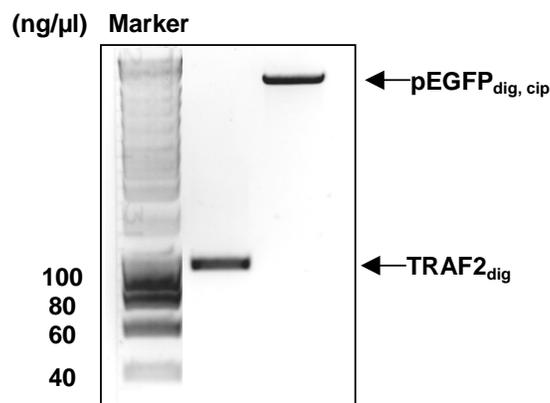


Abb. 13. Abschätzung der DNA-Konzentrationen von Insert und Vektor durch Vergleich mit Markerbanden. Die Abschätzung erfolgte nach enzymatischem Verdau (*dig*) und Dephosphorylierung des Vektors (*cip*).

Die anschließende Transformation und Ausplattierung lieferte für pEGFP-TRAF2 ca. 50 – 100 Kolonien, von denen 12 Einzelklone gepickt und einer Plasmidisolierung unterworfen wurden. Für die Reportergerkonstrukte pGL3(E)-PPR und pGL3(P)-TNFRE lagen die Koloniezahlen mit einer grossen Streuung zwischen 8 und > 200 Kolonien/Platte.

Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde einem Testverdau unterworfen, um das Vorhandensein des gesuchten Inserts zu überprüfen. Abb. 14 zeigt das Ergebnis des enzymatischen Verdau der pEGFP-TRAF2-Klone. Nur Klon # 8 zeigte in diesem Fall bei Verdau mit *Hind* III und *Bam* H1 das erwartete Fragment.

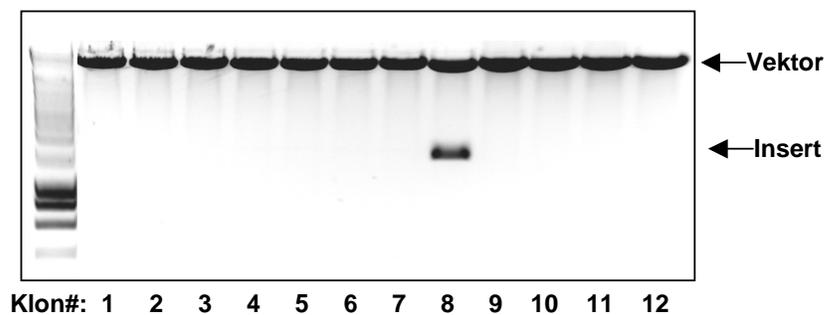


Abb. 14. Testverdau zur Identifizierung positiver Klone. Der Verdau wurde nach Isolierung der Plasmid-DNA aus gepickten Einzelklonen mit den Enzymen *Hind* III und *Bam* H1 durchgeführt.

Die als positiv identifizierten Klone wurden nach Sequenz-Verifizierung einer präparativen Plasmidisolierung unterzogen.

3.1.2 Etablierung von Zelllinien mit stabiler TNFR2-Expression

Die Selektion stabil transfizierter Zellen (HeLa: 800µg/ml G418, MEF: 1µg/ml Puromycin) nahm 4-6 Wochen in Anspruch und wurde beendet, sobald die Platte mit untransfizierten Kontrollzellen keine lebenden Zellen mehr aufwies. Nach einer weiteren Expansionsphase wurden die Zellpopulationen mehreren Sortierungs-Zyklen mit Hilfe eines FACS-Gerätes unterzogen.

Abb. 15 zeigt das Ergebnis der FACS-Messung stabil transfizierter Zellen. *Mock*-transfizierte HeLa-Zellen und untransfizierte (parentale) MEF zeigten nur geringen Anstieg der Fluoreszenz bei Benutzung von Primärantikörper gegen TNFR2 und wurden als Kontrollzellen zum Sortieren verwendet. Bei HeLa-TNFR2^{wildtyp} und HeLa-TNFR2^{mutant} ergab sich eine erhebliche Steigerung der Fluoreszenz mit einem durchschnittlichen Anteil von TNFR2-positiven Zellen von 78 % (TNFR2^{wildtyp}) und 81 % (TNFR2^{mutant}). TNFR1^{-/-}/TNFR2^{-/-}-MEF-Zellen waren insgesamt schwerer transfizierbar, zeigten einen geringeren Anteil TNFR2-positiver Zellen nach erfolgter Selektion und wiesen schon nach wenigen Wochen einen deutlichen Rückgang der TNFR2-Expression auf. Der Prozentsatz für TNFR2-Expression lag bei dem hier dargestellten Zeitpunkt bei ca. 62 % (MEF-TNFR2^{wildtyp}) bzw. 45 % (MEF-TNFR2^{mutant}).

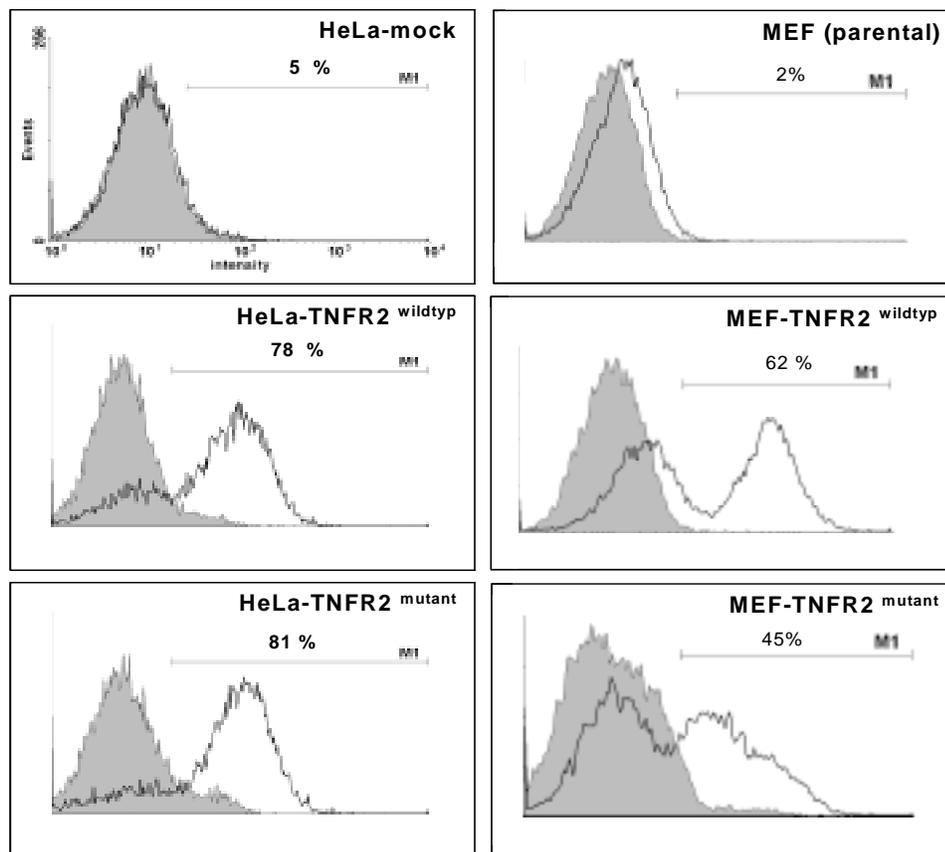


Abb. 15. FACS-Analyse der stabilen Zellpopulationen. Die Anzahl der Messereignisse ist gegen die Fluoreszenz-Intensität aufgetragen (s. Ausschnitt obere Reihe links). HeLa-mock bzw. parentale (untransfizierte) TNFR1^{-/-}/TNFR2^{-/-}-MEF wurden als Kontrollzellen zur Sortierung benutzt.

Für den funktionellen Vergleich von TNFR2^{wildtyp} und TNFR2^{mutant} war es wichtig, Zellpopulationen mit vergleichbarem Expressionsniveau des Rezeptors zu etablieren. Hierbei kam es vor allem auf den Anteil der Zellen an, die das Protein auf ihrer Oberfläche in ausreichender Dichte exprimierten. Ein grosser Teil der anschliessenden Untersuchungen, bei denen es besonders auf die Homogenität der stabilen Populationen ankam (Zytotoxizität, Signaltransduktion, Expressionanalysen), wurde mit HeLa-Zellen durchgeführt, deren Expressionsniveau über die Zeit konstant und für die beiden Varianten des Rezeptors vergleichbar war. Die etablierten MEF-Populationen dienten dagegen als Kontrollzellen für Versuche, bei denen die Homogenität der Einzelpopulationen kein entscheidendes Kriterium für die Vergleichbarkeit der Resultate darstellte (physikalische Bindungsstudien). Zudem konnten parentale TNFR1^{-/-}/TNFR2^{-/-}MEF als Ausgangszellen für transiente Transfektion und Luziferase-Assays benutzt werden.

Die Stabilität der Transfektion unterschied sich stark zwischen den beiden benutzten Zelltypen. Während HeLa-Zellen in entsprechendem Selektivmedium (250µg/ml G418) über mehrere Wochen bis zu ca. drei Monaten ein konstantes Expressionsniveau hielten, konnten MEF-Zellen nur für ca. 4 – 6 Wochen nach Sortierung für funktionelle Studien benutzt werden. Sobald ein Rückgang der Gesamtexpression von TNFR2 oder eine Veränderung der Populationshomogenität bemerkt wurde, wurden die Zellen verworfen und neue Aliquots von tiefgekühlten stabilen Zellen expandiert.

3.1.3 Rekombinante Herstellung und Aufreinigung von TNF α -Muteinen

Für die rekombinante Herstellung von TNF α -Muteinen waren *E.coli* (M15) transformiert und nach Klonierung zur Expression des Transgens benutzt worden. Alle isolierten Klone zeigten eine starke IPTG-induzierte Expression eines Proteins von ca. 16-18 kDa, welches durch Westernblot-Analyse als TNF α -Variante identifiziert und zu einem Grossteil in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen werden konnte (Abb. 16).

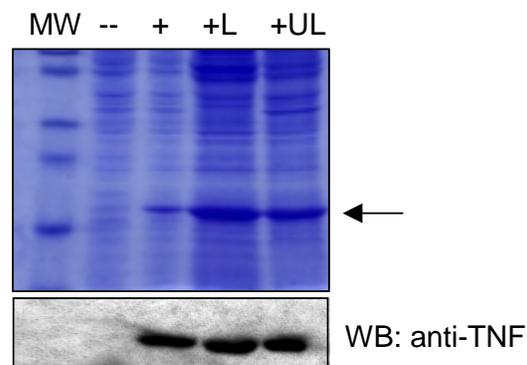


Abb. 16. Identifizierung des rekombinanten Proteins als humane TNF α -Mutante. (--) unstimuliert, (+) 6stündige Stimulation mit 1mM IPTG, (+L) lösliche Fraktion, (+UL) unlösliche Fraktion. Gesamtproteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (Coomassie-Färbung, oben) und einem Westernblot (WB, unten) mit anti-TNF α -Antikörper unterzogen. Der Pfeil markiert die Lage des rekombinanten Proteins.

Nach nativer Lyse eines präparativen Ansatzes wurde das Protein über eine Nickel-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt (s.u.). Dabei wurden die ersten vier Waschfraktionen verworfen und die Elutionsfraktionen E1- E6 gepoolt. Das Protein konnte mit Hilfe des 6X His-Tags quantitativ und in hohem Reinheitsgrad aus dem Bakterienlysats aufgereinigt werden.

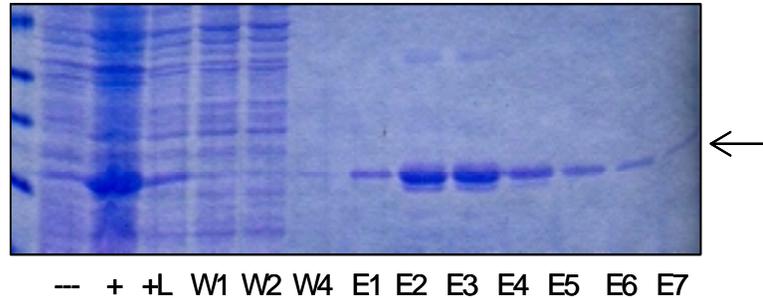


Abb. 17. Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Nickel-Chelat-Chromatographie. (--) unstimuliert, (+) 1mM IPTG, (+L) lösliche Fraktion, W1 - W4: Waschfraktionen, E1 – E7: Elutionsfraktionen. Der Pfeil markiert die Lage des rekombinanten Proteins.

Nach Aufreinigung und Einengung betrug die Konzentration der aufgereinigten Proteine je nach Präparation zwischen 110 und 600 $\mu\text{g/ml}$ in einem Endvolumen von 1ml PBS. Dies entsprach einer Ausbeute von ca. 1-6 μg an rekombinantem aufgereinigtem Protein pro 500 ml Bakterienkultur.

3.2 Funktionelle Analyse des Met196Arg Polymorphismus

3.2.1 Analysen zur Zytotoxizität unterschiedlicher TNF α -ähnlicher Stimuli

Da die biologische Wirkung von TNF α neben der Regulation von Genexpression auch die Induktion von Zelltod umfasst, wurden quantitative Zelltod-Messungen mit löslichem TNF α und den rezeptorspezifischen TNF-Muteinen durchgeführt. Dadurch sollte der Einfluss des TNFR2 auf die durch TNF α vermittelte Signaltransduktion näher untersucht werden.

HeLa-Zellen reagieren unter normalen Umständen auf TNF α nicht mit der Aktivierung des Apoptose-Programms, werden aber durch Zusatz von niedrigen Konzentrationen an Cycloheximid (CHX) für TNF α sensitiviert (s. Einleitung). Vorversuche hatten ergeben, dass die drei HeLa-Zelltypen (HeLa-*mock*, HeLa-TNFR2^{wildtyp} und HeLa-TNFR2^{mutant}) bei einer CHX-Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ keinerlei spontane Apoptose zeigten. Der Zusatz von sTNF bewirkte ein Absterben der Zellen mit dosisabhängigem Anstieg des Effektes oberhalb einer TNF α -Konzentration von 0,1 ng/ml. Im Lichtmikroskop zeigten die absterbenden Zellen dabei eine verkleinerte, rundliche Morphologie. Die Wachstumskurven der Zelltypen in Medium + 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CHX verlief ähnlich mit einer Verdopplungszeit von ca. 30 – 40 h.

Die Untersuchung unterschiedlicher TNF α -ähnlicher Stimuli erfolgte in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen: Im ersten Ansatz sollte der Einfluss der drei TNF α -Varianten sTNF, R1-TNF (TNFR1-spezifisches Mutein) und Cys-R2TNF (TNFR2-spezifisches Mutein) jeweils in Verbindung mit dem Antikörper 80M2 auf die drei Zelltypen untersucht werden. Wie in Abb. 18 zu sehen, zeigte die Stimulation mit TNFR2-spezifischem Mutein (**A**) keine zytotoxische Wirkung, während TNFR1-spezifische

Stimuli (R1TNF, **B** und sTNF, **C**) eine klare dosisabhängige Toxizität ab einer Konzentration von ca. 1 ng/ml (R1TNF) bzw. 0,33 ng/ml (sTNF) aufwiesen.

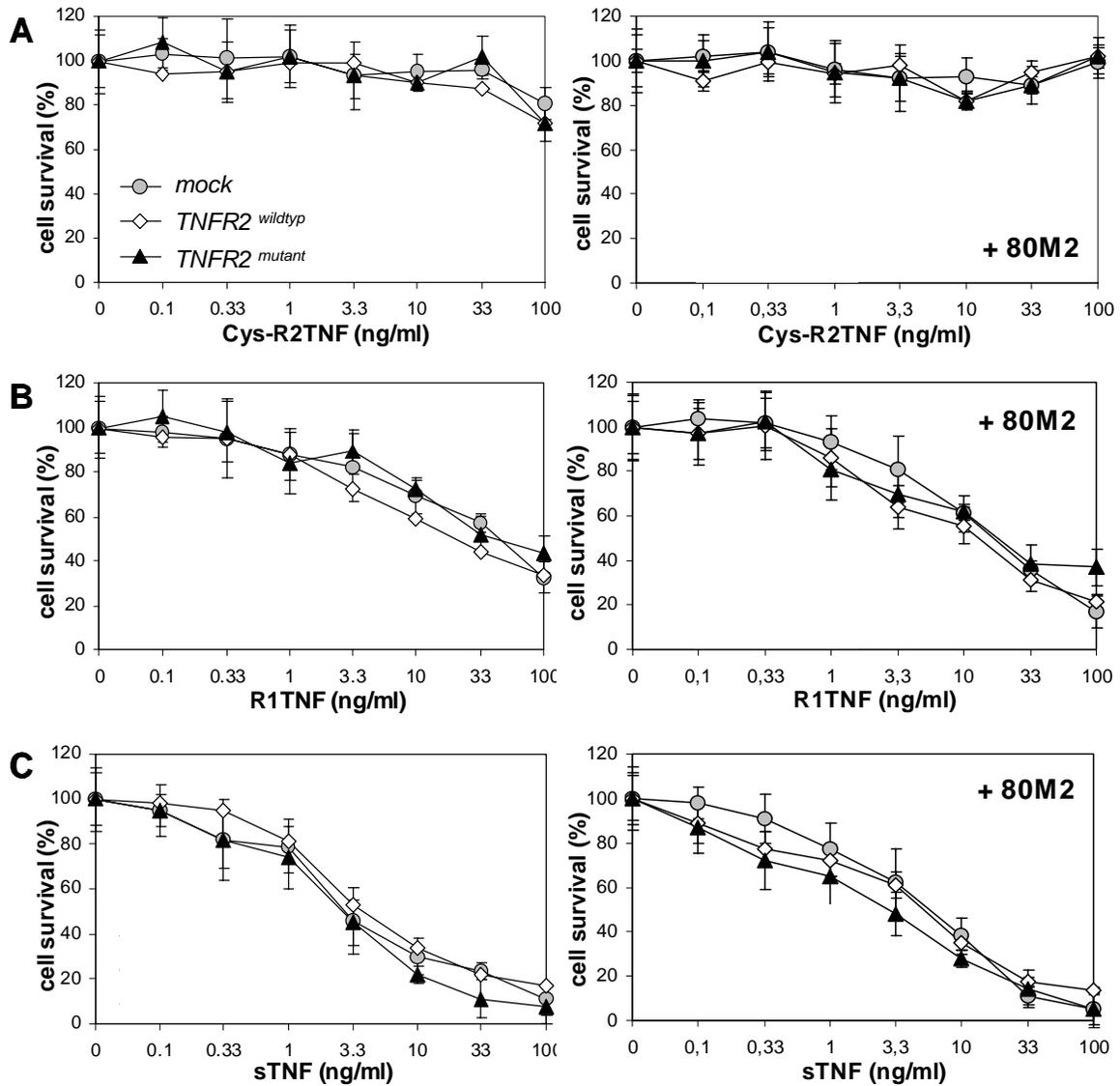


Abb. 18. Zytotoxizität unterschiedlicher TNF α -ähnlicher Stimuli. Nach Inkubation für 24 h in Gegenwart von 2.5 μ g/ml CHX und unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Muteins (A,B) oder sTNF (in C) wurde die Anzahl lebender Zellen mittels Kristallviolett-Inkorporation quantifiziert und prozentual auf unstimulierte Zellen bezogen. Die rechte Hälfte zeigt den gleichen experimentellen Ansatz nach Quervernetzung (*Crosslinking*) des TNFR2-Komplexes mit 80M2 für 30 min.

Durch den Einsatz des Antikörpers 80M2 konnte in den TNFR2-transfizierten Zellen eine geringe Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von sTNF erzielt werden (*rechte Bildhälfte*). Obwohl der Unterschied statistisch nicht signifikant war, deutete sich insgesamt eine höhere Sensitivität der TNFR2-

HeLa für sTNF als toxisches Agens an. Dieser Effekt schien zudem in HeLa-TNFR2^{mutant}-Zellen stärker ausgeprägt zu sein als in den Zellen mit TNFR2^{wildtyp}.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurde die Induktion von Zelltod unter Bedingungen getestet, bei denen TNFR2 (durch Cys-R2TNF) einige Stunden vor TNFR1 (durch sTNF) stimuliert wurde. Diese Art von Versuchsaufbau wird seit einigen Jahren verwendet, um die molekularen Mechanismen hinter dem sog. „*Receptor Crosstalk*“ zwischen TNFR1 und TNFR2 (Fotin-Mleczek et al., 2002; Wajant et al., 2003) aufzudecken (s. Einleitung).

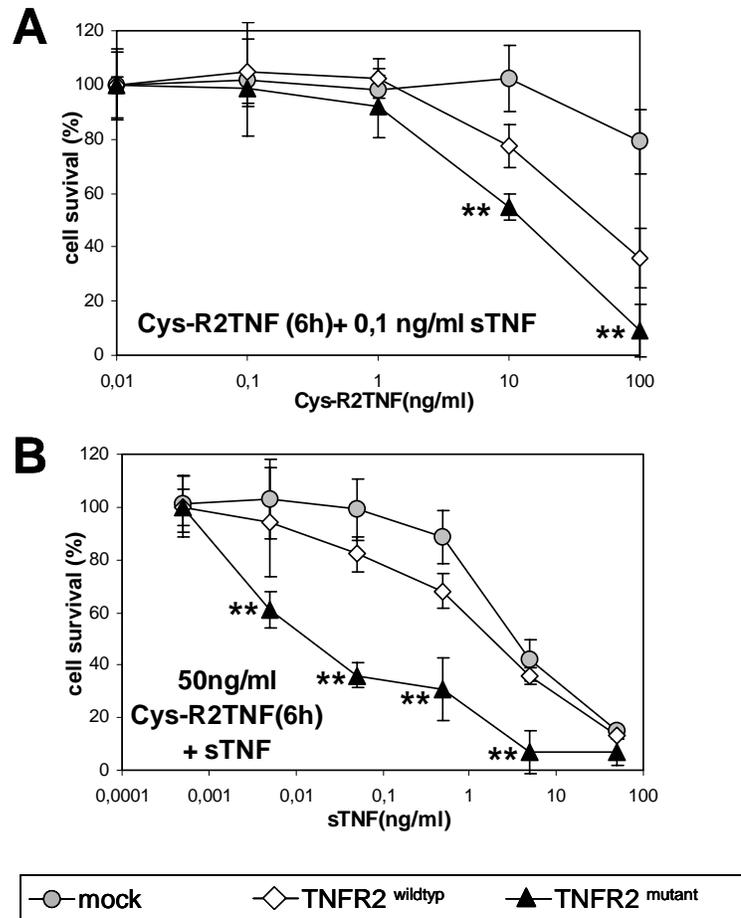


Abb. 19. Zytotoxizität von sTNF nach Vorstimulation mit Cys-R2TNF (6 h). A, konstante Konzentration von sTNF, B, konstante Konzentration von Cys-R2TNF. (***) zeigt hoch signifikante Unterschiede zwischen TNFR2-Wildtyp und der 196Arg-Mutante mit $p < 0,01$.

Wie in Abb. 19 dargestellt, wurde durch Vorstimulation von TNFR2 für 6 h die toxische Wirkung von sTNF in den TNFR2-Zellen verstärkt, wobei die Erhöhung der Toxizität in HeLa-TNFR2^{mutant} deutlicher als in TNFR2^{wildtyp} – Zellen war. Sowohl bei konstanter Konzentration von sTNF (0,1 ng/ml, A) und steigender Cys-R2TNF-Konzentration, als auch im umgekehrten Fall (Cys-R2TNF konstant bei 50ng/ml) war dieser Effekt dosisabhängig. Die verstärkende Wirkung von Cys-R2TNF machte sich erst ab einer Konzentration von ca. 10 – 50 ng/ml bemerkbar und war bei Vorstimulation unter 2 h nicht detektierbar (*nicht gezeigt*). Der Umstand, dass eine Vorstimulationszeit von 4 - 6h nötig ist, um den vollen Effekt durch TNFR2 zu

erzielen, war in guter Übereinstimmung mit der Literatur und spricht für einen fein regulierten und aktiven biochemischen Prozess.

In keiner der MEF-Zelltypen konnte mit irgendeinem TNF α -ähnlichen Stimulus eine toxische Wirkung erzielt werden. Da diese Zellen keine endogenen TNFRs besitzen und in MEF-TNFR2^{wildtyp} und MEF-TNFR2^{mutant} nur der TNFR2 (ohne *death-domain*) überexprimiert wurde, bestätigt dies die Aussage, dass in den untersuchten Zelltypen keine direkte Apoptose-Induktion über TNFR2, wohl aber eine Verstärkung der zelltoxischen TNFR1-Signale möglich ist.

Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse für eine Verstärkung der TNF α -induzierten Zytotoxizität durch TNFR2-Vorstimulation, und zudem für eine höhere Sensitivität der 196Arg-TNFR2 Variante im Vergleich zum Wildtyp-TNFR2.

3.2.2 Charakterisierung des TNF α -induzierten Zelltods - Apoptosenachweis

Um die oben beschriebene TNF α -induzierte Zytotoxizität näher zu charakterisieren und zwischen apoptotischem (programmiertem) und nekrotischem (traumatischem) Zelltod zu unterscheiden, wurden mehrere experimentelle Ansätze gewählt.

Abb. 20 zeigt einen Westernblot gegen das Enzym PARP (poly(ADP-Ribose)-Polymerase), das an der DNA-Reparaturmaschinerie beteiligt ist. In Analogie zu den Ergebnissen aus 3.2.1 erzeugten nur TNFR1-spezifische Stimuli die typische Apoptose-induzierte Abspaltung des 89 kDa-Fragmentes, während Cys-R2TNF keine derartige Spaltung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle verursachte. Da PARP ein Substrat für die Effektor-Caspase Caspase-3 darstellt, spricht diese Beobachtung für eine direkte Involvierung apoptotischer Mechanismen.

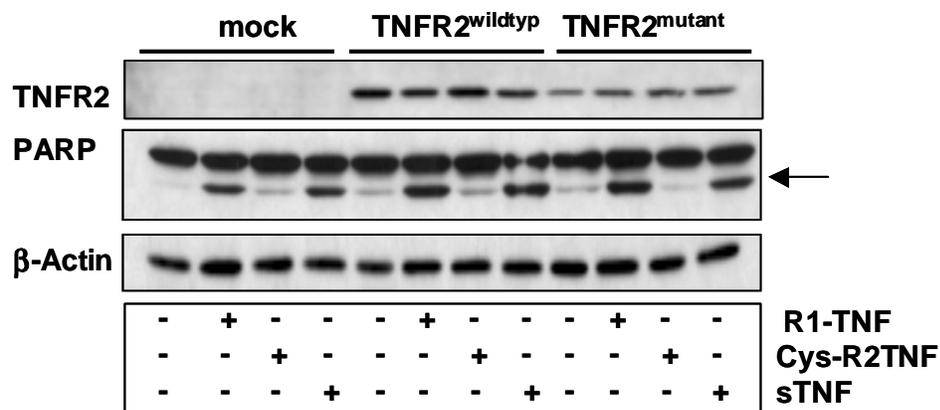


Abb. 20. Nachweis der PARP-Spaltung durch TNF α -ähnliche Stimuli. Zellen wurden für 6 h mit TNF α -Muteinen oder sTNF stimuliert. Der Expressionslevel an TNFR2 und das Spaltprodukt von PARP (Pfeil) wurden durch Westernblot nachgewiesen. β -Actin diente als Mengenkontrolle.

Abb. 21 zeigt isolierte genomische DNA von HeLa-Zellen nach einer Stimulation mit sTNF für 6 h. Nur in den stimulierten Zellen erschienen die spezifischen Bandenmuster der 196bp x *n* langen DNA-Fragmente, die durch die Aktivität der Caspase-induzierten Endonuklease-Aktivität entstehen. Dieser Effekt zeigte sich verstärkt in den Zellen mit TNFR2-Expression und war deutlich dosisabhängig, wie sich in der Titration von sTNF in Abb. 21B zeigt.

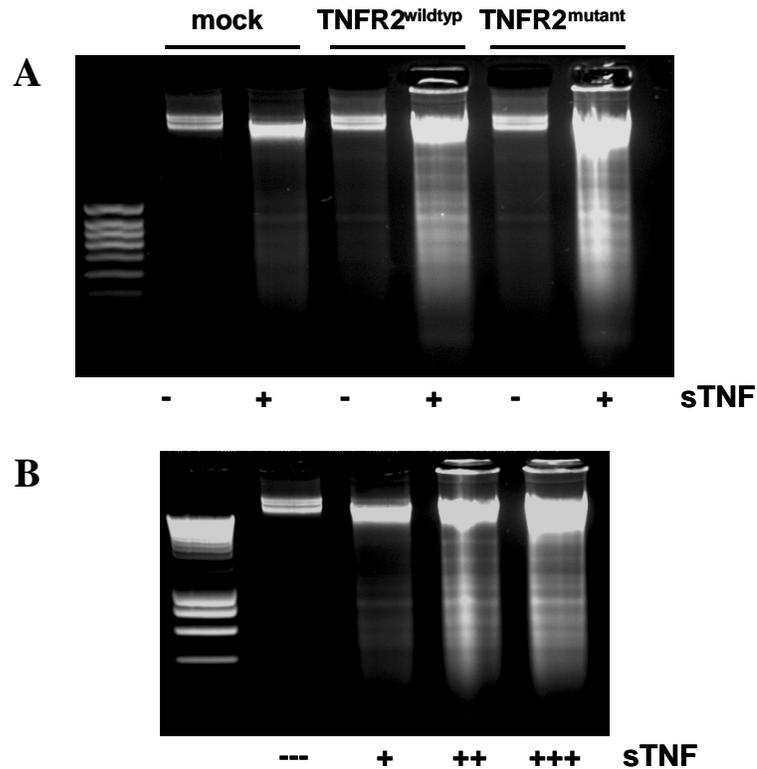


Abb. 21. *DNA-laddering* nach TNF α -Stimulation. A, Stabile HeLa-Zellen wurden für 6 h in Gegenwart von 2,5 μ g/ml CHX mit 10 ng/ml sTNF stimuliert oder unstimuliert belassen. B, HeLa-TNFR2^{wildtyp} wurden für 6 h mit unterschiedlichen Mengen (0, 1, 5 oder 20 ng/ml) sTNF + CHX stimuliert. Je 1 μ g genomische DNA wurde auf einem 1-2%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zur Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die bei der Verstärkung des Apoptosegeschehens durch Verlust des mitochondrialen Membranpotentials entstehen, wurden FACS-Analysen der Zellen nach Inkubation mit einem ROS-sensitiven Farbstoff (DCFH-DA) durchgeführt. Wie in untenstehender Abbildung dargestellt, stieg in den TNFR2-Zellen der ROS-Gehalt durch die Stimulation stärker an als in den Kontrollzellen. Diese Erhöhung des oxidativen Stresses war zudem in den TNFR2^{mutant}-Zellen deutlicher ausgeprägt als in TNFR2^{wildtyp}-HeLa. Dieses Resultat stimmt mit den Beobachtungen aus 3.2.1 und den Analysen der DNA-Degradation überein, wonach Zellen mit der mutierten Form des TNFR2 eine erhöhte Sensitivität gegenüber TNF α -induzierter Zytotoxizität aufweisen.

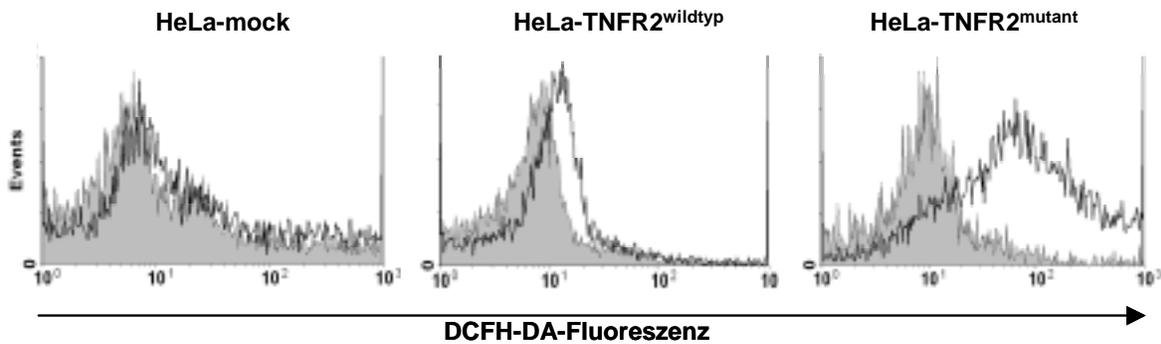


Abb. 22. Nachweis von ROS-Entstehung nach Stimulation mit sTNF. Stabil transfizierte HeLa-Zellen wurden für 6 h mit Cys-R2TNF vorinkubiert und anschliessend für weitere 6 h mit sTNF (10 ng/ml) stimuliert. Die Entstehung von ROS wurde durch die Oxidation von DCFH-DA dokumentiert. Die graue Fläche repräsentiert den unstimulierten Zustand, die schwarze Kurve die Werte nach der Stimulation.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Zelltod abhängig von der Aktivität von Caspasen ist, und ob der NF κ B-Signalweg Einfluss auf das Todesprogramm nehmen kann, wurden dosisabhängige Zytotoxizitäts-Assays in Gegenwart von Inhibitoren (i) der Caspasen-Kaskade (zvad-fmk) bzw. (ii) des NF κ B-Signalwegs (MG132) durchgeführt.

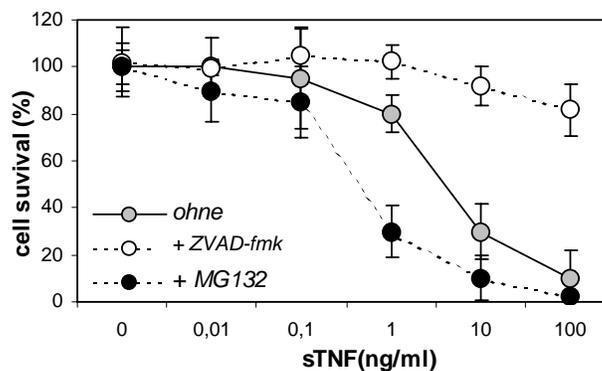


Abb. 23. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den TNF α -induzierten Zelltod. Parentale HeLa-Zellen wurden mit oder ohne pharmakologischen Inhibitor gegen Caspasen (ZVAD-fmk) bzw. die I κ B-Degradation (MG132) für 24 h mit sTNF + CHX behandelt. Der Anteil überlebender Zellen wurde mittels Kristallviolett-Aufnahme ermittelt. Ein typisches Experiment mit gemittelten Doppelansätzen ist gezeigt.

Aus obiger Abbildung wird deutlich, dass durch Einsatz des pan-Caspase-Inhibitors ZVAD-fmk die TNF α -induzierte Apoptose zu ca. 80% verhindert werden konnte. Umgekehrt bewirkte eine Inhibition des NF κ B-Signalwegs eine Verstärkung der toxischen Wirkung.

Die Daten aus den Inhibitor-Versuchen sprechen also für einen Caspasen-abhängigen zytotoxischen Mechanismus, der durch Aktivierung des NF κ B-Signalweges negativ beeinflusst wird.

Durch Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.2.1 und 3.2.2 kann die Art des in dem beschriebenen Zellsystem induzierten TNF α -abhängigen Todesmechanismus folgendermassen charakterisiert werden:

- Dosisabhängigkeit im Bereich 0,1 – 100 ng/ml sTNF
- Erhöhte Sensitivität in TNFR2-HeLa, grösserer Einfluss auf TNFR2^{mutant}
- Verstärkt durch Vorstimulation des TNFR2 für 6 h
- In HeLa-TNFR2^{mutant} verstärkte Entstehung von ROS
- Anzeichen für Apoptose: Morphologie, PARP-Spaltung, DNA-*Laddering*, Caspasen-Abhängigkeit
- Verstärkt durch Inhibition des NF κ B-Signalwegs

In den folgenden Analysen sollte nach möglichen Hintergründen für die differentielle Sensitivität der TNFR2^{mutant} – Zellen gegenüber Zellen mit dem Wildtyp-TNFR2 gesucht werden. Dabei galt es, die beiden Varianten des Rezeptors auf unterschiedlichen Ebenen zu vergleichen.

3.2.3 Kinetik des *shedding*-Verhaltens

Wie in Abb. 24 zu sehen, unterschieden sich die beiden Varianten von TNFR2 nicht bezüglich ihres *shedding*-Verhaltens. Sowohl bei Stimulation mit sTNF als auch mit TNFR2-spezifischem Mutein war schon 10 min nach Stimulation löslicher sTNFR2 im Medium zu detektieren. Die Konzentration stieg in den ersten Stunden linear an, bis sie nach ca. 24 h Stunden ein Maximum erreichte (*nicht gezeigt*). Der Gesamtgehalt von sTNFR2 lag 24 h nach der Stimulation bei ca. 1400 pg/ml pro 1×10^6 Zellen und war für die beiden Varianten nicht unterschiedlich. HeLa-*mock* oder untransfizierte HeLa-Zellen als Kontrollen zeigten keinen detektierbaren sTNFR2-Level.

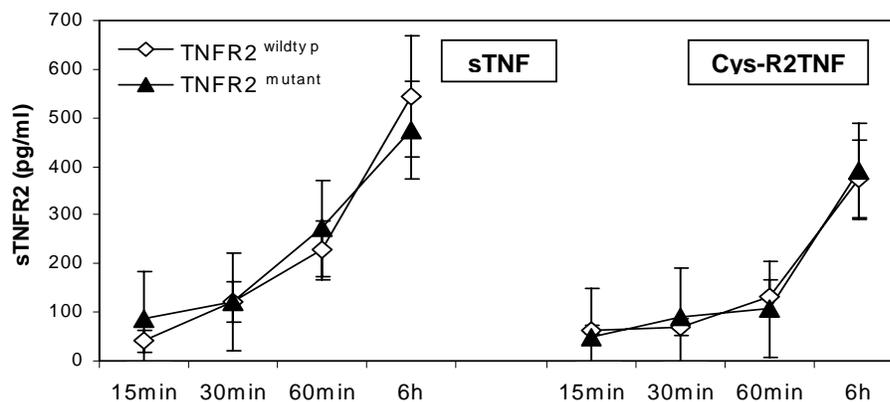


Abb. 24. *Shedding*-Kinetik der TNFR2-Varianten. Die Konzentration an sTNFR2 im Überstand wurde nach Stimulation mit sTNF (*links*) bzw. Cys-R2TNF (*rechts*) durch ELISA ermittelt. Es sind nur die Werte der ersten sechs Stunden Stimulation wiedergegeben.

3.2.4 Physikalische Bindungseigenschaften der TNFR2-Varianten

Um die physikalischen Bindungsparameter für beide TNFR2-Varianten miteinander zu vergleichen, wurden unterschiedliche Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem ^{125}I -TNF α an stabil transfizierten HeLa- und MEF-Zellen durchgeführt.

Kompetitionstest und Scatchard-Analyse wurden an HeLa-Zellen bei 4°C durchgeführt, da bei der niedrigen Temperatur die Bindungskapazität des TNFR1 im Vergleich zu physiologischen Temperaturen deutlich herabgesetzt ist (Grell et al., 1998).

HeLa-Kontrollzellen ohne TNFR2-Expression zeigten eine TNFR2-unabhängige ^{125}I -TNF α -Bindung im Bereich von 700 cpm/ 10^6 Zellen, die auf endogenen TNFR1 und auf unspezifisch gebundenen Liganden zurückzuführen war. Diese Werte unterschieden sich signifikant von den Bindungen an die TNFR2-Zellen und wurden als Leerwert subtrahiert. Wie in Abb. 25 zu sehen, zeigten die Kompetitionstests, bei denen die Bindung des radioaktiven ^{125}I -TNF α an den Rezeptor durch unmarkiertes TNF α verdrängt wurde, keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Affinität der beiden TNFR2-Varianten für sTNF.

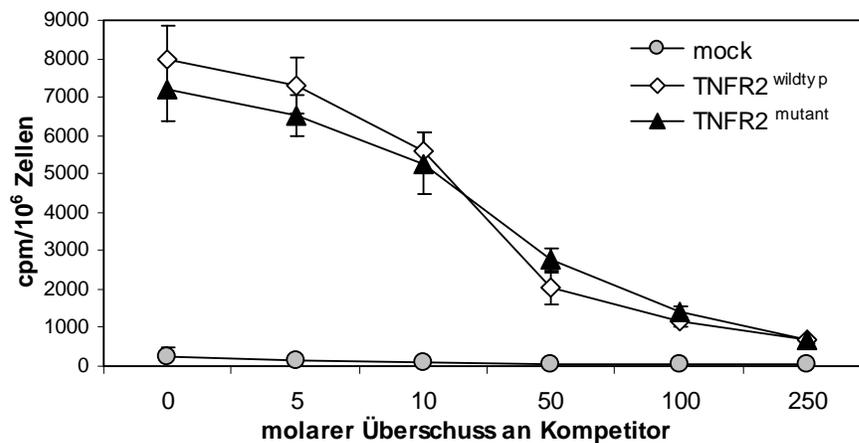


Abb. 25. Kompetitionstest der Bindung von ^{125}I -TNF α an TNFR2-Varianten. Die Bindungsversuche wurden in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen von unmarkiertem sTNF bei 4°C für 4 h durchgeführt.

Auch die Ermittlung der Sättigungskurve (Abb. 26, A) für die Bindung lieferte keinen Hinweis auf differenzielle TNF α -Bindung. Durch mathematische Ableitung (B) der Sättigungsfunktion konnten die K_d -Werte für beide Rezeptor-Varianten bei 4°C ermittelt werden. Diese lagen in den beschriebenen Experimenten bei $5,9 \times 10^{-10}\text{M}$ (TNFR2^{wildtyp}) und $6,5 \times 10^{-10}\text{M}$ (TNFR2^{mutant}) und zeigten keinen signifikanten Unterschied. Damit ergab sich eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten für den $K_{d\text{TNFR2}}$ ($4,2 \times 10^{-10}\text{M}$, (Grell et al., 1998)) und eine Bestätigung der Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen, die zeitgleich zu dieser Arbeit einen funktionellen Vergleich der beiden TNFR2-Varianten an monoklonalen stabil transfizierten HeLa-Zellen durchführten und ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Bindeverhalten nachweisen konnten (Morita et al., 2001).

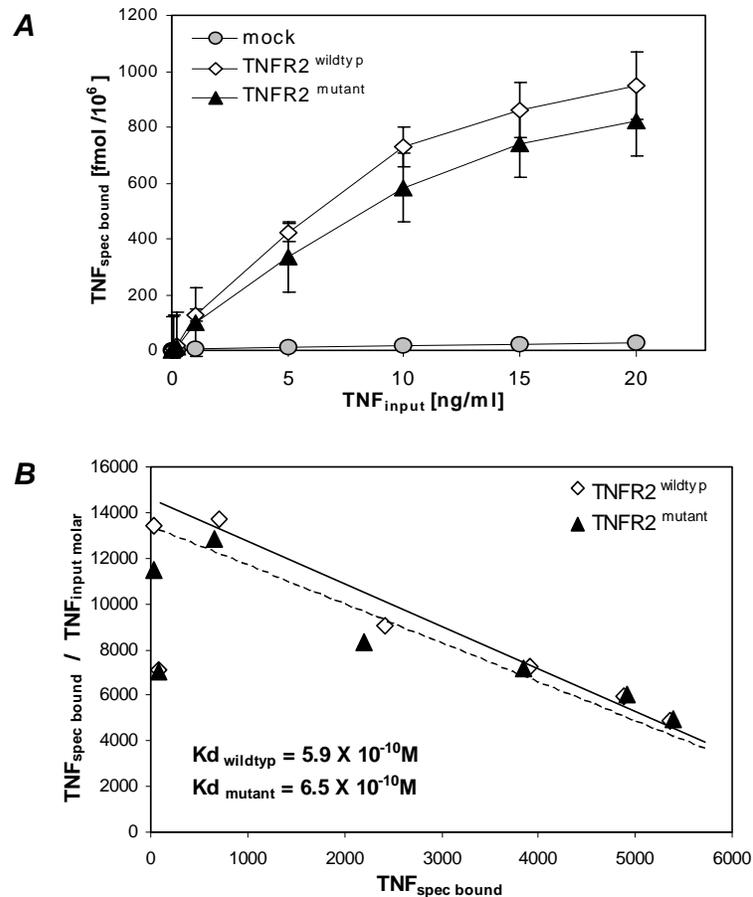


Abb. 26. Bestimmung der K_d-Werte für beide TNFR2-Varianten. A Sättigungskurve der TNF α -Bindung bei Einsatz unterschiedlicher Mengen ¹²⁵I-TNF α , B die daraus abgeleitete Linearisierung zur Bestimmung der Bindungskonstante K_d. Die Inkubationen wurden bei 4°C durchgeführt.

Um den störenden Einfluss der Bindung von ¹²⁵I-TNF α an endogenen TNFR1 bei physiologischen Temperaturen auszuschliessen, sind für die Ermittlung der Assoziations- und Dissoziationszeiten bei 37°C stabil transfizierte MEF-Zellen mit vergleichbarer TNFR2-Expression verwendet worden.

Wie in nachfolgender Abbildung zu sehen, konnten keine Unterschiede in der Bindungskinetik der beiden TNFR2-Varianten für TNF α ermittelt werden. Die Halbwertszeit der Assoziation $T_{1/2}^{ASS}$ betrug ca. 60 - 75 sec für beide Varianten ohne signifikanten Unterschied, die Dissoziationszeit $T_{1/2}^{DISS}$ lag ebenfalls für beide Varianten bei 65 – 75 sec. Durch Vorinkubation der Zellen mit dem anti-TNFR2-Antikörper 80M2, der zum Crosslinken der Rezeptorkomplexe verwendet wird, liess sich die Dissoziationszeit von TNF α vom Rezeptorkomplex drastisch verlängern (ungefähr Faktor 10), doch auch hier zeigten die Dissoziationskurven von TNFR2^{wildtyp} und TNFR2^{mutant} keinen statistisch signifikanten Unterschied.

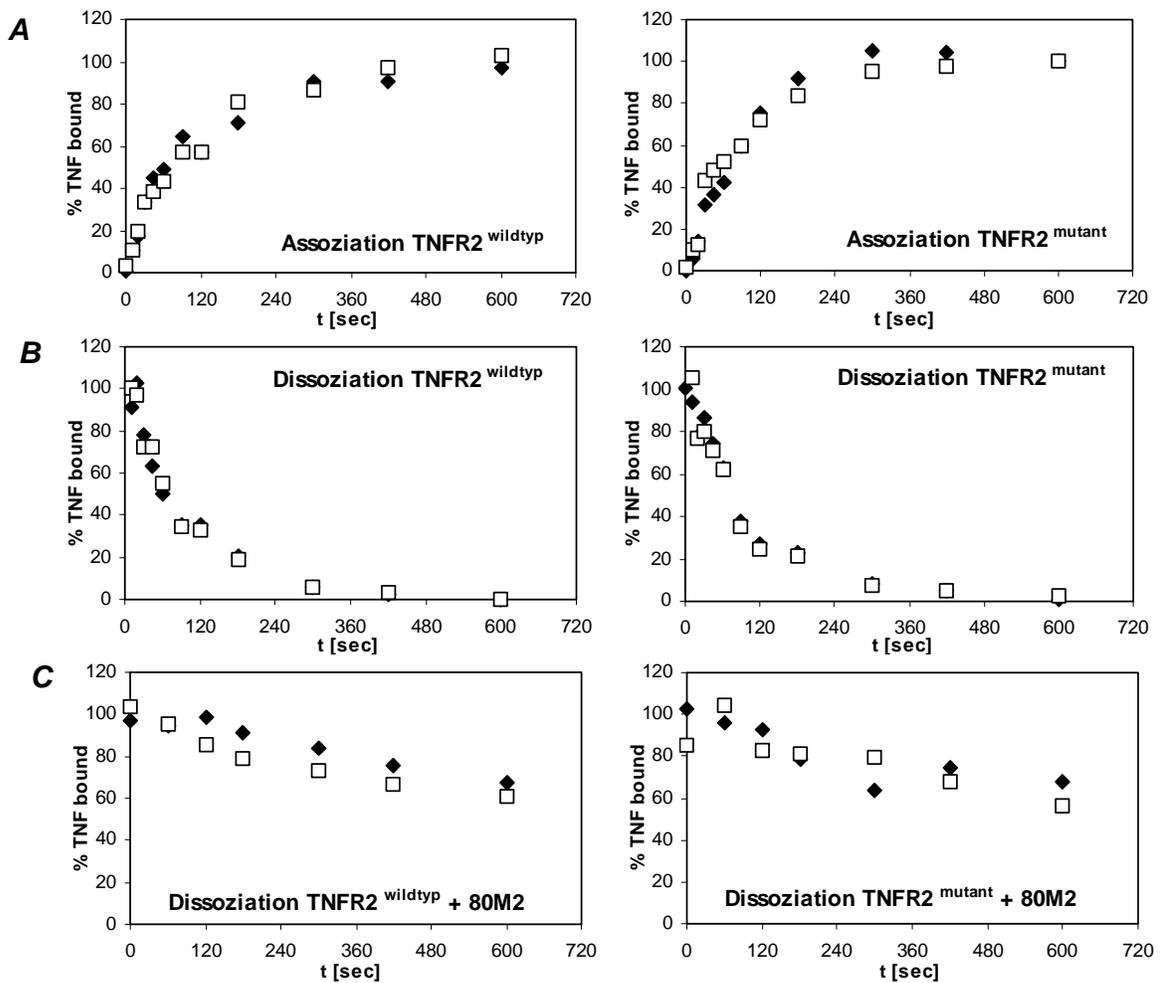


Abb. 27. Kinetik der Bindung von ^{125}I -TNF α an TNFR2-Varianten. A Assoziationskinetik von TNF α , B Dissoziationskinetik bei Zugabe von 100fachem molarem Überschuss an unmarkiertem TNF α , C Dissoziationskinetik nach „Crosslinken“ mit 80M2.

Zusammenfassend scheinen weder der *shedding*-Mechanismus noch die physikalischen Bindungseigenschaften (Kd-Wert, Assoziations- und Dissoziationskinetik von sTNF) des Rezeptors von der Mutation beeinflusst zu werden.

3.2.5 Signaltransduktionsprozesse durch TNFR2

Mit Hilfe von Westernblot-Analysen mit phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern sollten die molekularen Prozesse nach einer Stimulation des TNFR2 näher analysiert werden. Dabei wurden nach Stimulation von HeLa-Zellen mit 200ng/ml Cys-R2TNF zum einen verschiedene Untergruppen der MAPKs (ERK1/2, p38, JNK), zum anderen die Signalkaskade des klassischen NF κ B-Signalwegs untersucht.

Wie in Abb. 28 zu sehen, zeigte sich nach Stimulation mit Cys-R2TNF kein Anstieg der phosphorylierten aktiven Form von p38MAPK und ERKs, was darauf hindeutet, dass diese beiden MAPKs im benutzten Zellsystem nicht über TNFR2 aktiviert werden. Im Gegensatz hierzu wurde cJun, das primäre Substrat der JNK-Untergruppe der MAPKs, eindeutig bereits 10 – 30 min nach TNFR2-Stimulation phosphoryliert, was für eine TNFR2-induzierte Aktivierung der JNK-Kaskade spricht.

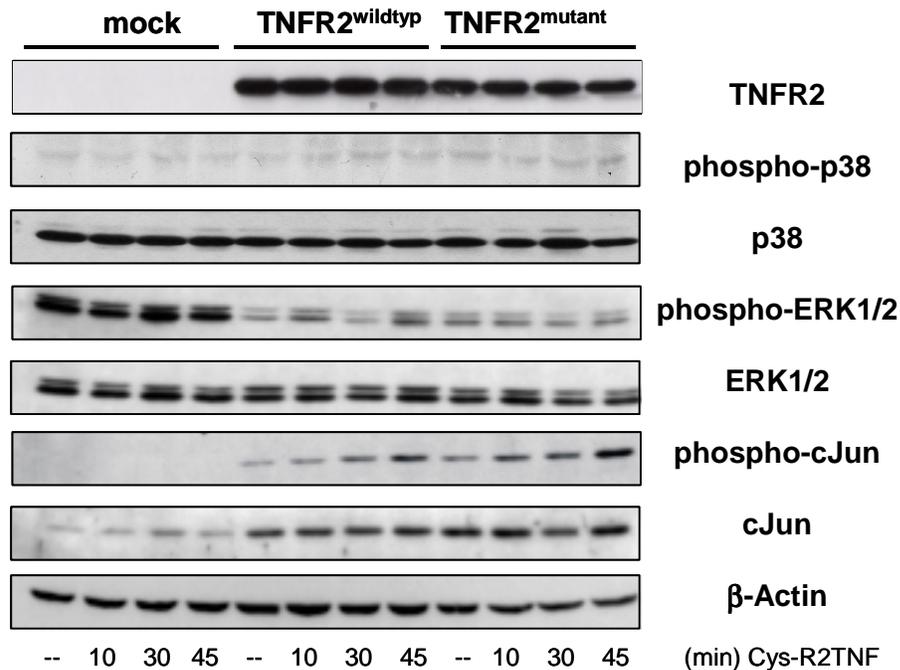


Abb. 28. Signaltransduktionsprozesse durch TNFR2 – MAPK-Kaskade. Stabil transfizierte HeLa-Zellen wurden für unterschiedliche Zeit mit Cys-R2TNF stimuliert. Der Nachweis der phosphorylierten (aktiven) Formen der entsprechenden MAPK bzw. ihrer Substrate erfolgte durch Westernblotting mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper.

Allerdings lässt sich aus diesen Daten keine differentielle Aktivierung von JNK durch die beiden TNFR2-Varianten ableiten. Auffallend war zudem ein erhöhter Level an cJun-Gesamtprotein in den TNFR2-Zellen. Da die Expression des cJun-Proteins selbst durch Aktivierung von MAPKs reguliert werden kann, lässt sich dieses Phänomen möglicherweise durch eine positive Rückkopplungs-Regulation durch TNFR2-Transfektion erklären. Demnach könnte die Überexpression des Rezeptors auch ohne direkte Stimulation für die moderate Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege verantwortlich sein, wie nachfolgende Ergebnisse der Reporter-gen-Messungen ebenfalls nahelegen.

Die hier sichtbaren Unterschiede in der Grundaktivität von ERKs zwischen *mock*-transfizierten HeLa-Zellen und TNFR2-HeLa lässt sich in diesem Zusammenhang nur durch geringe Unterschiede in der Zelldichte und dadurch induzierte Modulation der ERK-Kaskade erklären. Da dieses Phänomen allerdings nicht bei allen Stimulationsexperimenten auftrat und der Gesamtexpressionslevel von ERKs zwischen den Zellpopulationen gleich war, schien es sich hier nicht um einen generellen, TNFR2-abhängigen Mechanismus zu handeln.

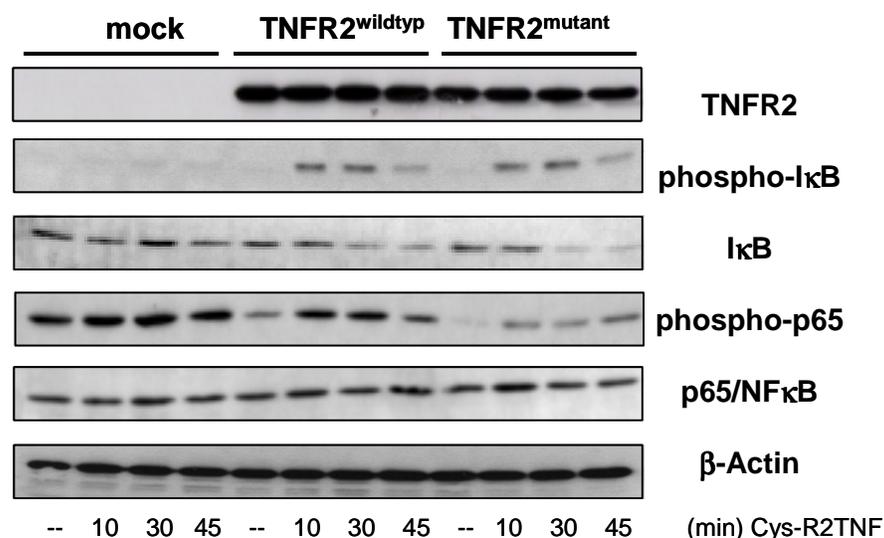


Abb. 29. Signaltransduktionsprozesse durch TNFR2 - NFκB-Signalweg.

Abb. 29 zeigt deutliche Hinweise auf eine TNFR2-induzierte Aktivierung des NFκB-Signalwegs. Während HeLa-*mock* keine zeitabhängigen Unterschiede in Gesamtproteingehalt und Phosphorylierungsmuster der Komponenten des NFκB-Signalwegs aufwies, konnten in beiden HeLa-TNFR2-Linien typische Prozesse der NFκB-Aktivierung gezeigt werden. Bereits 10 min nach Stimulation mit TNFR2-spezifischem Mutein wurde IκB, der zytosolische Inhibitor von NFκB, phosphoryliert und anschliessend innerhalb von nur 30-45 Minuten fast vollständig degradiert. Parallel hierzu kam es zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der NFκB-Komponente p65/NFκB mit einem schnellen Anstieg der Phosphorylierung bei TNFR2^{wildtyp} und einer scheinbar etwas später einsetzenden und schwächeren bei TNFR2^{mutant}. Der Gesamtgehalt an p65-Protein war in allen drei Zelltypen identisch.

Fazit: Die Stimulationsexperimente mit Cys-R2TNF sprechen für eine Aktivierung des JNK- und des NFκB-Signalwegs über TNFR2, während die MAPKs p38 und ERK nicht involviert sind. Ausserdem liefern diese Resultate Hinweise auf eine differentielle Aktivierung zumindest des NFκB-Signals mit einer verminderten Aktivierung durch die 196Arg-Mutante des TNFR2.

3.2.6 Quantifizierung der NF κ B-Aktivierung – Hinweise auf geringere NF κ B-Signalstärke durch TNFR2^{mutant}

Um den Einfluss der TNFR2-Varianten auf die Aktivierung des NF κ B-Signalweges zu quantifizieren, wurden NF κ B-Reporter-Gen-Assays mit HeLa- und MEF-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen TNF α -ähnlichen Stimuli durchgeführt.

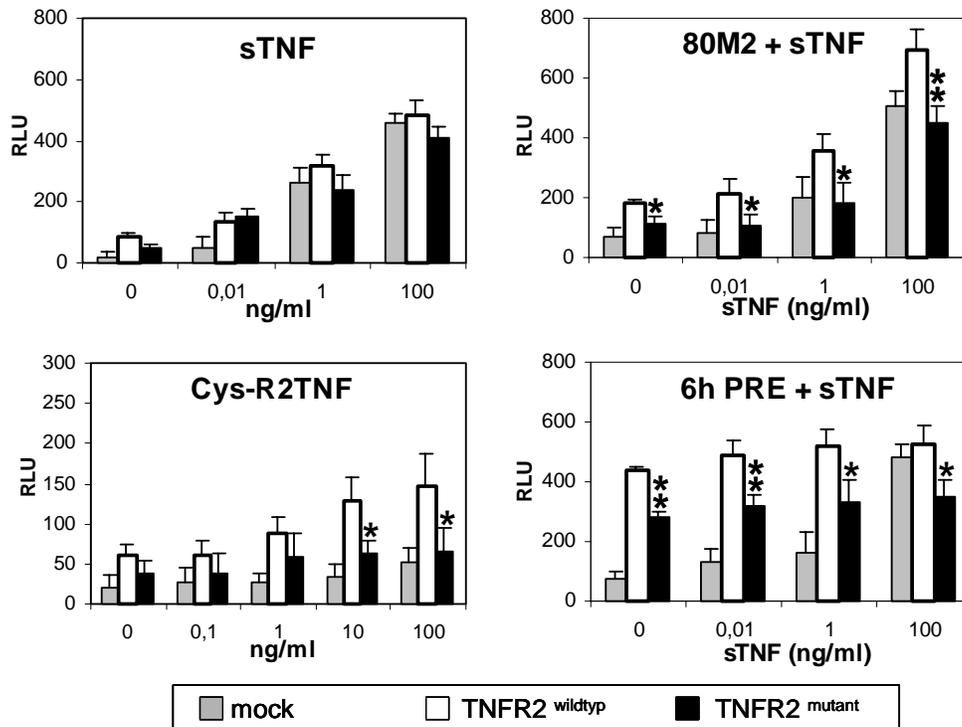


Abb. 30. NF κ B-Aktivierung durch TNF α -ähnliche Stimuli. Die Aktivität des NF κ B-abhängigen Reporter-Gen-promoters wurde durch transiente Transfektion an HeLa-Zellen und Dual Luciferase Assay bestimmt. Die Messungen wurden durch Kotransfektion einer konstitutiv aktiven zweiten Luciferase normalisiert. RLU = *relative light units*, PRE = Vorstimulation mit Cys-R2TNF; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ für TNFR2^{wildtyp} gegen TNFR2^{mutant}.

Durch exklusive Stimulation des TNFR1 mit R1-TNF ergab sich kein Unterschied zwischen den drei Transfektionsansätzen (*nicht gezeigt*). Wie in Abb. 30 zu sehen, zeigte eine Stimulation mit sTNF ebenfalls keine auffälligen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen, allerdings konnte in einigen Experimenten eine geringe Erhöhung (ca. 10-20%) der NF κ B-abhängigen Reporteraktivität in HeLa-TNFR2^{wildtyp} gegenüber den beiden anderen Zelltypen nachgewiesen werden. Auffallend war ausserdem eine reproduzierbare geringe Erhöhung der NF κ B-Aktivität in beiden TNFR2-Zelltypen bei niedrigen Konzentrationen von sTNF (0,01 – 0,1 ng/ml). Dieses Phänomen könnte durch den Mechanismus des *Ligand-Passings* erklärt werden, bei dem TNFR2 die lokale Konzentration von sTNF

durch schnelle Assoziations-Dissoziationskinetiken deutlich erhöht und so die Zellen für TNFR1-abhängige Signaltransduktion sensitiviert.

Die Stimulationsexperimente mit sTNF in Verbindung mit 80M2 zeigten, dass HeLa-TNFR2^{wildtyp} im Vergleich zu den beiden anderen Zelltypen eine höhere NFκB-Aktivierbarkeit aufwies (Unterschiede statistisch signifikant, hochsignifikant bei 100ng/ml sTNF).

Bei exklusiver Stimulation des TNFR2 mit Cys-R2TNF reagierten nur die TNFR2-Zellen auf das Mutein, während in *mock*-transfizierten HeLa-Zellen keine Aktivierung nachzuweisen war. Obwohl die Signalstärke im Vergleich zu TNFR1-induzierter Signalgebung um einige Grössenordnungen geringer war, liess sich diese Aktivierung eindeutig dosisabhängig nachweisen. Ausserdem zeigte sich ein klarer und statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den beiden TNFR2-Varianten: TNFR2^{wildtyp} vermittelte eine stärkere Aktivierung des NFκB-Signalwegs ab einer Mutein-Konzentration von ca. 1 - 10 ng/ml. Nach Stimulation mit 100ng/ml Cys-R2TNF lag das NFκB-Signal für TNFR2^{wildtyp} um den Faktor 2 höher als für die Mutante ($p < 0,05$). Dies bestätigte auf statistisch auswertbare Weise die Beobachtung anhand der phospho-spezifischen Westernblots und legte gleichzeitig den Konzentrationsbereich für weitere Versuche mit Cys-R2TNF fest.

Als nächstes wurde die NFκB-Aktivierung unter Bedingungen gemessen, bei denen der TNFR2 für 6h vorstimuliert wurde, bevor TNFR1 durch sTNF aktiviert wurde. Dieser experimentelle Aufbau spiegelte die Situation wider, bei der ein erheblicher Einfluss des TNFR2 auf die TNFα-vermittelte Zytotoxizität nachgewiesen werden konnte (s. 3.2.1). Wie in Abb. 30 (*rechts, unten*) verdeutlicht, bewirkte die Vorstimulation von TNFR2 ein Ansteigen der NFκB-Aktivität in den TNFR2-Zellen. Gleichzeitig wurde allerdings nur in diesen eine weitere Aktivierung durch sTNF erschwert bzw. verhindert. Während leertransfizierte HeLa-Zellen einen dosisabhängigen Anstieg der Reporteraktivität zeigten, ergab die Aktivierung für beide TNFR2-Varianten keinen weiteren Anstieg durch sTNF-Stimulation. Das Gesamtaktivierungspotential war auch hier für Wildtyp-TNFR2 deutlich höher als für die Mutante TNFR2(196Arg).

Die Inhibierung der TNFR1-abhängigen NFκB-Aktivierung durch Vorstimulation von TNFR2 mag einen der Mechanismen darstellen, die zu einer Sensitivierung der betroffenen Zellen für TNFα-induzierte Zytotoxizität beitragen (s. Diskussion).

Um die TNFR2-abhängige NFκB-Aktivierung unter Bedingungen zu testen, unter denen kein endogener TNFR1 exprimiert wird, und um die Ergebnisse aus HeLa-Zellen in einem anderen Zelltyp zu überprüfen, wurden ausgewählte Reporter-Experimente an MEF aus TNFR1^{-/-} / TNFR2^{-/-} - doppel-*knock-out*-Mäusen wiederholt.

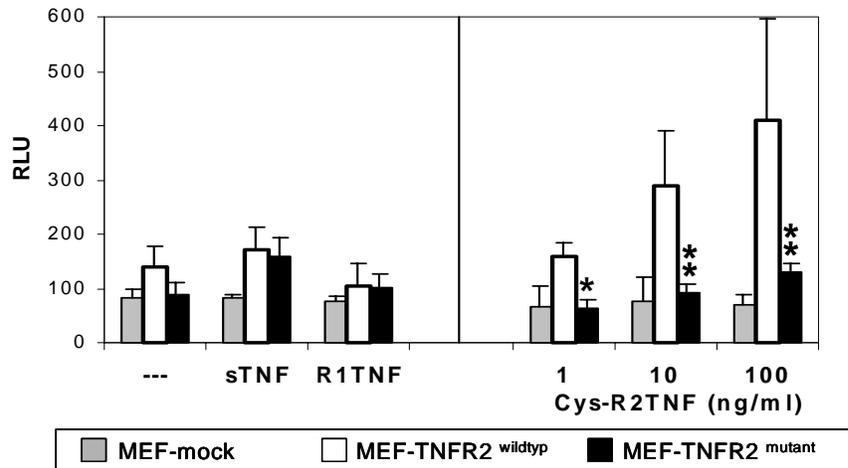


Abb. 31. NF κ B-Aktivierung in MEF. Transiente Transfektion, Stimulation und Messung von Luziferase-Aktivität wurde an immortalisierten MEF aus TNFR-*knock-out*-Mäusen durchgeführt. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ für TNFR2^{wildtyp} gegen TNFR2^{mutant}.

Wie in Abb. 31 dargestellt, zeigten nur TNFR2-aktivierende Stimuli eine Wirkung in den TNFR2-transfizierten Zellen. Lösliches TNF α konnte alleine und in Verbindung mit 80M2 (*nicht gezeigt*) den NF κ B-Signalweg aktivieren, R1-TNF hatte keine messbare Wirkung, Cys-R2TNF erzeugte in TNFR2-Zellen eine signifikante und dosisabhängige Aktivierung des NF- κ B Reportergens. Auch in diesen Zellen zeigte der Wildtyp des TNFR2 eine grössere Fähigkeit zur NF κ B-Aktivierung als die Mutante. Bei der Ermittlung der Dosisabhängigkeit bewirkte der TNFR2^{wildtyp} eine um Faktor 2-3 höhere NF κ B-Aktivierung im Vergleich zu TNFR2^{mutant}. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen aus den HeLa-Zellen und argumentieren für eine autonome, d.h. TNFR1-unabhängige Signalantwort über TNFR2.

Sowohl in HeLa-Zellen als auch in MEFs zeigte die Analyse der Luziferase-Assays, dass im unstimulierten Zustand die NF κ B-Aktivität in den Ansätzen für TNFR2^{wildtyp}-Expression gegenüber den anderen Zellen erhöht war. Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression des TNFR2^{wildtyp} ohne Stimulation des Rezeptors schon für eine moderate Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade verantwortlich ist. Bei Einsatz gleicher Plasmid-Mengen und bei gleichem Expressionslevel des Zielproteins liess sich dieser Effekt bei TNFR2^{mutant} nicht nachweisen.

Fazit der Luziferase-Messungen zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs: Insgesamt spricht unsere quantitative Analyse der NF κ B-Aktivität für eine verminderte Fähigkeit der Rezeptor-Mutante TNFR2(196Arg) zur Aktivierung des antiapoptotischen/proinflammatorischen NF κ B-Signalwegs. Dieser Effekt konnte sowohl in HeLa-Zellen als auch in MEF nachgewiesen werden und zeigte sich durch Stimulation mit Cys-R2TNF und durch Kombination von sTNF mit 80M2. Eine Vorstimulation des TNFR2 erhöhte die Gesamtaktivität, unterband jedoch eine anschliessende Aktivierung über TNFR1.

3.2.7 Analyse der durch die TNFR2-Varianten induzierten Genexpression

Damit die Ergebnisse aus den Luziferase-Assays auf Ebene der Genexpression überprüft werden konnten, wurden stabil transfizierte HeLa- und MEF-Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Mengen Cys-R2TNF (0- 100 ng/ml) stimuliert. Die Expression von ausgewählten TNF α -Zielgenen wurde mittels RT-PCR und (sofern möglich) ELISA überprüft.

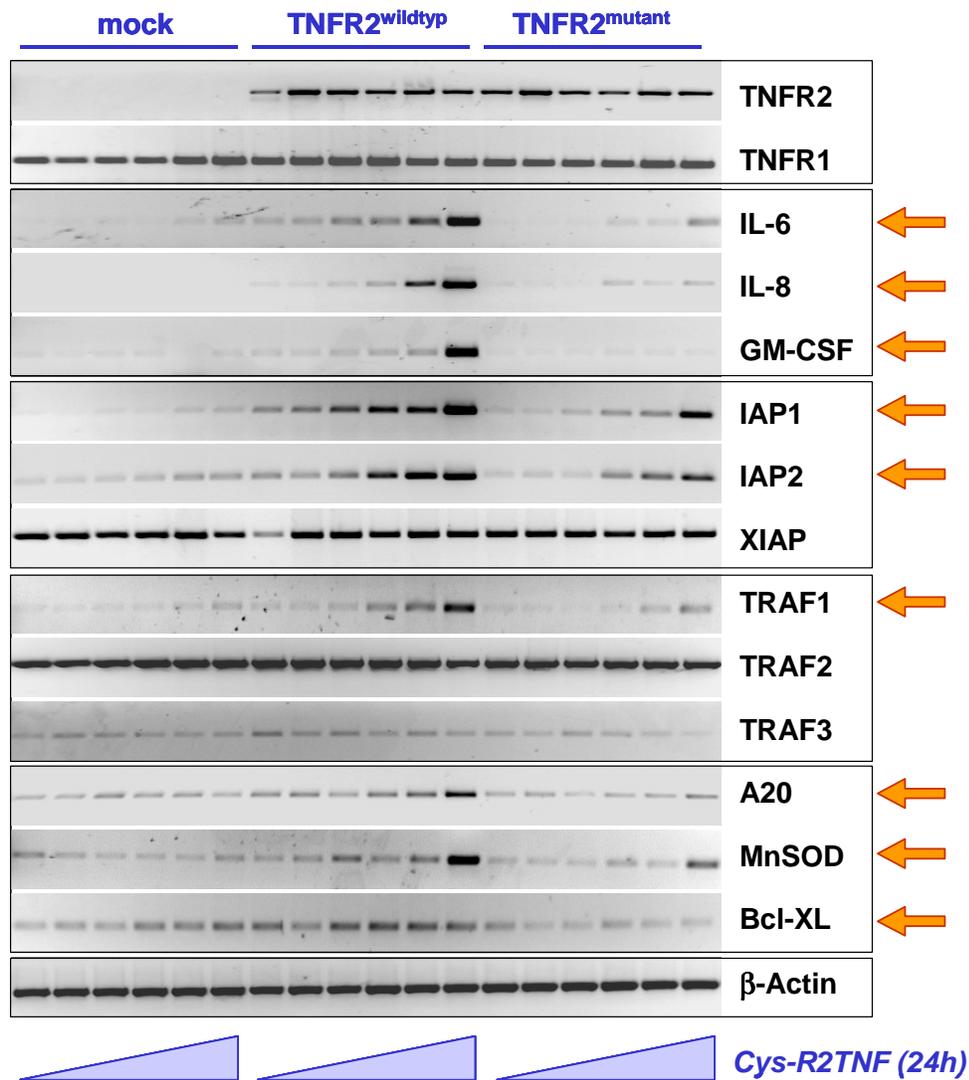


Abb. 32. RT-PCR gegen TNF α -Zielgene nach Stimulation mit unterschiedlichen Mengen Cys-R2TNF. Die durch die Kästchen ange deutete Gruppierung der Gene bezieht sich auf ihren funktionellen Hintergrund (s. Text). Die Pfeile am rechten Rand markieren Gene, für die in dem benutzten Zellsystem eine Induzierbarkeit über TNFR2 nachgewiesen werden konnte.

Die untersuchten Gene gliederten sich in mehrere Gruppen: Bei Analyse der TNF α -Rezeptor-Subtypen ergab sich eine vergleichbare Expression von TNFR2 in HeLa-TNFR2^{wildtyp} und HeLa-TNFR2^{mutant}, während *mock*-transfizierte HeLa-Zellen keine TNFR2-Expression aufwiesen. TNFR1 wurde von allen

drei Zelltypen gleich stark exprimiert. Aus der Gruppe der durch $\text{TNF}\alpha$ induzierbaren Zytokine konnten in den verwendeten HeLa-Zellen IL-6, IL-8 und GM-CSF nachgewiesen werden. Alle drei Zytokine zeigten ein beinahe identisches Expressionsmuster mit einer starken Expressionssteigerung ab ca. 33 ng/ml und einer Maximalexpression bei 100ng/ml Cys-R2TNF. Ausserdem war die Expression der Zytokine in den $\text{TNFR2}^{\text{mutant}}$ -Zellen deutlich schwächer ausgeprägt als in $\text{TNFR2}^{\text{wildtyp}}$ -HeLa. In der Gruppe der IAPs konnte für IAP1 und IAP2 eine TNFR2 -abhängige Expressionssteigerung gezeigt werden, während XIAP nicht über TNFR2 induzierbar war. Auch hier ergab sich eine geringere Induzierbarkeit durch die $\text{TNFR2}^{196\text{Arg}}$ -Variante. Von den hier untersuchten TRAFs konnte nur TRAF1 als $\text{TNF}\alpha$ -induzierbar identifiziert werden, TRAF2 und TRAF3 zeigten keine Veränderung ihrer konstitutiven Expression. In der letzten Gruppe, die allgemeine antiapoptotische (A20, BclXL) und antioxidative (MnSOD) Gene umfasste, zeigte sich ebenfalls eine Induzierbarkeit über TNFR2 mit höherer Expression bei $\text{TNFR2}^{\text{wildtyp}}$, allerdings war dieser Effekt nicht immer so stark ausgeprägt wie bei den anderen Gengruppen. Zusätzlich untersuchte antioxidative Enzyme (CuZnSOD, Catalase) wurden nicht durch $\text{TNF}\alpha$ reguliert (*nicht gezeigt*).

Für eine bessere Verdeutlichung des Zusammenhanges zwischen Cys-R2TNF-Stimulation und Expressionsmuster der angesprochenen Gene wurden die Resultate mehrerer RT-PCRs für das gleiche Gen densitometrisch ausgewertet und die relative Expression als Funktion der Muteinkonzentration aufgetragen:

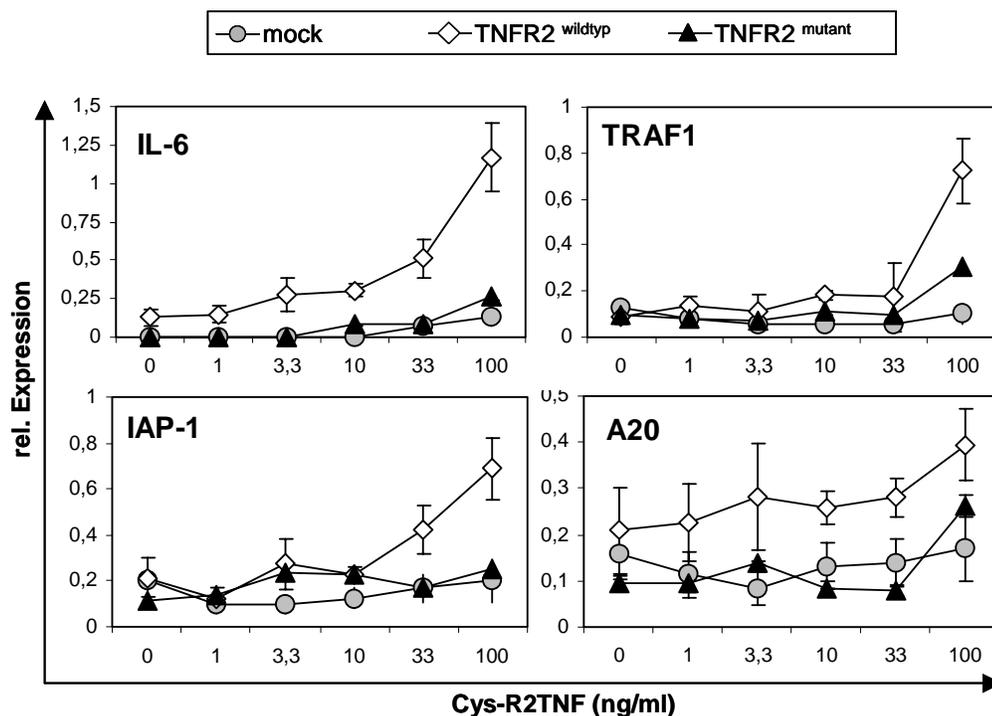


Abb. 33. Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Analysen. Die Mittelwerte mehrerer Parallelexperimente ($n=3$) wurde nach Normalisierung bezüglich GAPDH oder β -Actin gegen die Konzentration an Cys-R2TNF aufgetragen. Es sind vier Beispiele für typische Resultate dargestellt.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, zeigten die hier untersuchten TNF α -Zielgene ein weitgehend identisches Expressionsmuster: Ab einer Cys-R2TNF-Konzentration von 10 – 33 ng/ml zeigte sich eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression. Für alle untersuchten TNF α -regulierten Gene zeigte sich dabei bei vergleichbarer Rezeptor-Expression eine geringere Induzierbarkeit in den TNFR2^{mutant}-Zellen, allerdings war dieser Effekt nicht in allen Fällen gleich stark ausgeprägt. Leertransfizierte HeLa-Zellen ohne TNFR2-Expression zeigten dagegen keine Geninduktion durch Cys-R2TNF.

Eine parallele Analyse in den stabilen MEF-Zellen ergab ein vergleichbares Bild mit einer differentiellen Expression von IL-6, TRAF1 und GM-CSF (*nicht gezeigt*), IAP1 wurde in diesen Zellen allerdings konstitutiv exprimiert. Auch in diesen Zellen war die Geninduktion über die TNFR2-Mutante im Vergleich zum Wildtyp verringert.

Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene liessen sich für einige Gene auf Proteinebene überprüfen. Abb. 34 zeigt die Konzentrationen von sezerniertem IL-6 und IL-8 nach 24stündiger Stimulation mit unterschiedlichen Mengen Cys-R2TNF.

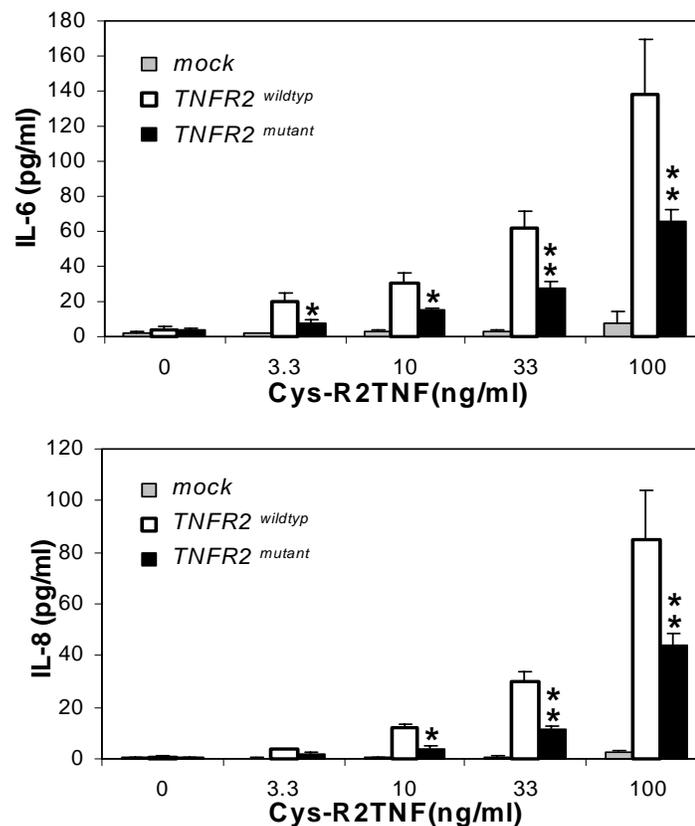


Abb. 34. ELISA-Messung von IL-6 und IL-8 im Medium nach 24 h Stimulation mit TNFR2-Mutein. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ für TNFR2^{wildtyp} gegen TNFR2^{mutant}.

Wie zu erwarten, liess sich in leertransfizierten HeLa-Zellen keine Zytokin-Produktion nachweisen, während TNFR2-Zellen auf den Stimulus mit der Sekretion von proinflammatorischem IL-6 und IL-8 reagierten. Die Expression von GM-CSF liess sich mit Hilfe von ELISA im Zellüberstand nicht

nachweisen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Translation der GM-CSF-RNA durch bestimmte Elemente in der 3'-UTR (*untranslated region*) in Abhängigkeit von Zelltyp stark restringiert ist (Grosset et al., 2004).

Die Ergebnisse der ELISA-Messungen bestätigten die Ergebnisse der mRNA-Analyse durch RT-PCR zumindest für die Zielgene, für die diese Methoden angewendet werden konnte: TNFR2^{wildtyp} besitzt eine grössere Fähigkeit zur Expression von NF κ B-abhängigen TNF α -Zielgenen als TNFR2^{mutant}. Damit stimmten diese Resultate sowohl mit der quantitativen NF κ B-Analyse (Reportergergen Experimente) als auch mit der oben beschriebenen Expressionsanalyse auf RNA-Niveau überein.

3.2.8 Regulation von MnSOD als Beispiel für ein differentiell exprimiertes TNF α -Zielgen

Das antioxidative Enzym MnSOD (Mangan-abhängige Superoxiddismutase) konnte als eines der Gene identifiziert werden, die in dem verwendeten Zellsystem über TNFR2 reguliert werden. Zudem zeigten RT-PCR und Densitometrie, dass die Induktion der mRNA nach Stimulation des TNFR2-Wildtyp-Allels stärker ausgeprägt ist als nach Stimulation der 196Arg-Variante des TNFR2 (s. **Abb. 36**).

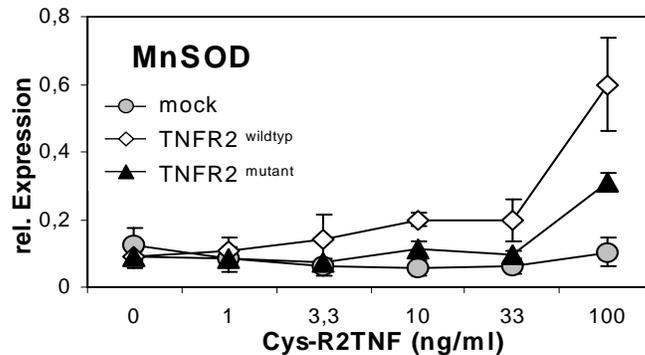


Abb. 35. Expressionsmuster der MnSOD durch Stimulation mit TNFR2-Mutein. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten in stabilen HeLa-Zellen.

Die Stimulation mit sTNF nach Quervernetzung mit 80M2 bewirkte bereits 6 h nach Stimulation eine Geninduktion, wobei wiederum die TNFR2^{wildtyp}-Zellen eine deutliche Expressionssteigerung gegenüber der Mutante aufwiesen (Abb. 36).

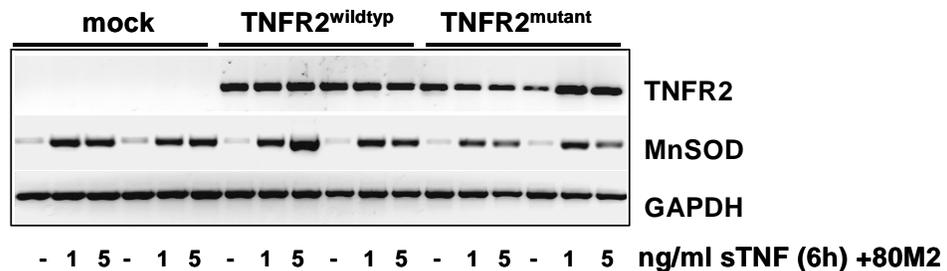


Abb. 36. Expression der MnSOD nach Stimulation mit sTNF in Verbindung mit 80M2. Gezeigt sind RT-PCR-Daten nach 6 h Stimulation in Anwesenheit von 80M2.

Um diese Unterschiede in der Induzierbarkeit funktionell näher zu analysieren, wurden Reportergerkonstrukte mit wichtigen regulatorischen Bereichen des MnSOD-Gens (*proximal promoter region* PPR, *tnf responsive element* TNFRE) hergestellt und nach unterschiedlichen Stimulationen im DLA untersucht.

Wie in Abbildung 37 gezeigt, wurde die Promoteraktivität der MnSOD nur durch Stimuli erhöht, die den TNFR1-Subtyp aktivieren. TNFR2-Mutein zeigte keinen Einfluss auf die Luziferase-Aktivität, ausserdem konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den drei Zelltypen gefunden werden.

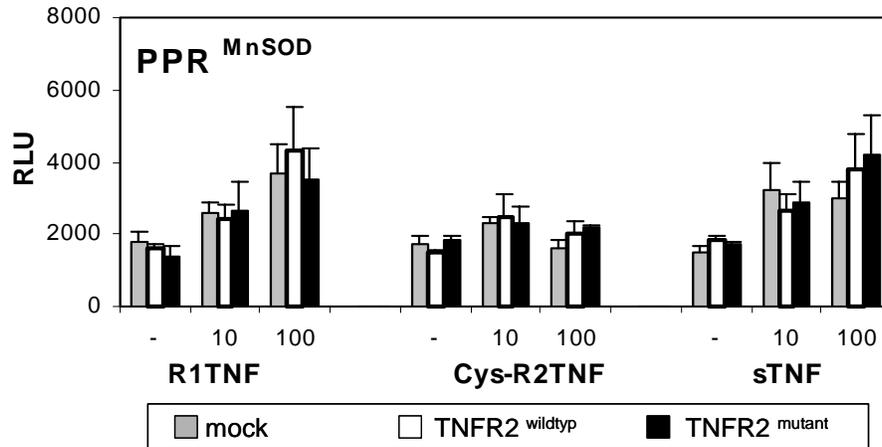


Abb. 37. Aktivität der PPR nach 6 h Stimulation. Die Messungen des DLA wurden anhand eines pGL3(E)_PPR- Konstruktes durchgeführt und bezüglich der Transfektionseffizienz normalisiert. RLU = *relative light units*, PPR = *proximal promoter region*.

Bei der Untersuchung des TNFRE aus dem zweiten Intron der MnSOD zeigte sich, dass alle TNF-ähnlichen Stimuli (R1-TNF, Cys-R2TNF, sTNF) eine starke Erhöhung der Luziferase-Aktivität bewirkten. Signifikante Unterschiede zwischen den TNFR2-Varianten zeigten sich nur bei Einsatz von Cys-R2TNF. In Abb. 38 ist eine Auswahl der Daten dargestellt:

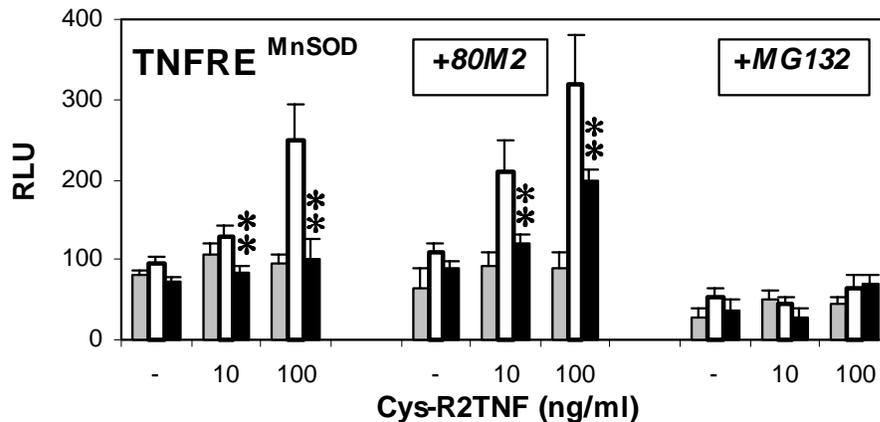


Abb. 38. Aktivität des TNFRE nach 6 h Stimulation. Die Messungen des DLA wurden anhand eines pGL3(P)_TNFRE- Konstruktes durchgeführt und bezüglich der Transfektionseffizienz normalisiert. Legende: s.o., RLU = *relative light units*, TNFRE = *tnf responsive element*, 80M2 = crosslinkender Antikörper, MG132 = pharmakologischer Inhibitor von NF κ B. (***) $p < 0,01$ für TNFR2^{wildtyp} gegen TNFR2^{mutant}.

Die Daten zeigten eine deutliche Verstärkung der TNFRE-Aktivität bei kombiniertem Einsatz von 80M2 und TNFR2-Mutein, wobei der Unterschied zwischen Wildtyp- und Mutanten-TNFR2 noch deutlicher wurde. Durch Vorinkubation der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132, der die Degradation von I κ B und somit die NF κ B-Signalgebung verhindert, konnte zudem die TNFRE-Aktivität fast vollständig unterbunden werden.

Das Expressionsmuster der MnSOD nach Stimulation der TNFR2-Varianten (Abb. 35) entspricht nach diesen Daten dem Regulationsprofil des Enhancer-Elementes (TNFRE) im 2.Intron, während der Minimalpromoter PPR keinerlei differentielle Aktivität zeigt (Abb. 37). Die Expressionskontrolle durch TNFRE wird dabei massgeblich durch den NF κ B-Signalweg beeinflusst.

Die Expressionsunterschiede von MnSOD als Beispiel eines über TNFR2 induzierbaren Gens lassen sich durch differentielle Aktivierung der NF κ B-Elemente im TNFRE des MnSOD-Gens erklären, nicht durch differentielle Promoteraktivität.

3.2.9 Untersuchung der Rekrutierung von TRAF2 zu TNFR2 – Auswirkungen der Met196Arg-Mutation auf molekularer Ebene

Die oben beschriebenen Ergebnisse über eine differentielle NF κ B-Aktivierung der beiden TNFR2-Varianten führten zu der Frage, ob man einen Grund für dieses Verhalten bei der Rekrutierung des Adaptorproteins TRAF2 finden könnte. Dieses Protein ist konstitutiv in HeLa-Zellen exprimiert (s.o.) und koppelt den TNFR2 physisch an die nachgeschaltete Signalkaskade. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Co-Immunpräzitationen von TNFR2 und endogenem TRAF2 sowie Kollokalisationsexperimente von Antikörper-markiertem TNFR2 und TRAF2-EGFP-Fusionsprotein durchgeführt.

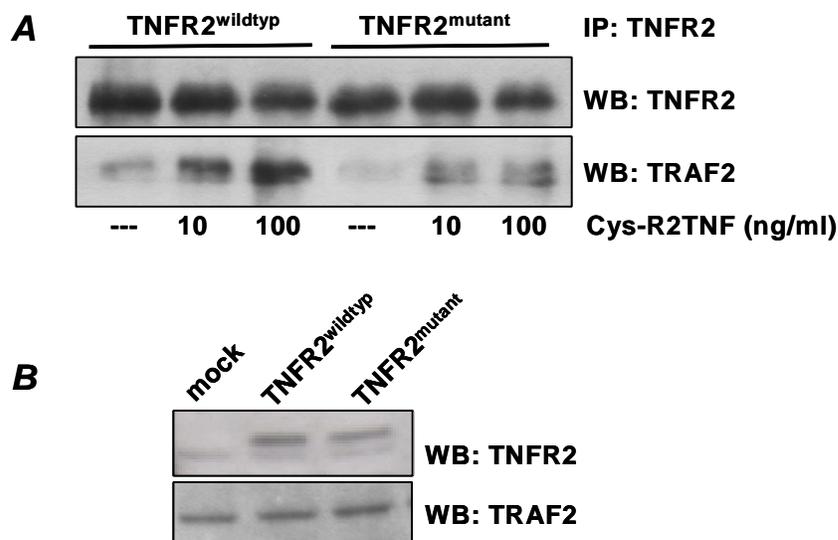


Abb. 39. Co-Immunpräzitation von TNFR2 und endogenem TRAF2. *A*, TNFR2 wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers nach Stimulation präzipitiert (IP), der Proteinkomplex über SDS-PAGE aufgetrennt, und TNFR2 und TRAF2 durch Westernblot (WB) detektiert. *B*, Westernblot der Lysate vor Präzitation. Endogenes TRAF2 zeigte in den drei Zelltypen denselben Expressionlevel.

Wie in den Westernblots in Abb. 39 dargestellt, liess sich bei Immunpräzipitation nativer TNFR2-Komplexe nach 10 min Stimulation mehr endogenes TRAF2 im TNFR2^{wildtyp} - Komplex nachweisen als im Signalkomplex der TNFR2-Mutante. Dieser Effekt war dosisabhängig (A). Die endogene Menge an TRAF2 war dabei in den verwendeten Zellen gleich (B), Präzipitate aus leertransfizierten HeLa-Zellen zeigten keine TRAF2-Bande (*nicht gezeigt*). Auch in diesem Experiment war die unstimulierte Aggregation des Wildtyp-Rezeptors mit TRAF2 stärker als die der TNFR2-Mutante.

Abbildung 40 (s. nächste Seite) zeigt die optische Analyse der Kolo-kalisation von TNFR2 und TRAF2-EGFP mittels konfokaler *Laser-Scanning* Mikroskopie. Der rote Kanal (*Mitte*) zeigt die Lokalisation von TNFR2 mit dem Hauptsignal in der Plasmamembran der Zelle. Im grünen Kanal (*links*) ist die subzelluläre Verteilung des TRAF2-EGFP-Fusionsproteins dargestellt. Die zytosolische Lokalisation im unstimulierten Zustand (A) verschiebt sich bei Stimulation des TNFR2^{wildtyp} hin zur Zellmembran (B, C *obere Hälfte*), während der mutierte Rezeptor ein geringeres Mass an TNFR2-Rekrutierung von TRAF2 zeigt (B, C *untere Hälfte*). Bei der Überlagerung der beiden Kanäle (*rechts*) wird der Unterschied der beiden TNFR2-Varianten deutlich: Die Kolo-kalisation von TNFR2 und EGFP-TRAF2 (*Gelbfärbung*) nach Stimulation mit Cys-R2TNF ist in den TNFR2^{wildtyp}-Zellen stärker ausgeprägt als in den Zellen mit dem mutierten Rezeptor.

Die optische Überprüfung der TNFR2-TRAF2-Aggregation bestätigte somit die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation und die Vermutungen um differentielle TRAF2-Rekrutierung durch die beiden Varianten des TNFR2.

Fazit der Untersuchungen zur TRAF2 - Rekrutierung : Das Adaptor-Protein TRAF2, das die physische Verbindung zwischen dem Rezeptorprotein TNFR2 und dem nachgeschalteten NFκB-Signalweg darstellt, wird von der 196Arg-Mutante des TNFR2 nach Stimulation weniger effektiv rekrutiert.

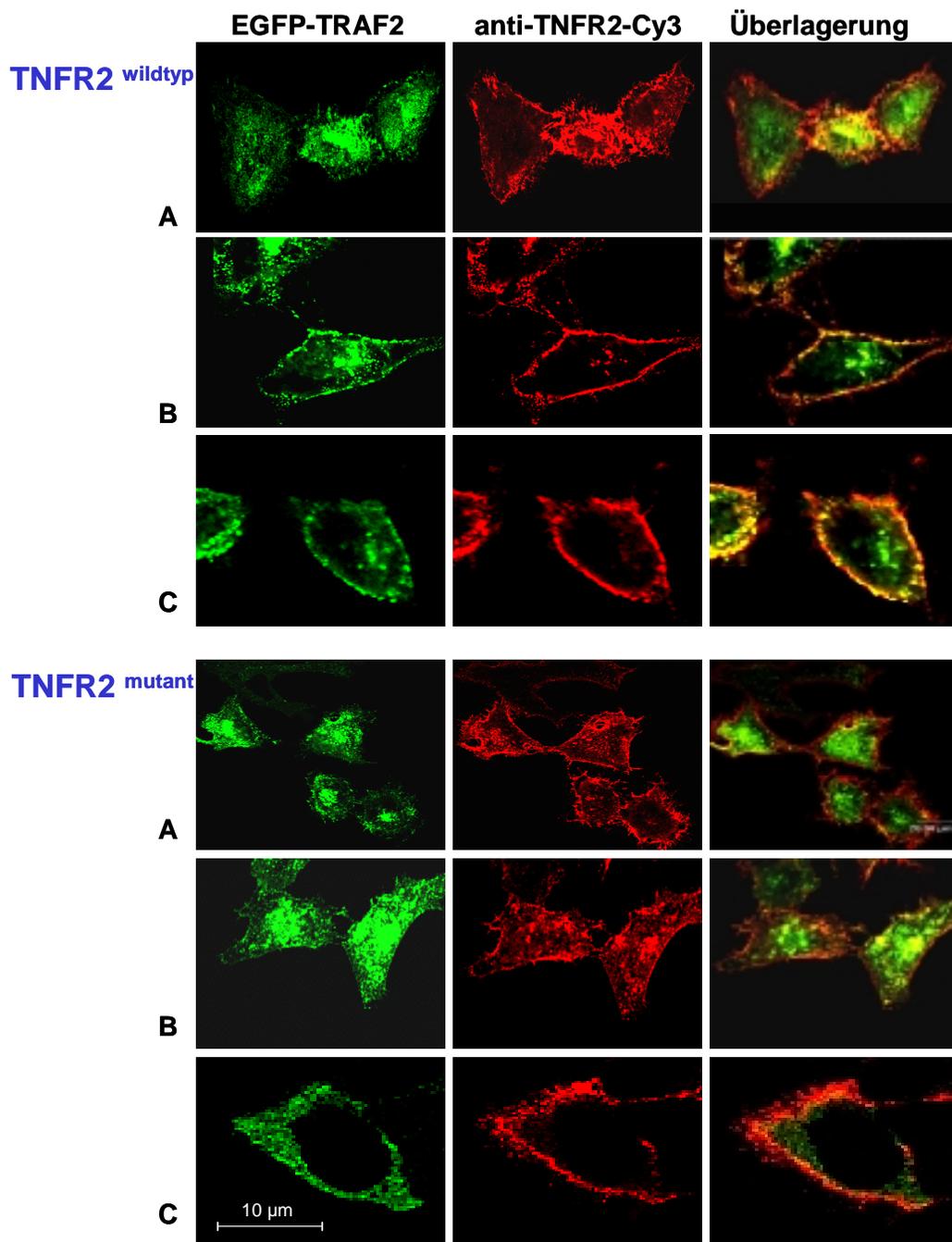


Abb. 40. Kolokalisation von TNFR2 und EGFP-TRAF2. Transient transfizierte Zellen wurden stimuliert (10 min), fixiert und nach Immunfärbung des TNFR2 mit Cy3 unter einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet. A ohne Stimulus, B 10ng/ml, C 100 ng/ml Cys-R2TNF.

4 Diskussion

4.1 Ausgangsfragestellung und Intention

Am Beginn der Arbeiten zu dieser Dissertation standen Befunde, die eine genetische Assoziation des T676G-Polymorphismus im humanen TNF-Rezeptor 2 mit chronisch entzündliche Erkrankungen (Systemischer Lupus, Colitis, Rheumatoide Arthritis, Parodontitis) beschrieben. Eine Reihe von Daten deuteten auch auf eine Beteiligung an nicht-entzündliche Erkrankungen wie Narkolepsie, Polycystisches Ovarialsyndrom und zerebrale Malaria hin.

Der Polymorphismus T676G verursacht einen Basenaustausch, der zu einer Aminosäuresubstitution (Met196 → Arg) führt. Da die genetischen Assoziationsbefunde bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen nachgewiesen wurde, bei deren Entstehung und/oder Verlauf das Zytokin $\text{TNF}\alpha$ eine wichtige Rolle spielt, lag die Vermutung eines funktionellen Hintergrundes auf Ebene des $\text{TNF}\alpha$ /TNF-Rezeptor-Systems nahe.

Die von der Mutation betroffene Aminosäure liegt in der extrazellulären Domäne des Rezeptorproteins in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran. Diese Region scheint nach Konformationsvorhersagen nicht an der Ausbildung der Liganden-Bindungstasche beteiligt zu sein, sondern eine Rolle bei der Ausbildung der Rezeptor-Trimere bzw. bei der Konformationsänderung nach Ligandenbindung zu spielen (Banner et al., 1993). Da es sich bei Methionin um eine neutral geladene Aminosäure ($\text{pK}_{\text{Met}} 7,0 - 8,0$), bei Arginin allerdings um eine stark basische Aminosäure ($\text{pK}_{\text{Arg}} 12,0 - 12,5$) handelt (Stryer, 1995), bewirkt die Mutation den Austausch einer hydrophoben gegen eine stark hydrophile Seitenkette innerhalb des Rezeptorproteins. Auf Ebene der Proteinkonformation ist deshalb ein Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften des Rezeptors durchaus vorstellbar.

Die naheliegende Vermutung, dass die Mutation einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Rezeptors hat, konnte in einer zeitgleich mit dem Beginn dieser Arbeit erschienen Veröffentlichung nicht bestätigt werden (Morita et al., 2001). Allerdings konnte in dieser Studie eine höhere Sensitivität von HeLa-TNFR2^{mutant} = TNFR2^{196Arg} - Linien gegenüber Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor TNFR2^{196Met} nachgewiesen werden. Da in diesem Fall allerdings mit löslichem $\text{TNF}\alpha$ (sTNF) als Stimulus gearbeitet worden war und zudem ein direkter Vergleich mit parentalen Zellen ohne TNFR2-Überexpression unterblieb, kann der nachgewiesene Effekt nicht zweifelsfrei auf die Auswirkungen der Mutation im TNFR2 zurückgeführt werden.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die folgenden Fragen zu beantworten:

- Kann man durch *in vitro*- Modelle Hinweise auf funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Rezeptor-Varianten finden ?
- Können sich daraus Rückschlüsse auf die Auswirkungen der Mutation *in vivo* ergeben ?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollte eine systematische funktionelle Charakterisierung der beiden Varianten des TNFR2 in stabil und transient transfizierten HeLa-Zellen und MEF, die genetisch defizient

für TNFR1 und TNFR2 waren, durchgeführt werden. Durch diese Analysen sollten die Auswirkungen der Mutation auf die Funktion des Rezeptors untersucht werden.

Die funktionelle Analyse umfasste folgende Einzelpunkte:

- Shedding und biophysikalische Eigenschaften
- Zytotoxizität unterschiedlicher TNF α -ähnlicher Stimuli
- Signaltransduktion
- TNFR2-spezifische Genexpression
- Rekrutierung zytosolischer Adaptor-Proteine

Die vorliegenden Daten liefern ein Erklärungsmodell für die erhöhte TNF α -Sensitivität der TNFR2^{196Arg}-Zellen, ausserdem geben sie Hinweise auf die mechanistischen Auswirkungen des Polymorphismus auf Ebene des Signalkomplexes und auf den möglichen funktionellen Hintergrund der Assoziation mit unterschiedlichsten Krankheitsbildern.

4.2 HeLa- Zellen und TNFR1^{-/-}/TNFR2^{-/-}- MEF als zellbiologisches Modell

Bei der Auswahl der Zellsysteme wurde auf Modelle zurückgegriffen, die keinen endogenen TNFR2 exprimieren und eine möglichst geringe Expression von TNFR1 aufweisen. HeLa-Zellen werden seit Jahren als anerkanntes zellbiologisches Modell zur Erforschung des TNF/TNFR-Systems genutzt. Durch ihre leichte Transfizierbarkeit und ihre gut charakterisierten Expressionsprofile eignen sie sich besonders für die Untersuchung komplexer Fragestellungen, bei denen die Überexpression definierter Proteine und deren Einfluss auf Signalgeschehen und Genexpression untersucht werden sollen. Da ausserdem umfangreiche Kenntnisse über das apoptotische Verhalten und die Sensitivität für TNF α vorliegen, eigneten sich HeLa-Zellen ganz besonders für den hier gewählten experimentellen Ansatz.

Die stabile Überexpression der beiden TNFR2-Varianten führte zu polyklonalen HeLa-Zellpopulationen mit homogener Expression des Fremdgens (ca. 10.000 – 12.000 Bindestellen/Zelle für beide Varianten). Die Homogenität und zeitliche Konstanz der Überexpression war besonders wichtig, da die Zellen über längere Zeit kultiviert werden mussten, um die unterschiedlichen funktionellen Untersuchungen durchführen zu können. Hierbei haben polyklonale Populationen gegenüber monoklonalen den klaren Vorteil, dass die statistische Integration des Fremdgens in das Zellgenom Sekundäreffekte durch die Position der Integration minimiert.

Die immortalisierten Fibroblasten aus TNFR1^{-/-} / TNFR2^{-/-} doppel-*knock-out*-Mäusen (MEF) bilden ein wichtiges zellbiologisches Werkzeug zur Erforschung des TNF α /TNFR-Systems. Durch den genetischen *knock-out* beider TNFR-Subtypen sind die parentalen Zellen absolut resistent gegen TNF α -Behandlung. Sie eignen sich deshalb besonders für Experimente zur Rekonstitution des TNFR2 und für die Untersuchung biophysikalischer Eigenschaften des Rezeptors in Abwesenheit von endogenem TNFR1. Als Alternative zu diesem Ansatz wäre die Benutzung von TNFR1-exprimierenden Zellen zusammen mit

antagonistischen Antikörpern gegen TNFR1 in Frage gekommen. Da hierbei allerdings mit hohen Antikörperkonzentrationen gearbeitet werden muss und ausserdem Nebeneffekte nicht vollkommen ausgeschlossen werden können, erschien die Arbeit mit einem *knock-out*-Modell wenigstens für einige Versuche vielversprechender.

MEF lassen sich im Gegensatz zu HeLa-Zellen relativ schlecht transfizieren und zeigten insgesamt einen schnelleren Rückgang der TNFR2-Expression bei längerer Kultivierung. Da zudem die Selektion und Isolierung keine komplett homogenen Populationen mit identischem Expressionsniveau hervorgebracht hatten, eigneten sich die stabil transfizierten MEF nicht für alle Versuchsansätze. Zur Bestimmung biophysikalischer Parameter der TNF α /TNFR2-Interaktion und als Ausgangspopulation für transiente Transfektionen waren sie allerdings hervorragend geeignet.

Für das experimentelle Konzept dieser Arbeit war es wichtig, die beobachteten Phänomene durch Benutzung zweier unterschiedlicher Zelllinien auf das Vorliegen von zelltypspezifischen Mechanismen hin zu überprüfen. Da die Ergebnisse der Luziferase-Reportergen-Messungen (s.u.) und der Expressionsanalysen sowohl in HeLa-Zellen als auch in MEF vergleichbare Ergebnisse lieferten, deutet dies auf einen generellen Mechanismus durch Rekonstitution der TNFR2-Varianten hin. Bei der Benutzung transienter Transfektion für die Reportergenanalysen wird zudem eine identische Zellpopulation als Grundlage genommen, wodurch Unterschiede zwischen einzelnen Zellpopulationen bezüglich Zelldichte, Passagenzahl und Expressmuster als Fehlerquelle ausgeschaltet wurden.

Die parallele Nutzung von HeLa-Zellen und MEF aus *knock-out*-Mäusen mit genetischer Defizienz für beide TNF α -Rezeptoren sowie die Verwendung von stabiler und transienter Transfektion lieferte sich gegenseitig bestätigende, repräsentative Ergebnisse.

4.3 Differenzierung des Signalgeschehens über die beiden TNFR-Subtypen – Methodik und Bedeutung

Die in dieser Arbeit verwendeten Muteine (R1TNF = TNF32W/86T, Cys-R2TNF = Cys-TNF143N/145R) stellen hochspezifische biochemische Werkzeuge zur Differenzierung zwischen Signalgeschehen über TNFR1 oder TNFR2 dar. Die Ergebnisse aus den Luziferase-Messungen und der Analyse des Signalgeschehens zeigen deutlich, dass durch Stimulation mit R1TNF keine Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen zu finden sind, da der hierdurch verursachte Effekt ausschliesslich auf endogenen TNFR1 zurückzuführen ist. Dies wird gestützt durch den Befund, dass TNFR2-MEF in keiner Weise auf R1TNF reagieren. Umgekehrt zeigt das TNFR2-spezifische Mutein nur in den TNFR2-Zellen eine Wirkung, während *mock*-transfizierte HeLa-Zellen und MEF keinen sichtbaren Effekt aufweisen.

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der Muteine mit der Wildtyp-Form von TNF α ist nicht auszuschliessen, dass eine Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen Rezeptor-Subtyp auftritt, wenn auch mit deutlich verminderter Affinität. Aus diesem Grund wurden die Muteine für den funktionellen Vergleich (DLA, Zytotoxizität, Genexpression) nur in Konzentrationsbereichen benutzt, bei denen keine unspezifischen Effekte aufgetreten waren (< 100 ng/ml).

Der Einsatz von 80M2, einem monoklonalen Maus-anti-TNFR2-Antikörper, verlängert die Halbwertszeit des TNF α /TNFR2-Komplexes um den Faktor 10, was wahrscheinlich durch Stabilisierung der

Rezeptortrimere durch *crosslinking* zu erklären ist (Krippner-Heidenreich et al., 2002). Die vorliegenden Daten bestätigen den Einfluss der 80M2-Vorbehandlung auf die physikalischen Bindungseigenschaften des Rezeptors, können aber die Stärke dieses Effektes anhand der Luziferase-Assays nicht belegen. Durch *crosslinking* vor der Stimulation mit TNFR2-Mutein wird die NF κ B-Aktivität in den TNFR2-Zellen zwar erhöht, die Zunahme liegt allerdings im Bereich von 10 – 20 % und nicht bei der erwarteten Verzehnfachung. Im Widerspruch hierzu stehen die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, dass durch 80M2 eine deutliche Zunahme der nukleären NF κ B-Proteinmenge und DNA-Bindung zu detektieren ist (Krippner-Heidenreich, *persönliche Mitteilung*). Eventuell muss hier strikt zwischen der nukleären Translokation und DNA-Bindung der p65-Untereinheit und Transaktivierungsprozessen durch nicht-kanonische NF κ B-Signalgebung unterschieden werden. Die Phosphorylierung von p65/NF κ B durch unterschiedliche Kinasen (s. Einleitung) kann in diesem Zusammenhang ebenso eine Rolle spielen wie negative Rückkopplungseffekte, z.B. durch verstärkte NF κ B-abhängige Expression von I κ B α .

Der Einsatz von Cys-R2TNF mit oder ohne *crosslinking* durch 80M2 stellt ein Modell für die Stimulation des TNFR2 durch membranständiges TNF α (memTNF) dar. Sowohl memTNF als auch TNFR2 werden fast ausschliesslich von Zellen des Immunsystems exprimiert (Pfeffer, 2003; Wajant et al., 2003). Da die physiologische Wirkung von TNF α die Koordination des Immunsystems beinhaltet, und da membranständiges TNF α beide TNFR-Subtypen gleich stark aktivieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass einige der Hauptwirkungen von TNF α durch direkte Zell-Zell-Interaktion über memTNF vermittelt werden. MacEwan (2002) argumentierte diesbezüglich für eine bisher deutlich unterschätzte Rolle des memTNF/TNFR2-Systems wegen des ausschliesslichen Einsatzes von löslichem TNF α (sTNF) in der zellbiologischen Laborpraxis. Die Bedeutung der memTNF/TNFR2-Interaktion mit ihren Konsequenzen für die Immunmodulation durch TNF α bedarf weiterer Klärung.

Das hier gewählte experimentelle Modellsystem (Benutzung von sTNF und receptorspezifischen TNF-Muteinen in Verbindung mit 80M2 zur Stabilisierung des Rezeptorkomplexes) ermöglicht sowohl eine gezielte Aktivierung der beiden TNFR-Subtypen als auch eine Simulation der Wirkungen von membranständigem TNF α .

4.4 Funktioneller Vergleich der beiden TNFR2-Varianten

4.4.1 Shedding und physikalische Bindungseigenschaften sind von der Mutation nicht betroffen

In Übereinstimmung mit den Daten aus anderen Arbeitsgruppen zeigten die Untersuchungen zur Kinetik des *Sheddings* und zu physikalischen Parametern der TNF α /TNFR2-Interaktion keinen Unterschied zwischen den beiden Varianten. Obwohl die Lage der betroffenen Aminosäure eine räumliche Nähe zur Spaltstelle der Ektodomäne aufweist (Herman and Chernajovsky, 1998), scheint der Zugang des proteolytischen Enzyms (TACE) nicht beeinflusst zu werden. Dieses Ergebnis war weder unerwartet noch überraschend, da die Serumspiegel von sTNFR2 in Patienten mit Homozygotie für eines der beiden Allele ebenfalls keine Unterschiede zeigen (Morita et al., 2001).

Die hier vorliegenden Daten zeigen erstmals, dass das Bindungsverhalten von TNFR2 zu TNF α auch bei physiologischen Bedingungen (37°C) keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den TNFR2-Varianten zeigt. Die Mutation scheint nach diesen Resultaten entweder keine funktionellen Konsequenzen für die Liganden/Rezeptor-Bindung zu haben, oder wirkt sich so gering aus, dass die Unterschiede mit den hier gewählten methodischen Ansätzen nicht erfasst werden können.

Anhand der Daten aus den nachfolgenden Experimenten können wir davon ausgehen, dass TNF α zumindest in Verbindung mit 80M2 einen Unterschied in der nachgeschalteten Signalkaskade bewirkt (s.u.). Dieser Effekt scheint sich aber nach den hier vorliegenden Daten nicht auf Ebene der Liganden/Rezeptor-Interaktion, sondern eher bei der nachfolgenden Weitergabe des biochemischen Signals auszuwirken.

4.4.2 Die Mutation bedingt eine erhöhte Sensitivität zu TNF α im Rahmen des *receptor crosstalks*

Bei der in den beschriebenen Zellen induzierten toxischen Wirkung handelt es sich um Apoptose, was durch die Auswirkungen der Caspasen-Inhibition und die Beobachtung unterschiedlicher zellulärer Prozesse (*DNA-laddering*, PARP-Spaltung) bestätigt wird.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Gruppen (Fotin-Mleczek et al., 2002) zeigte die Überexpression der beiden TNFR2-Varianten bei Stimulation mit sTNF bei uns nur eine geringe Verstärkung der apoptotischen Wirkung. Dies mag im Expressionsniveau des Rezeptors, in der Sensitivität des Detektionssystems (Kristallviolett-Aufnahme) oder in Schwankungen der absoluten Zelldichten der Populationen begründet sein. HeLa-Zellen mit stabiler Expression der 196Arg-Variante des TNFR2 zeigten allerdings eine erhöhte Sensitivität gegenüber TNF-ähnlichen Stimuli, obwohl dieser Effekt nicht in allen Fällen signifikant war. Eine Erklärung hierfür lässt sich nur aus der kombinierten Betrachtung der Toxizitätsuntersuchung und der Analyse des Signalgeschehens ableiten. Die im folgenden diskutierten Luziferase-Assays geben Hinweise darauf, dass beide Rezeptorvarianten durch „*ligand passing*“ die Zellen für TNF α sensitivieren. Allerdings zeigt nur der Wildtyp-TNFR2 eine autogene Aktivierung des NF κ B-Signalwegs, der durch die Expression antiapoptotischer Gene dem apoptotischen Signalweg über TNFR1 entgegenwirkt (s.u.). Eine Kombination dieser Effekte (*ligand passing*, NF κ B-Aktivierung, Regulation von Genexpression) könnte die erhöhte Sensitivität der TNFR2^{mutant}-Zellen erklären.

Unter Bedingungen, bei denen eine Vorstimulation des TNFR2 mit anschließender Aktivierung der TNFR1-Signalwege erfolgte, zeigte sich eine deutlich verstärkte Sensitivität der TNFR2-exprimierenden Zellen. Nach dem Modell des „*receptor crosstalks*“ (Fotin-Mleczek et al., 2002) lässt sich dieses Phänomen durch die Konkurrenz zwischen TNFR1 und TNFR2 um TRAF2 und neusynthetisierte antiapoptotische Proteine wie IAP1, IAP2 und TRAF1 erklären. Bei diesem experimentellen Ansatz ergab sich für die mutierte 196Arg-Variante des TNFR2 eine statistisch signifikante Erhöhung der Sensitivität mit deutlicher Dosisabhängigkeit von der Konzentration des TNFR2-Muteins. Diese Beobachtung würde nach dem *receptor crosstalk* – Modell für eine verstärkte Konkurrenz durch vermehrte Assoziation der antiapoptotischen Faktoren mit TNFR2^{196Arg} im Vergleich zu TNFR2^{196Met} sprechen. Wie unten noch

ausgeführt wird, deuten die vorliegenden Daten allerdings darauf hin, dass eine verminderte Expression dieser Faktoren in Verbindung mit der Konkurrenz für die Verstärkung der proapoptotischen Signale verantwortlich ist.

4.4.3 Der NF κ B-Signalweg wird durch Vorliegen des mutierten 196Arg-Allels negativ beeinflusst

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten des TNFR2 auf Ebene der NF κ B-Aktivierung zeigte sich nur unter Stimulationsbedingungen, bei denen der TNFR2 direkt aktiviert wurde (80M2 + sTNF, Cys-R2TNF). Allerdings deutete sich auch bei Stimulation mit sTNF alleine eine Erhöhung der NF κ B-Aktivität durch beide TNFR2-Varianten an. Diese Verstärkung der NF κ B-Aktivität trat besonders bei niedrigen Konzentrationen von TNF α auf und konnte durch *crosslinking* des Rezeptors mit 80M2 noch verstärkt werden. Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen über das TNFR2-Signalgeschehen kann dieser Effekt durch den Prozess des „*ligand-passings*“ erklärt werden, bei dem die transiente Bindung von TNF α an TNFR2 für eine lokale Erhöhung der TNF α -Konzentration in der nahen räumlichen Umgebung der Zelle und somit für eine Verstärkung des Signalprozesses über TNFR1 sorgt (Tartaglia et al., 1993b). Da die vorliegenden Daten keinen Unterschied im physikalischen Bindeverhalten der beiden TNFR2-Varianten zeigen (s.o.), würde dieser Effekt für beide Varianten in ähnlicher Weise zu erwarten sein, was auch tatsächlich zutrifft.

Der beobachtete Unterschied zwischen den beiden TNFR2-Varianten bei direkter Stimulation des TNFR2 war statistisch signifikant. Der Wildtyp-TNFR2 vermittelte bei spezifischer Stimulation eine NF κ B-Aktivierung, die um den Faktor 2-3 über der des mutierten Rezeptors lag. Überraschenderweise liess sich dieser Effekt nicht durch Stabilisierung des Rezeptor-Komplexes durch 80M2 potenzieren. Obwohl die physikalischen Bindungsparameter eine Verzehnfachung der Dissoziationszeit des Liganden durch 80M2 bestätigten, betrug die Erhöhung der NF κ B-Aktivierung nur etwa ein Zehntel bis ein Fünftel der Gesamtaktivität. Dies wird unter 4.4.6 weiter diskutiert werden.

Der beobachtete Effekt durch die Vorstimulation von TNFR2 für 6 h bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse insofern, als dass die mutierte Variante auch in diesem Fall eine herabgesetzte NF κ B-Aktivierung bewirkte. Allerdings deuten die beschriebenen Daten darauf hin, dass die Vorstimulation für beide Varianten eine negative Rückkopplung im Kontext der nachfolgenden TNFR1-Aktivierung bewirkt. Nach dem herkömmlichen Modell entspricht dieses Verhalten den Vorhersagen des *receptor crossstalks*. Da die Gesamtaktivierung der TNFR2-Zellen allerdings deutlich über der NF κ B-Aktivierung der *mock*-transfizierten Zellen lag, muss mit Rückblick auf die Apoptosemessungen die Auswirkung der Konkurrenz um antiapoptotische Adaptorproteine (TRAF2, IAPs) einen stärkeren Einfluss haben als die induzierte NF κ B-Aktivierung. Dies spricht für ein fein reguliertes und hochempfindliches zelluläres System, bei dem die zeitliche und räumliche Abfolge proapoptotischer und antiapoptotischer Signale das Gesamtergebnis des Signalgeschehens bestimmt. Bei der 196Arg-Variante des TNFR2 scheint durch verminderte Fähigkeit zur NF κ B-Aktivierung eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes zum apoptotischen Geschehen hin vorzuliegen.

4.4.4 Die TNFR2-induzierte Expression proinflammatorischer und antiapoptotischer Gene ist bei der 196Arg-Variante verringert

Obwohl die Expressionsprofile der untersuchten NF κ B-abhängigen TNF α -Zielgene die gleiche Tendenz aufwiesen, nämlich eine Verringerung der Induzierbarkeit über die 196Arg-Variante des Rezeptors, war das Mass der Induzierbarkeit zwischen den einzelnen Genen deutlich unterschiedlich. So war z.B. der Induktionseffekt bei den Zytokinen IL-6 und IL-8 besonders stark ausgeprägt, während Bcl-XL und A20 einen moderateren Anstieg der mRNA-Expression zeigten. Dieses Phänomen lässt sich durch Unterschiede der regulatorischen DNA-Sequenzen im Hinblick auf Konsensus-Sequenzen für induzierbare Transkriptionsfaktoren erklären. Auch die Stabilität der mRNAs, die über unterschiedliche Mechanismen beeinflusst werden kann, mag hierbei eine Rolle spielen. Wie am Beispiel der MnSOD-Regulation gezeigt, kommt dem NF κ B-Weg bei der Geninduktion über TNFR2 eine besonders wichtige Rolle zu. Dies lässt sich durch folgende Daten belegen:

- (i) Der Minimalpromoter der MnSOD ohne Konsensus-Sequenzen für NF κ B zeigte keine Unterschiede durch Expression des TNFR2 und konnte durch Cys-R2TNF nicht detektierbar aktiviert werden. Im Gegensatz hierzu zeigte das TNFRE-Konstrukt mit den internen NF κ B-Konsensus-Sequenzen eine deutliche Aktivitätssteigerung nach Stimulation mit TNFR2-Mutein, wobei die Aktivität dieses Reportergenkonstruktes ein Profil zeigte, das grosse Ähnlichkeiten zu dem des NF κ B-Luziferase-Reporters aufwies.
- (ii) Durch Einsatz von 80M2 vor Stimulation mit Cys-R2TNF liess sich die Aktivität des TNFRE-Konstruktes in gleichem Masse steigern, wie es sich für die NF κ B-Aktivität im Reportergen-Assay gezeigt hatte.
- (iii) Die Inhibition der I κ B-Degradation unter Verwendung des Proteasom-Inhibitors MG132 konnte die Aktivität des TNFRE-Reportergenkonstruktes fast vollständig inhibieren.

Von der differentiellen Induzierbarkeit über die beiden Varianten des TNFR2 sind sowohl proinflammatorische als auch antiapoptotische Gene betroffen, was die Abschätzung der Konsequenzen anhand der hier vorliegenden Daten alleine erschwert. Die Induktion von Zytokinen kann in bestimmten Zelltypen zur autokrinen Induktion von Apoptose führen. So wurde z.B. erst kürzlich gezeigt, dass die Stimulation der monozytären Zelllinie THP-1 mit löslichem TNF-Rezeptor oder anti-TNF-Antikörper IFX zu einer Expression von TGF- β und dadurch zu einer Induktion des Apoptose-Programms durch autokrine Stimulation führt (Waetzig, Rosenstiel *et al.*, 2004, *in press*). Da HeLa-Zellen als Modellsystem allerdings besonders in Hinblick auf TNF-Signalwege hinreichend erforscht sind, kann in diesem Zusammenhang eine autokrine Komponente durch das Zytokin IL-6 oder das Chemokin IL-8 ausgeschlossen werden.

Die Proteine der IAP-, TRAF- und der Bcl-2-Familie sowie die Proteine A20 und MnSOD wirken auf unterschiedlichen Ebenen als Inhibitoren oder Antagonisten des proapoptotischen Caspase-Signalwegs (s. Einleitung). Allerdings deuten Experimente zur Überexpression dieser Gene darauf hin, dass keines der Proteine alleine eine vollständige Inhibition des Apoptoseprozesses bewirken kann (Micheau *et al.*, 2001), sondern nur für eine Abschwächung des apoptotischen Signalwegs sorgt. So zeigten z.B. Wang *et*

al. , dass die gleichzeitige Expression von TRAF1, TRAF2, IAP1 und IAP2 für eine vollständige Inhibition der Caspase 8-Aktivierung notwendig ist (Wang et al., 1998).

In weiterführenden Versuchen konnte für das hier benutzte Zellmodell durch Überexpression von entweder IAP1 oder TRAF2 keine Veränderung des apoptotischen Verhaltens erzielt werden. Durch gleichzeitige Überexpression von beiden Proteinen wurden die Zellen jedoch für sTNF-induzierte Toxizität in beschränktem Masse desensitiviert. Eine Überexpression von Bcl-XL bewirkte einen deutlichen Rückgang des Anteils apoptotischer Zellen (*unveröffentlicht*).

Dies und die Tatsache, dass durch Inhibition des NF κ B-Signalwegs mit MG132 die zytotoxische Wirkung von TNF α deutlich verstärkt werden konnte, deuten auf die herausragende Rolle des antiapoptischen NF κ B-Signalwegs in diesem System hin.

4.4.5 Die Mutation bewirkt eine geringere Fähigkeit zur TRAF2-Rekrutierung

Die Rekrutierung des zytosolischen Adaptors TRAF2 nach Bindung des Liganden wird nach derzeitigen Modellvorstellungen durch eine Änderung der Konformation in den zytoplasmatischen Bereichen des Rezeptorproteins bewirkt (Bradley and Pober, 2001). Durch die konformationsbedingte Annäherung der zytosolischen Domänen wird der Zugang für TRAF2-Monomere ermöglicht und eine physische Interaktion zwischen TRAF2- und TNFR2-Trimeren stabilisiert. Dieser Vorgang vollzieht sich im zeitlichen Ablauf von ungefähr 10 – 15 min und ist ausschlaggebend für die nachfolgende Aktivierung des NF κ B-Signalwegs. Die hier vorgestellten Ergebnisse aus Co-Immunpräzipitationen, gestützt durch visuellen Nachweis mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie, deuten auf eine verminderte Fähigkeit der mutierten TNFR2-Variante zur physischen Interaktion mit TRAF2 in Relation zum Wildtyp-Rezeptor hin. Da dieser Effekt sowohl in unstimulierten Zellen als auch nach Stimulation mit TNFR2-Mutein auftrat, scheint es sich nicht um eine zeitlich verzögerte Rekrutierung, sondern um eine absolut verminderte Affinität zwischen TRAF2 und TNFR2^{196Arg} zu handeln. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte eine strukturelle Modifikation des TNFR2-Rezeptorkomplexes durch die Aminosäuresubstitution sein. Nach den hier vorliegenden Daten wirkt sich allerdings die Einführung der hydrophilen Arginin-Seitenkette an Stelle der neutralen Methionin-Seitenkette in stärkerem Masse auf die biophysikalischen Vorgänge am intrazellulären Bereich des Rezeptorprotein aus als extrazellulär. Eine direkte Einwirkung auf die Konformation der TRAF2-Bindungsdomäne ist unwahrscheinlich, vielmehr ist eine Auswirkung auf die effiziente Assemblierung funktioneller cytoplasmatischer Rezeptor-Komplexe vorstellbar.

Die Interaktion von TNFR2 und TRAF2 bewirkt über die Aktivierung von NF κ B u.a. die Expression von IAP1 und IAP2. Diese Proteine wurden erst kürzlich als Komponenten des TNFR2-Proteinkomplexes identifiziert und sind für die Degradation von TRAF2 über proteasomalen Abbau verantwortlich (Rothe et al., 1995) (Li et al., 2002). Durch diesen Mechanismus wird nach TNFR2-Stimulation der essentielle Adaptor zur NF κ B-Aktivierung für beide TNF-Rezeptoren entzogen und so die weitere NF κ B-Aktivierung durch eine negative Rückkopplung (*negative feedback loop*) inhibiert.

Nach den hier vorgestellten Daten müsste sich die geringere Fähigkeit zur TRAF2-Rekrutierung auf Ebene der Degradation von TRAF2 bemerkbar machen. Da IAP-1 und IAP-2 von HeLa-Zellen erst nach Stimulation exprimiert werden, kann sich dieser Effekt allerdings erst im Anschluss an eine langanhaltende Stimulation zeigen. Tatsächlich zeigten die stabil transfizierten HeLa-Zellen nach

mehreren Kultivierungswochen tiefgreifende Unterschiede in der Expression von zytosolischem TRAF2 (*unveröffentlicht*). Hierbei war das Expressionsniveau in TNFR2^{196Met}-Zellen gegenüber *mock*-transfizierten HeLa-Zellen und HeLa-TNFR2^{196Arg} deutlich verringert, während TNFR2^{196Arg} – Zellen nur einen geringen Rückgang des TRAF2-Proteingehaltes gegenüber HeLa-*mock* aufwiesen. Diese Beobachtung stützt die oben dargelegten Hinweise auf differentielle TRAF2-Rekrutierung, da es vorstellbar ist, dass die stabil transfizierten Zellen durch die konstitutive Überexpression einem andauernden moderaten TNFR2-Signalgeschehen ausgesetzt waren. Da sich dieser Effekt allerdings nicht zweifelsfrei auf Effekte durch die TNFR2- Überexpression zurückführen lässt muss der kausale Zusammenhang zwischen TNFR2-Expression und TRAF2-Degradierung an dieser Stelle hypothetisch bleiben.

4.4.6 Zusammenfassung des funktionellen Vergleichs der beiden TNFR2-Varianten

Nach den hier vorliegenden Daten hat die Mutation Met196→ Arg weder Einfluss auf die Bindungseigenschaften des TNFR2 zu TNF α noch auf die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne. Vielmehr scheint die Fähigkeit der Rezeptors zur effektiven Rekrutierung seines Hauptadaptors TRAF2 von der Aminosäuren-Substitution betroffen zu sein. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da die betroffene Aminosäure im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins nahe der Zellmembran lokalisiert ist. Basierend auf den derzeitigen Kenntnissen ist dieses Phänomen nur durch einen Einfluss des Met196Arg Polymorphismus auf die Proteinkonformation im Bereich des Rezeptorschafts zu erklären. Der Bereich zwischen der vierten Cystein-reichen Domäne (CRD4) und der Transmembranregion wird als essentielle Domäne für die Clusterbildung der Rezeptortrimere angesehen und könnte dadurch auch für eine physische Weitergabe des Stimulus nach Ligandenbindung verantwortlich sein (Banner et al., 1993).

Die Konsequenz der geringeren TRAF2-Rekrutierung liegt nach den vorgestellten Daten in der verminderten Aktivierung des NF κ B-Signalwegs durch die mutierte Rezeptor-Variante. Dies führt in dem benutzten Zellsystem zu einer verminderten Expression von Genen, die entweder proinflammatorische (Interleukine, Chemokine) oder antiapoptotische Funktionen innehaben (A20, IAPs, MnSOD, BclXL) (Li and Stark, 2002). Daraus resultierend bewirkt eine nachfolgende Stimulation des Todesrezeptors TNFR1 eine verstärkte apoptotische Signalgebung, da die wichtigen Klassen der antiapoptotischen Gene einen niedrigeren Expressionslevel aufweisen.

Dieses Modell setzt allerdings voraus, dass die Expression des mutierten TNFR2 durch einen zusätzlichen Mechanismus für eine Verstärkung des Todessignals sorgt. Ohne eine solche Verstärkung in TNFR2^{196Arg}-Zellen wäre die Änderung des apoptotischen Verhaltens im Vergleich zu TNFR2-negativen Zellen nicht zu erklären. Nach dem Modell des *receptor-crosstalk* könnte hier eine Kompetition um die Bindung antiapoptotischer Proteinen (TRAF1, IAPs) zwischen TNFR2 und TNFR1 vorliegen. Da der mutierte TNFR2 nachweislich TRAF2 und deshalb auch assoziierte Proteine binden kann (wenn auch mit geringerer Effizienz als der Wildtyp-Rezeptor TNFR2^{196Met}), scheint in diesem Fall das Gleichgewicht zwischen TRAF2-Kompetition und der Induktion von Genen mit antiapoptotischen Funktionen gestört zu sein.

4.5 Pathophysiologische Relevanz des Polymorphismus - Mögliche Auswirkungen der Met196→ Arg Substitution *in vivo*

Um die beschriebenen Beobachtungen in den Kontext des physiologischen Geschehens im Organismus zu setzen, erscheint eine Diskussion der bisher beschriebenen Funktionen von TNFR2 *in vivo* notwendig.

TNFR2 wird hauptsächlich von Immunzellen exprimiert und dort wahrscheinlich durch direkten Zell-Zell-Kontakt über memTNF aktiviert (Grell et al., 1995). Die geringe Fähigkeit zur Bindung von löslichem TNF α , die beschränkte Expression, sowie die Schwierigkeit, zwischen TNFR2-Signalen und solchen des ubiquitären TNFR1 zu unterscheiden, bedingt die experimentellen Schwierigkeiten bei der Aufdeckung von TNFR2-spezifischen physiologischen Wirkungen.

Das einzige Gen, für das bisher eine direkte Induktion über TNFR2 *in vivo* nachgewiesen wurde, ist der Granulozyten/Makrophagen-Wachstumsfaktor GM-CSF (CSF2). Dieses Zytokin wird von T-Lymphozyten über TNFR2 induziert und ist neben anderen immunmodulatorischen Funktionen für eine Proliferation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen durch Inhibition der Apoptose verantwortlich.

Nach dem vorgestellten Modell würde die Mutation im TNFR2 für eine geringere Expression von GM-CSF durch T-Zellen sorgen, welches wiederum einen negativen Einfluss auf die Expansion der genannten Immunzellpopulationen haben würde. Als Konsequenz könnte eine effektive Bekämpfung von Pathogenen (Bakterien, Viren) durch diese Immunzellen gestört sein. Gestützt wird diese Theorie durch den Befund, dass bei chronischer Parodontitis, einer der entzündlichen Erkrankungen, mit denen der TNFR2 genetisch assoziiert ist, eine erhöhte Apoptose von neutrophilen Granulozyten detektiert werden kann. Ausserdem kann bei diesem Krankheitsgeschehen ein direkter Einfluss von GM-CSF auf die Inhibition der Apoptose nachgewiesen werden (Gamonal et al., 2003).

Eine weitere biologische Funktion des TNFR2 liegt in der Vermittlung der Apoptose von aktivierten T-Zellen. Im Gegensatz zum hier verwendeten Zellsystem und den meisten körpereigenen Zellen zeigen T-Lymphozyten nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors über Antigen-präsentierende Zellen eine verstärkte Expression des Adaptorproteins RIP1. Diese Expressionsänderung, die erst in der späten Phase der T-Zellaktivierung nach mehreren Tagen auftritt, sensitiviert die Lymphozyten für TNFR2-abhängige Apoptose. Dabei wird durch Assoziation von TNFR2, TRAF2 und RIP1 die apoptotische Caspasen-Kaskade direkt aktiviert (Pimentel-Muinos and Seed, 1999). Da dieser Prozess durch physikalische Interaktion von TNFR2 und TRAF2 reguliert wird, würde nach dem hier vorgestellten Modell eine ineffektivere TRAF2-Rekrutierung der TNFR2^{196Arg}-Variante für eine geringere Apoptose der aktivierten T-Zellen sorgen. Da diese Feinregulation von aktivierten Immunzellen hauptsächlich bei cytotoxischen T-Zellpopulationen beobachtet wurde, könnte der beschriebene Mechanismus direkte Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase haben. Ishikawa (2002) berichtet bei der Assoziationsanalyse zwischen dem TNFR2-Polymorphismus und *Graft-versus-host-disease* (GvHD) von einer verstärkten Zytotoxizität durch die Spenderzellen bei Vorliegen der 196Arg-Variante im TNFR2. Dieses Phänomen lässt sich nach den hier präsentierten Daten durch eine verminderte Apoptose der

CD8-Effektor-T-Zellen über den mutierten TNFR2 erklären. In der Arbeit von Turner (2004) wird ein direkter Einfluss von TNFR2-vermittelter Apoptose auf die Elimination von Virus-spezifischen CD8-positiven T-Zellen berichtet (Turner et al., 2004).

Im Zusammenhang mit dem Entzündungsgeschehen des Gastrointestinaltraktes ist interessant, dass TNFR2 auf T-Zellen der Lamina propria von Morbus Crohn-Patienten überexprimiert wird, und dass TNFR2-Expression einen direkten Einfluss auf das Th1-Zytokin-Milieu und auf Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens in transgenen Mäusen hat (Holtmann et al., 2002a). Da erst kürzlich eine Assoziation des TNFR2-196Arg-Allels mit Colitis ulcerosa nachgewiesen wurde (Pierik et al., 2004), lässt sich über einen Einfluss der gestörten Apoptose von Effektor-T-Zellen in Verbindung mit verändertem Zytokinmilieu als Grundlage der Ätiopathologie dieser chronischen Erkrankungen spekulieren.

Zusammengefasst gibt es Hinweise aus der aktuellen Literatur, dass die *in vivo*- Funktionen des TNFR2 an der Pathophysiologie von entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen beteiligt sind.

Mögliche Konsequenzen der Met196→Arg Substitution im TNFR2 könnten nach den hier vorgelegten Daten *in vivo* verantwortlich sein für:

- verminderte Proliferation bzw. verstärkte Apoptose von anti-pathogenen Immunzellen (Neutrophilen Granulocyten, Monozyten/Makrophagen)
- verminderte Apoptose von aktivierten T-Effektorzellen im Zuge der adaptiven Immunantwort

Eine Fehlfunktion des Rezeptors auf Ebene der Signaltransduktion könnte daher tiefgreifende Konsequenzen für die Modulation des Immunsystems und die Reaktion des Organismus in der Auseinandersetzung mit Pathogenen haben.

4.6 Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse zur Funktionsanalyse des TNFR2 führen zu weiteren Fragestellungen. Auf Ebene der beschriebenen zellbiologischen Modellsysteme ergeben sich folgende weiterführende Schwerpunkte:

- Inwieweit wird die JNK-Aktivität über TNFR2 von der Met196→ Arg Mutation beeinflusst ? Spielt die Aktivierung der MAPK in diesem Zellsystem eine pro- oder antiapoptotische Rolle ?
- Lassen sich zusätzliche Interaktionen von TNFR2 mit anderen Adaptorproteinen nachweisen und wie werden diese Interaktionen von der Substitution beeinflusst ?

Um der Bedeutung der Forschungsergebnisse aus zellbiologischer Grundlagenforschung bei der Übertragung auf die *in vivo*-Situation gerecht werden zu können, bedarf es einer Erweiterung der Kenntnisse über die zugrundeliegenden physiologischen Prozesse. Im Kontext der hier angesprochenen Mechanismen bedarf es einer näheren Beleuchtung folgender Fragestellungen:

- Welche weiteren Funktionen kann man für TNFR2 im Organismus finden und wie stehen diese im Zusammenhang mit den assoziierten Erkrankungen ? Lassen sich die hier beschriebenen Resultate funktionell mit den Krankheitsbildern korrelieren ?
- Gibt es noch weitere Hinweise für die Relevanz der hier dargelegten Beobachtungen *in vivo* ? Ist beispielsweise die GM-CSF-Produktion durch T-Lymphozyten mit dem TNFR2-Genotyp korrelierbar ? Finden sich Hinweise auf einen direkten Einfluss des TNFR2-Genotyps auf die Apoptose aktivierter T-Effektorzellen *in vivo* ?

Die Beantwortung zumindest einiger dieser Fragestellungen kann im Licht der hier vorgestellten Analysen einen Beitrag liefern, die molekularen Grundlagen bezüglich des TNF α /TNFR-Systems bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Das Zytokin Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) spielt eine wichtige Rolle bei der Koordinierung von Immunantworten und bei pathophysiologischen Prozessen. TNF vermittelt seine biologischen Funktionen, zu denen neben Zellproliferation und Entzündungsmodulierung auch programmierter Zelltod (Apoptose) zählt, durch zwei unterschiedliche Zelloberflächen-Rezeptoren, TNF-Rezeptor Typ I (TNFR1) und Typ II (TNFR2). Unterschiedliche genetische Befunde zeigen die Assoziation eines biallelichen Polymorphismus (T676G) im humanen TNFR2 mit chronisch entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen (Systemischer Lupus erythematosus, rheumatoide Arthritis, Colitis ulcerosa, Parodontitis, Narkolepsie, Morbus Alzheimer). Der Basenaustausch führt zu einer Codonänderung und zur Substitution einer Aminosäure im extrazellulären Teil des Rezeptorproteins (Methionin \rightarrow Arginin an Position 196). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch stabile Überexpression der zwei TNFR2-Varianten *in vitro* Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptorproteins, der Liganden-abhängigen Signalgebung und der Aktivierung von Signaltransduktionswegen aufzuklären. Weiterhin sollte der Einfluss des TNFR2 auf die TNFR1-vermittelte Apoptose und die Expression von TNF-Zielgenen untersucht werden. Als Konsequenz sollten die gewonnenen Daten zur Erstellung einer Hypothese herangezogen werden, die die Assoziation des Polymorphismus mit den beschriebenen Erkrankungen auf Basis molekularer Mechanismen erklären hilft.

Als methodischer Ansatz wurde die stabile und transiente Überexpression der TNFR2-Varianten in HeLa-Zellen und immortalisierten Maus-Fibroblasten mit genetischer Defizienz für beide TNFR-Subtypen gewählt. Durch den Einsatz von rekombinantem $\text{TNF}\alpha$, Rezeptor-spezifischen TNF-Mutanten (sog. Muteinen) und monoklonalen Antikörpern zur Stabilisierung des TNFR2-Rezeptorkomplexes wurden Bindungsstudien, Reporterassays und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Weiterhin wurde die TNFR1-induzierte Apoptose unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht und die Signaltransduktion durch die TNFR2-Varianten auf Ebene des Signalkomplexes charakterisiert.

Es konnte kein Hinweis auf einen Einfluss der Aminosäuresubstitution auf die biophysikalischen Bindungseigenschaften des Rezeptors gefunden werden. Vielmehr deuten die hier vorliegenden Daten darauf hin, dass die mutierte 196Arg-Variante der TNFR2 (i) eine geringere Fähigkeit zur Ausbildung eines Signalkomplexes mit dem Adaptorprotein TRAF2 besitzt, (ii) dadurch eine ineffizientere Aktivierung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges bewirken kann, (iii) deutlich verminderte Expression von antiapoptotischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -abhängigen Genen bewirkt und dadurch (iv) eine höhere Sensitivität für $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose verursacht.

Da die von der Substitution betroffene Aminosäure im extrazellulären Teil des Proteins in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran liegt, lässt sich der beschriebene Effekt nur durch einen Einfluss des Aminosäureaustauschs auf die Liganden-abhängige Konformationsänderung erklären. Dies könnte zu einer verzögerten oder ineffizienteren Rekrutierung assoziierter Proteine und dadurch zu einer Defizienz in der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führen.

Die pathophysiologische Konsequenz der Mutation im TNFR2 könnte nach den vorgelegten Daten ein gestörtes Zytokin-Milieu mit einem negativen Einfluss auf die Proliferation von pathogen-spezifischen Immunzellen und eine verminderte Apoptose von aktivierten T-Effektorzellen im Zuge der adaptiven Immunantwort sein.

6 SUMMARY

Tumor necrosis factor α (TNF α) is a pleiotropic cytokine which plays an important role in coordination of immune response and in pathophysiological processes. TNF α displays its biological functions, which cover cell proliferation and modulation of inflammation as well as programmed cell death (apoptosis), by binding to two distinct cell surface receptors, namely TNF receptor type I (TNFR1) and type II (TNFR2). Several studies based on genetic approaches show an association of the biallelic polymorphism T676G in human TNFR2 with chronic inflammatory and non-inflammatory diseases (*i.e.* systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, colitis ulcerosa, periodontitis, narcolepsia, Alzheimer's disease). Substitution of the nucleotide T on RNA-Position 676 by G leads to change of the codon for aminoacid 196 in the extracellular domain of the receptor protein (methionine 196 \rightarrow arginine). The aim of this thesis was to use stable overexpression of the two respective variants of TNFR2 *in vitro* to evaluate differences in biophysical properties of the receptor, ligand-dependent signaling and activation of signal transduction pathways. In addition, the influence of TNFR2 triggering on TNFR1-mediated apoptosis and expression of TNF target genes should be explored. As a consequence, the data should be used to raise a hypothesis of how the association of the TNFR2-polymorphism with the diseases mentioned can be explained.

The experimental approach implied stable and transient overexpression of TNFR2 variants in HeLa cells and in immortalized fibroblasts from mice with genetic deficiency in both TNFR1 and TNFR2. Radioactive binding studies, reporter gene assays and gene expression analyses were performed using recombinant TNF α , receptor specific TNF mutants (so-called 'mimetics') and monoclonal antibodies for stabilisation of TNFR2-receptor complexes. Furthermore, TNFR1-induced apoptosis was analyzed under varying conditions, and signal transduction events triggered by TNFR2 variants were characterized, ranging from the assembly of the signaling complex to the activation of signaling cascades.

There was no experimental evidence that the substitution of Met196 by Arg has any influence on the biophysical binding properties of the receptor. The data presented here argue for an impaired ability of the 196Arg variant of TNFR2 to (i) form a signaling complex with the cytosolic adaptor protein TRAF2, (ii) activate the NF κ B- signaling pathway, (iii) induce NF κ B-dependent expression of antiapoptotic and proinflammatory gene expression, and (iv) counteract TNFR1-mediated proapoptotic signaling by activation of antiapoptotic pathways. The deficiency of the 196Arg variant of TNFR2 in NF κ B-signaling finally results in enhanced sensitivity of the cells to TNF-induced apoptosis.

The aminoacid which is affected by the polymorphism is situated in the extracellular portion of the receptor in close proximity to the cell membrane. Since it appears unlikely that the substitution directly influences the conformational structure of the intracellular TRAF2-binding domain, the data argue for an impact of the polymorphic aminoacid on the ligand-induced conformational change of the receptor complex. This spatiotemporal effect leads to a delayed or ineffective recruitment of associated adaptor proteins resulting in impaired activation of downstream signaling pathways.

Regarding the *in vivo*- functions of human TNFR2 reported so far, the mutation could lead to (i) defective cytokine release by immune-modulatory cells resulting in impaired proliferation of pathogen-specific immune cells, and (ii) diminished apoptosis of activated T-effector cells in the context of adaptive immune response.

7 Literatur

- Aggarwal, B. B., 2003, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, *Nat Rev Immunol* **3**(9):745-56.
- Armitage, R. J., 1994, Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands, *Curr Opin Immunol* **6**(3):407-13.
- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D., 1996, NF-kappa B: ten years after, *Cell* **87**(1):13-20.
- Baeuerle, P. A., and Henkel, T., 1994, Function and activation of NF-kappa B in the immune system, *Annu Rev Immunol* **12**:141-79.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W., 1993, Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation, *Cell* **73**(3):431-45.
- Bard, M., Lees, N. D., Burrows, L. S., and Kleinhans, F. W., 1978, Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants, *J Bacteriol* **135**(3):1146-8.
- Barton, A., John, S., Ollier, W. E., Silman, A., and Worthington, J., 2001, Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians, *Arthritis Rheum* **44**(1):61-5.
- Beck, S. C., and Meyer, T. F., 2000, IgA1 protease from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits TNFalpha-mediated apoptosis of human monocytic cells, *FEBS Lett* **472**(2-3):287-92.
- Beltinger, C. P., White, P. S., Maris, J. M., Sulman, E. P., Jensen, S. J., LePaslier, D., Stallard, B. J., Goeddel, D. V., de Sauvage, F. J., and Brodeur, G. M., 1996, Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene, *Genomics* **35**(1):94-100.
- Ben-Neriah, Y., and Schmitz, M. L., 2004, Of mice and men, *EMBO Rep* **5**(7):668-73. Epub 2004 Jun 25.
- Bernard, D., Quatannens, B., Begue, A., Vandenbunder, B., and Abbadie, C., 2001, Antiproliferative and antiapoptotic effects of c-rel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase, *Cancer Res* **61**(6):2656-64.
- Beutler, B., 2004, Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling, *Nature* **430**(6996):257-63.
- Bird, T. A., Schooley, K., Dower, S. K., Hagen, H., and Virca, G. D., 1997, Activation of nuclear transcription factor NF-kappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit, *J Biol Chem* **272**(51):32606-12.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P., 1997, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature* **385**(6618):729-33.
- Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H., and Wallach, D., 1995, Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects, *J Biol Chem* **270**(1):387-91.
- Boye, J., 2002, Funktionelle Studien zum TNFR2 (Diplom-Arbeit), *Klinik für Allgemeine Innere Medizin, UK Kiel*.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**:248-54.
- Bradley, J. R., and Pober, J. S., 2001, Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs), *Oncogene* **20**(44):6482-91.
- Brockhaus, M., Schoenfeld, H. J., Schlaeger, E. J., Hunziker, W., Lesslauer, W., and Loetscher, H., 1990, Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies, *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(8):3127-31.
- Butera, S. T., Roberts, B. D., and Folks, T. M., 1996, Ligand passing by the p75 tumour necrosis factor receptor enhances HIV-1 activation, *Cytokine* **8**(10):745-50.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B., 1975, An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9):3666-70.
- Chainy, G. B., Singh, S., Raju, U., and Aggarwal, B. B., 1996, Differential activation of the nuclear factor-kappa B by TNF mutants specific for the p60 and p80 TNF receptors, *J Immunol* **157**(6):2410-7.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J., 2000, A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling, *Science* **288**(5475):2351-4.

- Chan, F. K., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., and Lenardo, M. J., 2003, A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses, *J Biol Chem* **278**(51):51613-21. Epub 2003 Oct 7.
- Chawla-Sarkar, M., Bae, S. I., Reu, F. J., Jacobs, B. S., Lindner, D. J., and Borden, E. C., 2004, Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis, *Cell Death Differ* **11**(8):915-23.
- Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q., and Ghosh, G., 1998, Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA, *Nature* **391**(6665):410-3.
- Clark, M. A., Chen, M. J., Crooke, S. T., and Bomalaski, J. S., 1988, Tumour necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2-activating protein in endothelial cells, *Biochem J* **250**(1):125-32.
- Clauss, M., Grell, M., Fangmann, C., Fiers, W., Scheurich, P., and Risau, W., 1996, Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor: functional analysis of the tumor necrosis factor receptors, *FEBS Lett* **390**(3):334-8.
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., and Cheng, G., 2003, The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily, *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(3-4):193-209.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M., 1997, A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB, *Nature* **388**(6642):548-54.
- Dieude, P., Petit, E., Cailleau-Moindrault, S., Osorio, J., Pierlot, C., Martinez, M., Faure, S., Alibert, O., Lasbleiz, S., De Toma, C., Bardin, T., Prum, B., and Cornelis, F., 2002, Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity, *Arthritis Rheum* **46**(8):2039-44.
- Duckett, C. S., and Thompson, C. B., 1997, CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival, *Genes Dev* **11**(21):2810-21.
- Fabris, M., Tulusso, B., Di Poi, E., Assaloni, R., Sinigaglia, L., and Ferraccioli, G., 2002, Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis, *J Rheumatol* **29**(9):1847-50.
- Fotin-Mleczeck, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J. A., and Wajant, H., 2002, Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8, *J Cell Sci* **115**(Pt 13):2757-70.
- Fransen, L., Ruyschaert, M. R., Van der Heyden, J., and Fiers, W., 1986, Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines, *Cell Immunol* **100**(1):260-7.
- Gaffney, P. M., Kearns, G. M., Shark, K. B., Ortmann, W. A., Selby, S. A., Malmgren, M. L., Rohlf, K. E., Ockenden, T. C., Messner, R. P., King, R. A., Rich, S. S., and Behrens, T. W., 1998, A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25):14875-9.
- Gamonal, J., Sanz, M., O'Connor, A., Acevedo, A., Suarez, I., Sanz, A., Martinez, B., and Silva, A., 2003, Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients, *J Clin Periodontol* **30**(7):616-23.
- Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., and Grumont, R., 1999, Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and I kappa B function: transgenics and knockouts, *Oncogene* **18**(49):6888-95.
- Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S., and Sigler, P. B., 1995, Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site, *Nature* **373**(6512):303-10.
- Girardin, S. E., Hugot, J. P., and Sansonetti, P. J., 2003, Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing, *Trends Immunol* **24**(12):652-8.
- Granger, G. A., Shacks, S. J., Williams, T. W., and Kolb, W. P., 1969, Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells, *Nature* **221**(5186):1155-7.
- Green, D. R., and Kroemer, G., 2004, The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science* **305**(5684):626-9.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., and et al., 1995, The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor, *Cell* **83**(5):793-802.
- Grell, M., Scheurich, P., Meager, A., and Pfizenmaier, K., 1993, TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytotoxicity, *Lymphokine Cytokine Res* **12**(3):143-8.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P., 1998, The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2):570-5.

- Grell, M., Zimmermann, G., Gottfried, E., Chen, C. M., Grunwald, U., Huang, D. C., Wu Lee, Y. H., Durkop, H., Engelmann, H., Scheurich, P., Wajant, H., and Strasser, A., 1999, Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF, *Embo J* **18**(11):3034-43.
- Grosset, C., Boniface, R., Duchez, P., Solanilla, A., Cosson, B., and Ripoche, J., 2004, In vivo studies of translational repression mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich element, *J Biol Chem* **279**(14):13354-62. Epub 2004 Jan 15.
- Haridas, V., Darnay, B. G., Natarajan, K., Heller, R., and Aggarwal, B. B., 1998, Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, and c-Jun kinase activation, *J Immunol* **160**(7):3152-62.
- Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M., and Cohen, G. M., 2003, Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis, *J Biol Chem* **278**(28):25534-41. Epub 2003 Apr 29.
- Heller, R. A., Song, K., Fan, N., and Chang, D. J., 1992, The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity, *Cell* **70**(1):47-56.
- Helms, M. J., Mohamed, A. A., and MacEwan, D. J., 2001, Modulated kinase activities in cells undergoing tumour necrosis factor-induced apoptotic cell death, *FEBS Lett* **505**(1):68-74.
- Herman, C., and Chernajovsky, Y., 1998, Mutation of proline 211 reduces shedding of the human p75 TNF receptor, *J Immunol* **160**(5):2478-87.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A., 1999, Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science* **284**(5418):1313-8.
- Hohjoh, H., Terada, N., Kawashima, M., Honda, Y., and Tokunaga, K., 2000, Significant association of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) gene with human narcolepsy, *Tissue Antigens* **56**(5):446-8.
- Holtmann, M. H., Douni, E., Schutz, M., Zeller, G., Mudter, J., Lehr, H. A., Gerspach, J., Scheurich, P., Galle, P. R., Kollias, G., and Neurath, M. F., 2002a, Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo, *Eur J Immunol* **32**(11):3142-51.
- Holtmann, M. H., Schutz, M., Galle, P. R., and Neurath, M. F., 2002b, Functional relevance of soluble TNF-alpha, transmembrane TNF-alpha and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases, *Z Gastroenterol* **40**(8):587-600.
- Hsu, K. C., and Chao, M. V., 1993, Differential expression and ligand binding properties of tumor necrosis factor receptor chimeric mutants, *J Biol Chem* **268**(22):16430-6.
- Hyrich, K. L., Silman, A. J., Watson, K. D., and Symmons, D. P., 2004, Anti-TNF[alpha] treatment in rheumatoid arthritis: an update on safety, *Ann Rheum Dis* **8**:8.
- Idriss, H. T., and Naismith, J. H., 2000, TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s), *Microsc Res Tech* **50**(3):184-95.
- Inohara, N., and Nunez, G., 2003, NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis, *Nat Rev Immunol* **3**(5):371-82.
- Ishikawa, Y., Kashiwase, K., Akaza, T., Morishima, Y., Inoko, H., Sasazuki, T., Kodera, Y., and Juji, T., 2002, Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant* **29**(7):569-75.
- Itoh, N., and Nagata, S., 1993, A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen, *J Biol Chem* **268**(15):10932-7.
- Jones, P. L., Ping, D., and Boss, J. M., 1997, Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB, *Mol Cell Biol* **17**(12):6970-81.
- Jupp, O. J., McFarlane, S. M., Anderson, H. M., Littlejohn, A. F., Mohamed, A. A., MacKay, R. H., Vandenabeele, P., and MacEwan, D. J., 2001, Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways, *Biochem J* **359**(Pt 3):525-35.
- Karin, M., 1999, The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation, *J Biol Chem* **274**(39):27339-42.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y., 2000, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annu Rev Immunol* **18**:621-63.
- Kassiotis, G., Bauer, J., Akassoglou, K., Lassmann, H., Kollias, G., and Probert, L., 1999, A tumor necrosis factor-induced model of human primary demyelinating diseases develops in immunodeficient mice, *Eur J Immunol* **29**(3):912-7.

- Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G., and Kontoyiannis, D., 1999, The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease, *Ann Rheum Dis* **58**(Suppl 1):I32-9.
- Komata, T., Tsuchiya, N., Matsushita, M., Hagiwara, K., and Tokunaga, K., 1999, Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus, *Tissue Antigens* **53**(6):527-33.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., and Kollias, G., 1999, Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies, *Immunity* **10**(3):387-98.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H., 2001, NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling, *Mol Cell Biol* **21**(12):3964-73.
- Krippner-Heidenreich, A., Tubing, F., Bryde, S., Willi, S., Zimmermann, G., and Scheurich, P., 2002, Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction, *J Biol Chem* **277**(46):44155-63. Epub 2002 Sep 4.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**(259):680-5.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J., 1998, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* **94**(4):491-501.
- Li, X., and Stark, G. R., 2002, NFkappaB-dependent signaling pathways, *Exp Hematol* **30**(4):285-96.
- Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J. D., 2002, TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2, *Nature* **416**(6878):345-7.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J., 2001, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology, *Cell* **104**(4):487-501.
- Loetscher, H., Stueber, D., Banner, D., Mackay, F., and Lesslauer, W., 1993, Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors, *J Biol Chem* **268**(35):26350-7.
- Longo, C. R., Arvelo, M. B., Patel, V. I., Daniel, S., Mahiou, J., Grey, S. T., and Ferran, C., 2003, A20 protects from CD40-CD40 ligand-mediated endothelial cell activation and apoptosis, *Circulation* **108**(9):1113-8. Epub 2003 Jul 28.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M., 1999, RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20):11364-9.
- MacEwan, D. J., 2002, TNF ligands and receptors--a matter of life and death, *Br J Pharmacol* **135**(4):855-75.
- Macmillan-Crow, L. A., and Cruthirds, D. L., 2001, Invited review: manganese superoxide dismutase in disease, *Free Radic Res* **34**(4):325-36.
- Madrid, L. V., Mayo, M. W., Reuther, J. Y., and Baldwin, A. S., Jr., 2001, Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38, *J Biol Chem* **276**(22):18934-40. Epub 2001 Mar 20.
- Maini, R. N., Taylor, P. C., Paleolog, E., Charles, P., Ballara, S., Brennan, F. M., and Feldmann, M., 2000, Insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis from application of anti-TNF therapy, *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **23**(6):487-9.
- Malewicz, M., Zeller, N., Yilmaz, Z. B., and Weih, F., 2003, NF kappa B controls the balance between Fas and tumor necrosis factor cell death pathways during T cell receptor-induced apoptosis via the expression of its target gene A20, *J Biol Chem* **278**(35):32825-33. Epub 2003 Jun 16.
- McLeish, K. R., Klein, J. B., Lederer, E. D., Head, K. Z., and Ward, R. A., 1996, Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms, *Kidney Int* **50**(2):407-16.
- McWhirter, S. M., Pullen, S. S., Werneburg, B. G., Labadia, M. E., Ingraham, R. H., Crute, J. J., Kehry, M. R., and Alber, T., 1999, Structural and biochemical analysis of signal transduction by the TRAF family of adapter proteins, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**:551-62.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E., 1997, FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *Embo J* **16**(10):2794-804.
- Mercurio, F., and Manning, A. M., 1999a, Multiple signals converging on NF-kappaB, *Curr Opin Cell Biol* **11**(2):226-32.
- Mercurio, F., and Manning, A. M., 1999b, NF-kappaB as a primary regulator of the stress response, *Oncogene* **18**(45):6163-71.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J., 2001, NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP, *Mol Cell Biol* **21**(16):5299-305.

- Micheau, O., and Tschopp, J., 2003, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes, *Cell* **114**(2):181-90.
- Minden, A., and Karin, M., 1997, Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases, *Biochim Biophys Acta* **1333**(2):F85-104.
- Moreland, L. W., 2004, Drugs that block tumour necrosis factor: experience in patients with rheumatoid arthritis, *Pharmacoeconomics* **22**(2 Suppl):39-53.
- Morita, C., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Hatta, N., Kikuchi, Y., Arinobu, Y., Otsuka, T., Sawabe, T., Harashima, S., Nagasawa, K., and Niho, Y., 2001, Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis, *Arthritis Rheum* **44**(12):2819-27.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A., 1987, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* **155**:335-50.
- Naismith, J. H., and Sprang, S. R., 1998, Modularity in the TNF-receptor family, *Trends Biochem Sci* **23**(2):74-9.
- Nokta, M., Rossero, R., Loesch, K., and Pollard, R. B., 1997, Kinetics of tumor necrosis factor alpha and soluble TNFRII in HIV-infected patients treated with a triple combination of stavudine, didanosine, and hydroxyurea, *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**(18):1633-8.
- Odeh, M., Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., and Kollias, G., 2001, The role of tumour necrosis factor-alpha in the pathogenesis of complicated falciparum malaria
- Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies, *Cytokine* **14**(1):11-8.
- Old, L. J., 1985, Tumor necrosis factor (TNF), *Science* **230**(4726):630-2.
- Ouyang, Y. B., and Giffard, R. G., 2004, Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function, *Cell Calcium* **36**(3-4):303-11.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., and Donner, D. B., 1999, NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase, *Nature* **401**(6748):82-5.
- Pahl, H. L., 1999, Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene* **18**(49):6853-66.
- Pan, S., An, P., Zhang, R., He, X., Yin, G., and Min, W., 2002, Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis, *Mol Cell Biol* **22**(21):7512-23.
- Pantelidis, P., Lympany, P. A., Foley, P. J., Fanning, G. C., Welsh, K. I., and du Bois, R. M., 1999, Polymorphic analysis of the high-affinity tumor necrosis factor receptor 2, *Tissue Antigens* **54**(6):585-91.
- Papadakis, K. A., and Targan, S. R., 2000, Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors, *Gastroenterology* **119**(4):1148-57.
- Pasare, C., and Medzhitov, R., 2003, Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance, *Curr Opin Immunol* **15**(6):677-82.
- Paul, J., 1975, Cell and Tissue Culture (C. Livingstone, ed.), Edinburgh.
- Pennica, D., Lam, V. T., Weber, R. F., Kohr, W. J., Basa, L. J., Spellman, M. W., Ashkenazi, A., Shire, S. J., and Goeddel, D. V., 1993, Biochemical characterization of the extracellular domain of the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor, *Biochemistry* **32**(12):3131-8.
- Peral, B., San Millan, J. L., Castello, R., Moghetti, P., and Escobar-Morreale, H. F., 2002, Comment: the methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism, *J Clin Endocrinol Metab* **87**(8):3977-83.
- Perry, R. T., Collins, J. S., Wiener, H., Acton, R., and Go, R. C., 2001, The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* **22**(6):873-83.
- Pfeffer, K., 2003, Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors, *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(3-4):185-91.
- Pierik, M., Vermeire, S., Steen, K. V., Joossens, S., Claessens, G., Vlietinck, R., and Rutgeerts, P., 2004, Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab, *Aliment Pharmacol Ther* **20**(3):303-10.
- Pimentel-Muinos, F. X., and Seed, B., 1999, Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation, *Immunity* **11**(6):783-93.
- Probert, L., Akassoglou, K., Kassiotis, G., Pasparakis, M., Alexopoulou, L., and Kollias, G., 1997, TNF-alpha transgenic and knockout models of CNS inflammation and degeneration, *J Neuroimmunol* **72**(2):137-41.

- Probert, L., Eugster, H. P., Akassoglou, K., Bauer, J., Frei, K., Lassmann, H., and Fontana, A., 2000, TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease, *Brain* **123**(Pt 10):2005-19.
- Puck, T. T., Marcus, P. I., and Ciciura, S. J., 1956, Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer, *J Exp Med* **103**(2):273-83.
- Read, M. A., Brownell, J. E., Gladysheva, T. B., Hottel, M., Parent, L. A., Coggins, M. B., Pierce, J. W., Podust, V. N., Luo, R. S., Chau, V., and Palombella, V. J., 2000, Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(betaTrCP)-dependent ubiquitination of I kappa Balpha, *Mol Cell Biol* **20**(7):2326-33.
- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V., and Williams, L. T., 1997, Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2, *Embo J* **16**(5):1080-92.
- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., and Goeddel, D. V., 1995, The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins, *Cell* **83**(7):1243-52.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V., 1994, A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor, *Cell* **78**(4):681-92.
- Rothman, S. W., 1986, Technique for measuring 50% end points in cytotoxicity assays for Clostridium difficile toxins, *J Clin Pathol* **39**(6):672-6.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C., 1997, The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases, *Embo J* **16**(23):6914-25.
- Rutgeerts, P., Van Assche, G., and Vermeire, S., 2004, Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* **126**(6):1593-610.
- Sandborn, W. J., and Hanauer, S. B., 1999, Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety, *Inflamm Bowel Dis* **5**(2):119-33.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12):5463-7.
- Scherzer, J. A., Lin, Y., McLeish, K. R., Klein, J. B., Lederer, E. D., Head, K. Z., and Ward, R. A., 1997, TNF translationally modulates the expression of G1 protein alpha(i2) subunits in human polymorphonuclear leukocytes
- Azotemia, TNF alpha, and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms, *J Immunol* **158**(2):913-8.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J., Hamling, J., Koop, I., Groessner, B., Lochs, H., and Raedler, A., 1999, Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease, *Lancet* **353**(9151):459-61.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E., 1998, Apoptosis signaling by death receptors, *Eur J Biochem* **254**(3):439-59.
- Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., and Kronke, M., 1992, TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown, *Cell* **71**(5):765-76.
- Sen, R., and Baltimore, D., 1986a, Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism, *Cell* **47**(6):921-8.
- Sen, R., and Baltimore, D., 1986b, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences, *Cell* **46**(5):705-16.
- Shimada, Y., Tai, H., Endo, M., Kobayashi, T., Akazawa, K., and Yamazaki, K., 2004, Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis, *J Clin Periodontol* **31**(6):463-9.
- Shingarova, L. N., Sagaidak, L. N., Turetskaia, R. L., Nedospasov, S. A., Esipov, D. S., and Korobko, V. G., 1996, [Human tumor necrosis factor mutants: preparation and some properties], *Bioorg Khim* **22**(4):243-51.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K., 1994, Structure, regulation and function of NF-kappa B, *Annu Rev Cell Biol* **10**:405-55.
- Silverman, N., and Maniatis, T., 2001, NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity, *Genes Dev* **15**(18):2321-42.
- Sizemore, N., Leung, S., and Stark, G. R., 1999, Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit, *Mol Cell Biol* **19**(7):4798-805.
- Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G., 1994, The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death, *Cell* **76**(6):959-62.
- Speiser, D. E., Lee, S. Y., Wong, B., Arron, J., Santana, A., Kong, Y. Y., Ohashi, P. S., and Choi, Y., 1997, A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells, *J Exp Med* **185**(10):1777-83.
- Stryer, L., 1995, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V., 1993a, A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death, *Cell* **74**(5):845-53.
- Tartaglia, L. A., Pennica, D., and Goeddel, D. V., 1993b, Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor, *J Biol Chem* **268**(25):18542-8.
- Tchorzewski, H., Zeman, K., Paleolog, E., Brennan, F., Feldmann, M., Kahan, M., Guga, P., Kwinkowski, M., Szymanska, B., Jarosz, J., and et al., 1993, The effects of tumor necrosis factor (TNF) derivatives on TNF receptors, *Cytokine* **5**(2):125-32.
- Tournier, C., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Barrett, T., and Davis, R. J., 1997, Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14):7337-42.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9):4350-4.
- Trent, J. C., 2nd, McConkey, D. J., Loughlin, S. M., Harbison, M. T., Fernandez, A., and Ananthaswamy, H. N., 1996, Ras signaling in tumor necrosis factor-induced apoptosis, *Embo J* **15**(17):4497-505.
- Tsuchiya, N., Komata, T., Matsushita, M., Ohashi, J., and Tokunaga, K., 2000, New single nucleotide polymorphisms in the coding region of human TNFR2: association with systemic lupus erythematosus, *Genes Immun* **1**(8):501-3.
- Tsuchiya, N., Ohashi, J., and Tokunaga, K., 2002, Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders, *Immunol Rev* **190**:169-81.
- Tsukumo, S. I., and Yonehara, S., 1999, Requirement of cooperative functions of two repeated death effector domains in caspase-8 and in MC159 for induction and inhibition of apoptosis, respectively, *Genes Cells* **4**(9):541-9.
- Turner, S. J., La Gruta, N. L., Stambas, J., Diaz, G., and Doherty, P. C., 2004, Differential tumor necrosis factor receptor 2-mediated editing of virus-specific CD8+ effector T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10):3545-50. Epub 2004 Mar 1.
- Van Ostade, X., Vandenabeele, P., Tavernier, J., and Fiers, W., 1994, Human tumor necrosis factor mutants with preferential binding to and activity on either the R55 or R75 receptor, *Eur J Biochem* **220**(3):771-9.
- Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Boone, E., De Bosscher, K., Schmitz, M. L., Fiers, W., and Haegeman, G., 1998, p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor, *J Biol Chem* **273**(6):3285-90.
- Vercammen, D., Vandenabeele, P., Declercq, W., Van de Craen, M., Grooten, J., and Fiers, W., 1995, Cytotoxicity in L929 murine fibrosarcoma cells after triggering of transfected human p75 tumour necrosis factor (TNF) receptor is mediated by endogenous murine TNF, *Cytokine* **7**(5):463-70.
- Vogt, P. K., 2001, Jun, the oncoprotein, *Oncogene* **20**(19):2365-77.
- Waetzig, G. H., Seeger, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S., and Schreiber, S., 2002, p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease, *J Immunol* **168**(10):5342-51.
- Wajant, H., Haas, E., Schwenzler, R., Muhlenbeck, F., Kreuz, S., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., and Scheurich, P., 2000, Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD), *J Biol Chem* **275**(32):24357-66.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P., 2003, Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ* **10**(1):45-65.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr., 1998, NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science* **281**(5383):1680-3.
- Wang, D., and Baldwin, A. S., Jr., 1998, Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529, *J Biol Chem* **273**(45):29411-6.
- Wang, D., and Richmond, A., 2001, Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway, *J Biol Chem* **276**(5):3650-9. Epub 2000 Nov 2.
- Wiegmann, K., Schutze, S., Kampen, E., Himmler, A., Machleidt, T., and Kronke, M., 1992, Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades, *J Biol Chem* **267**(25):17997-8001.
- Xiao, G., Harhaj, E. W., and Sun, S. C., 2001, NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100, *Mol Cell* **7**(2):401-9.
- Xu, Y., Kiningham, K. K., Devalaraja, M. N., Yeh, C. C., Majima, H., Kasarskis, E. J., and St Clair, D. K., 1999, An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, *DNA Cell Biol* **18**(9):709-22.

- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., and Israel, A., 1998, Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation, *Cell* **93**(7):1231-40.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B., 2001, The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation, *Nat Immunol* **2**(7):620-4.
- Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S., 1998, Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300, *Mol Cell* **1**(5):661-71.
- Zou, T., Rao, J. N., Guo, X., Liu, L., Zhang, H. M., Strauch, E. D., Bass, B. L., and Wang, J. Y., 2004, NF- κ B-mediated IAP expression induces resistance of intestinal epithelial cells to apoptosis after polyamine depletion, *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(5):C1009-18. Epub 2003 Dec 18.

Anhang - verwendete Materialien

Chemikalien/Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
6-Amino-Caprinsäure	Sigma/Aldrich, Steinheim
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	BioRad, München
Agar Agar	Serva, Heidelberg
Agarose SeaKem LE	Biozym, Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Yeast Extract	BD Biosciences
Bis-(2-Ethyl-Hexyl)Phtalsäure-Ester	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	New England Biolabs, Bad, Schwalbach
β -Mercaptoethanol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma
Cycloheximid	Sigma
DCFH-DA	Molecular Probes, Göttingen
DEPC	Sigma
Dibutyl-Phtalat	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
Ethidumbromid	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
G418 (Geneticin)	PAA
Glycerol	Sigma
HCl	Sigma
Hepes	Biochrom KG, Berlin
Imidazol	Qiagen, Hilden
IPTG	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
¹²⁵ Iodotyrosyl-TNF α (human)	Amersham Lifescience, Freiburg
Kanamycin	Merck
KCl	Sigma
KH ₂ PO ₄	Sigma
Kristallviolett (Gentianaviolett)	Sigma
Magermilchpulver (MMP)	BioRad, München
Methanol	Merck
MG132	Sigma
MgCl ₂	Sigma
MgSO ₄	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Sigma
NaCl	Sigma
Natriumazid	Sigma
NiNTA-Agarose	Qiagen
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail (50X)	Sigma
ProteinA/G-Agarose-Beads	SantaCruz, Heidelberg
Puromycin	Sigma
SDS	Sigma
Staurosporin	Merck
TEMED	Sigma
TNF α (human, rekombinant)	R&D Systems
Tris	Merck

TritonX-100	Sigma
Tween20	Sigma
Trypsin/EDTA (1X)	Invitrogen , Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma
ZVAD-fmk	Alexis Corp., Grünberg

Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A.bidest. angesetzt, Medien für die Bakterienkultur wurden nach Ansetzen autoklaviert und bis zur Benutzung gekühlt und unter Luftabschluss gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
25X TAE	1 M Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 500 mM Essigsäure
4X Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
4X Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
10X DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
2XDLB	20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 2 % (w/v) SDS
5X SDS-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol
Bindepuffer	1X PBS + 20 mM HEPES, 2 % (w/v) BSA, (0,05 % (w/v) Natriumazid)
DNA-Isolierungspuffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 0,2 % (w/v) SDS
EB250	300 mM NaCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 250 mM Imidazol, pH 8,0
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-Capronsäure
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Yeast Extract, 5g/l NaCl, 15 g/l Agar Agar
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Yeast Extract, 5g/l NaCl
IP-Lysepuffer	1X PBS + 1% TritonX100
NLB	300 mM NaCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM Imidazol, pH 8,0
5X PBS	40 g/l NaCl, 5,8 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l KCl
SOCS-Medium	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol
TE (pH 7,6; pH 8,0)	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA
TTBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20
WB20	300 mM NaCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM Imidazol, pH 8,0
WB40	300 mM NaCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM Imidazol, pH 8,0
WB50	300 mM NaCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 50 mM Imidazol, pH 8,0

Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Advantage RT-for-PCR	Clontech, Heidelberg
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB, Bad Schwalbach
<i>Bam</i> H1	NEB
Big Dye Terminator Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Cytoset ELISA Kit GM-CSF (human)	R&D-Systems, Wiesbaden
Cytoset ELISA Kit IL-6 (human)	R&D-Systems
Cytoset ELISA Kit IL-8 (human)	R&D-Systems
Cytoset ELISA Kit sTNFR2	R&D-Systems
DC Protein Assay	BioRad, München

Detoxi Endotoxin-Removal Columns	Pierce, PerbioScience, Bonn
DLA Kit	Promega, Mannheim
DNase I	Qiagen, Hilden
<i>Dpn</i> I	NEB
DyeEx Kit	Qiagen
ECL-PLUS	Amersham
<i>Hind</i> III	NEB
MiniElute DNA Kit	Qiagen
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega
Platinum <i>Taq</i> High Fidelity	Invitrogen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QiaPrep Miniprep Kit	Qiagen
QiaShredder	Qiagen
QuickChange site-directed-mutagenesis Kit	Stratagene, Heideleberg
RNeasy	Qiagen,Hilden
<i>Sal</i> I	NEB
T4 Ligase	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase Kit	Qiagen
<i>Xho</i> I	NEB

Primärantikörper

Die Verdünnung der Antikörper für Westernblotanalysen wurde wie in folgender Tabelle angegeben in TTBS vorgenommen.

Zielprotein	Bezeichnung	Spezies , Verdünnung	Hersteller
β-Actin	anti-β-Actin	ms , 1: 2500 (4% MMP)	Sigma-Aldrich, Hilden
(phospho-)cJun	anti-(phospho-)cJun	rb , 1:1000 (3% BSA)	CST, Frankfurt
(phospho-)ERK1/2	anti-(phospho-)ERK1/2	rb , 1:1000 (3% MMP)	CST
(phospho-)IκBα	anti-(phospho-)IκBα	rb , 1:1000 (3% MMP)	CST
(phospho-)p38	anti-(phospho-)p38	rb , 1:1000 (5% MMP)	CST
(phospho-)p65	anti-(phospho-)p65	rb 1:1000 (3% MMP)	CST
PARP	anti-PARP (human)	rb , 1:1000 (5% MMP)	CST
TNFα (human)	IFX Remicade	ms , 1:500 (2% BSA)	Centocor, Malvern, PA, USA
TNFR2	gt-anti-TNFR2	gt , 1:500 (2% BSA)	R&D Systems, Wiesbaden
TNFR2	ab8161	ms , 1:1000 (4% MMP)	AbCam, Acris, Bad Nauheim
TNFR2	anti-TNFR2	rb , 1:500 (3% MMP)	Stressgen, Hamburg
TNFR2	anti-TNFR2	rb , 1:500 (3% MMP)	R&D Systems
TNFR2	80M2	ms , 1:1000 (2% BSA)	Inst. f. Zellbiologie, Stuttgart
TRAF2	anti-TRAF2	rb 1:500 (4% MMP)	Santa Cruz, Heidelberg

(ms, rb, gt bezeichnet die Spezies des IgG, ms = Maus, rb = Kaninchen, gt = Ziege, die Prozentangabe (w/v) bezieht sich auf die Blocking-Substanz; MMP = Magermilchpulver, BSA = *bovine serum albumine*,)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti-Rabbit-HRP	Amersham
anti-Mouse-HRP	Amersham
anti-Goat-HRP	Sigma
anti-Rabbit-IgG-FITC	Molecular Probes
anti-Maus-IgG-Cy3	Molecular Probes
anti-Maus-IgG-AlexaFluor488	Molecular Probes

Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-N1	Clontech
pGL3-Promoter	Promega
pGL3-Enhancer	Promega
pBabe-Puro	<i>freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. H. Schäfer, Kiel</i>
pNF κ B-LUC	Clontech
pRL-TK	Promega

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide („Primer“) wurden zur Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR benutzt:

Primername	Sequenz (5' → 3')	T _{anneal} (°C)	Zyklen	Amplikon (bp)	Acc.No. (GenBank)
β -Actin_s	GATGGTGGGCATGGGTCAG				
β -Actin_a	CTTAATGTCACGCACGATTTCC	55	30	518	NM001101
A20-19F	GGACTTTGCGAAAGGATCG				
A20-543R	ATAGCAAAGCCCCGTTTCA	53	28	524	BC072681
Bcl-XL-818s	GCGTGGAAAGCGTAGACAA				
Bcl-XL-1068a	TCATTTCCGACTGAAGAGTGAG	57	31	250	BC019307
Catalase_s	TTGGCTACTTTGAGGTCACACA				
Catalase_a	ACCATGTCCGGATCCTTCA 40	54	29	301	NM001752
clAP1_s	GCCTGATGCTGGATAACTGG				
clAP1_a	GCTCTTGCCAATTCTGATGG	57	28	349	U45878
clAP2_s	GCCTGATGCTGGATAACTGG				
clAP2_a	GGCGACAGAAAAGTCAATGG	57	28	361	U45879
CuZnSOD_s	GTGCAGGGCATCATCAATTC				
CuZnSOD_a	CCACAAGCCAAACGACTTCC	54	25	401	BC001034
GAPDH_s	CCAGCCGAGCCACATCGC				
GAPDH_a	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	56	30	360	BC029618
GM-CSF_s	CTTGTCATCCCCTTTGACTGC				
GM-CSF_a	TCCCATTCTTCTGCCATGC	55	28	217	NM000758
IL-6_s	GAACCTCTTCTCCACAAGCGC				
IL-6_a	AGGCAAGTCTCCTCATTGAATCC	55	28	333	NM000600
IL-8_s	ACCGGAAGGAACCATCTCACT				
IL-8_a	AAACTTCTCCACAACCCTCTGC	55	28	307	BC013615

MnSOD_s	GGCGCCCTGGAACCTC				
MnSOD_a	ACACATCAATCCCCAGCAGT	53	24	446	BC016934
ms-GAPDH_s	CCATCAACGACCCCTTCATTG				
ms-GAPDH_a	GGCCATGCCAGTGAGCTTC	54	27	609	NM001001978
ms-GMCSF_135s	GCCATCAAAGAAGCCCTGA				
ms-GMCSF_135a	CAGTCCAAAAATGAGGAAGCC	53	28	331	NM009969
ms-IAP_1286s	TGCAGCTATGCCATGAGTACA				
ms-IAP_1692a	CCACCATCACAACAAAAGCA	53	26	411	NM007465
ms-IL6_138s	CAGAGGATACCACTCCCAACA				
ms-IL6_589a	CCTTAGCCACTCCTTCTGTGA	53	27	405	NM031168
ms-MnSOD_s	GTTGTGTCGGGCGGCG				
ms-MnSOD_a	GTAGTAAGCGTGCTCCCACACG	53	25	503	BC002066
ms-TRAF1_601s	TGAGAGATGATGAGGATCGGA				
ms-TRAF1_1012a	TCCTTCACCAAGT GCTGCA	54	26	412	NM009421
TNFR1_255s	CTGTACCAAGTGCCACAAAGGA				
TNFR1_522a	GCTGCAATTGAAGCACTGGA	57	28	267	NM001065
TNFR2-RT_s	GTA CTGCGCGCTGAGCAAG				
TNFR2-RT_a	CTTGGCTTCTCTCTGCAGGC	54	28	526	NM001066
TRAF1_s	GAGGTGGACTCTCACCAAATGAGA AGA				
TRAF1_a	CCCTTTGGGGTTATACATTGCTCAG TGG	54	28	747	BC024145
TRAF3_s	AAGCAGACAGC-ATGAAGAGCA				
TRAF3_a	GCTTGAATGCATCTCCCAAATG	55	30	504	BC075087
XIAP_s	GTGACTAGATGTCCACAAGG				
XIAP_a	CTTGAGGAGTGCTGGTAAG	57	28	368	U45880

Folgende Oligonukleotide wurden für Klonierungen bzw. für Sequenzierungsreaktionen benutzt:

Primername	Sequenz (5' → 3')	T _{anneal} (°C)	Zyklen	Amplikon (bp)	Acc.No. (GenBank)
TNFR2_s_Hind3	ATACAAGCTTATGGCGCCCGTCGC CGTCT				
TNFR2_a_Xho1	CTCACTCGAGTTAACTGGGCTTCAT CCCAGCATCAGGCA	60	30	1410	NM001066
TRAF2_s	ATGGCTGCAGCTAGCGTG				
TRAF2_a	TAGAGCCCTGTCAGGTCC	55	30	1503	BC064662
TRAF2_s_Hind3	GCAAGCTTATGGCTGCAG				
TRAF2_a_BamH1	GCGGATCCGGAGCCCTG	54	30	1518	BC064662
PPR_s	CTGGCTCTACCCTCAGCTCA				
PPR_a	CGAAGCCACCACAGCCAC	55	30	573	X65965S77127
PPR_s_Xho	GCCTCGAGCTGGCTCTACC				
PPR_a_Hind3	CGAAGCTTCGAAGCCACC	54	30	589	X65965
TNFRE_s	CGTTAGTGGTTTGACAAGGAA				
TNFRE_a	GCTCTGATTCCACAAGTAAAGGAC	52	30	465	S77127
TNFRE_s_BamH1	GCGGATCCCGTTAGTGGTTTG				
TNFRE_a_Sal1	CGGTCGACGCTCTGATTCC	52	30	605	S77127
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG				
BGH-reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	54	25		

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

.....

(Andreas Till)

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Till

Geburtstag: 19.12.1973

Geburtsort: Fulda, Deutschland

Eltern: Dr. med. Peter Till, Evelyne Till (geb. Baun)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Derzeitige Anschrift: Gerhardstr. 68, 24105 Kiel

Schulischer Werdegang

1980-1984 Grundschule Petersberg

1984-1993 Domgymnasium Fulda (Rhabanus-Maurus-Schule)

Abitur: Juni 1993

- Fächer: Chemie (LK), Physik (LK), Latein, Geschichte (mündlich)
- Sprachen: Latein (9 Jahre, *Latinum*), Englisch (7 Jahre), Altgriechisch (5 Jahre, *Graecum*), Französisch (AG, 1 Jahr), Russisch (AG, 1 Jahr)
- Endnote: 1,8

Wehrdienst

Okt 1993 – Sept 1995 Marine als Zeitsoldat (2 Jahre), Reserveoffiziersausbildung

Derzeitiger Dienstgrad: Kapitänleutnant d.R.

Studium

Okt 1995 – März 1998 Grundstudium Diplom-Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

05.05.1997 Vordiplomsprüfungen, Fächer: Chemie, Zoologie, Mathematik, Botanik

Endnote: - sehr gut-

April 1998 Wechsel an die Christian-Albrechts-Universität CAU Kiel

1.Okt 2001 Hauptdiplomsprüfung, Fächer: Zellbiologie, Zoologie, Biochemie

Zusatzfächer: Mikrobiologie, Biologische Meereskunde

Endnote: - sehr gut –

Diplomarbeit im Fach Zellbiologie

„Isolierung und Charakterisierung von Faktoren, die bei der Musterbildung von *Hydra* beteiligt sind“

(Betreuer: Prof. Dr. T.C. Bosch)

bewertet mit: - sehr gut -

Nov 2001 – gegenwärtig (voraussichtlich bis Nov 2004): Promotion in der AG Mucosaimmunologie/
Institut für Klinische Molekularbiologie (Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber)
Thema: „Funktionelle Analyse des Met196Arg Polymorphismus im humanen TNF-Rezeptor 2“

Publikationsliste

Thomsen S, **Till A**, Wittlieb J, Beetz C, Khalturin K, Bosch TCG (2004). *Control of foot differentiation in Hydra: in vitro evidence that the NK-2 homeobox factor CnNK-2 autoregulates its own expression and uses pedibin as target gene*. Mechanisms of Development 121: 195 – 204.

Waetzig GH, Rosenstiel P, Arlt A, **Till A**, Bräutigam K, Seegert D, Schreiber S (2004). *Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor- β 1*. FASEB Journal, in press (Oct2004).

Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, Schäfer H, Seegert D, Scheurich P, Schreiber S. *The Met196Arg polymorphism of human TNF receptor 2 affects TNF-induced apoptosis and target gene expression by impaired NF κ B signaling*. (in submission)

Posterbeiträge

Seegert D, **Till A**, Schreiber S. *Funktionelle Studien zum TNF- Rezeptor 2*.

Anlässlich der Besichtigung des SFB415 „Pathophysiologie von Signaltransduktionswegen“ durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG im Herbst 2002

Till A, Rosenstiel P, Seegert D, Schreiber S. *Funktionelle Analysen zum TNFR 2 (CD120b)*.

Anlässlich der Besichtigung des SFB415 durch die DFG im Mai 2004

Tagungen/ Konferenzen

Symposium des Nationalen Genom-Forschungsnetzwerks NGFN, Juli 2002, UK Kiel

Jahrestreffen des SFB415 – Pathophysiologie von Signaltransduktionswegen, Vorstellung der Teilprojekte, Herbst 2002, Zoologisches Museum Kiel

Jahrestreffen des SFB415, Ergebnispräsentation der Teilberichte, Sommer 2003, Forschungszentrum Borstel

Zweites Internationales SFB415-Symposium "*Trends in Molecular Immunology*", UK Kiel, März 2003

Teilnahme am Meeting der Signal Transduction Society (STS) „Signal Transduction – Receptors, Mediators and Genes“ im Hilton Hotel, Weimar, November 2003

Sonstige Aktivitäten

Teilnahme am interdisziplinären Graduiertenkolleg GRK415 "Natürliche Antioxidantien – Ihr Wirkungsspektrum in Pflanzen, Lebensmitteln, Tier und Mensch" (Sprecherin: Prof. Dr. K. Krupinska) als assoziierter Doktorand

MTA-Fortbildung der AG Mucosaimmunologie: Vortrag zum Thema „Proteine – Grundlagen zu Struktur, Funktion und Analysemethoden“, Frühjahr 2004

„Cell Talk“ der AG Mucosaimmunologie, Vorträge zu zellbiologischen Fragestellungen, geplant für WS 2004: „Apoptosis and Necrosis“, and „Signaltransduction Pathways“

Geplante Teilnahme am COST 926 Workshop and MC Meeting „Cellular response to bioactive plant compounds – Implications for human health “ , Sep / Okt 2004

Geplante Teilnahme am *44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology* ASCB, Dezember 2004 (*Abstract eingereicht*)

Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei dem Leiter unserer Arbeitsgruppe, Herrn Prof. Dr. med. Schreiber für die interessante und anspruchsvolle Themenstellung bedanken, sowie für die Möglichkeit, bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit eigene Ideen umsetzen zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Krupinska vom Botanischen Institut der CAU Kiel für die formelle Betreuung dieser Arbeit, für das Interesse an meinem Thema, konstruktive Kritik und hilfreiche Vorschläge bedanken.

Zu grossem Dank bin ich meinen fachlichen Betreuern, Herrn Dr. med. Philip Rosenstiel und Herrn Dr. rer. nat. Dirk Seegert verpflichtet. Ihr grosses Engagement für den Fortgang der Arbeit, unerschütterlicher Optimismus und wertvolle Anregungen und Hinweise haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mucosaimmunologie bzw. des Institutes für Klinische Molekularbiologie der CAU Kiel, insbesondere natürlich meinen Kollegen und Weggefährten aus den Projektgruppen Zellbiologie und *Expression-Screening*. Die freundschaftliche und ungezwungene Atmosphäre in unseren Laborräumen „unter der Station 8“ hat über viele Missschläge hinweggetröstet und zu einer positiven Arbeitseinstellung während der Anfertigung dieser Arbeit beigetragen.

Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Schäfer und seine Arbeitsgruppe für die Einweisung in die Benutzung des FACS-Gerätes, an Frau Dr. Christine Desel für die Unterstützung bei der Arbeit am CLSM und an Frau Dr. Marienfeldt (Forschungszentrum Borstel) für die Hilfe bei der Benutzung des *cell sorters*.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Krippner-Heidenreich vom Institut für Zellbiologie der Universität Stuttgart für methodische und fachliche Unterstützung, hilfreiche Telefonate und konstruktive Vorschläge zum Fortgang meiner Arbeit. Ich hoffe, dass wir uns einmal persönlich kennenlernen !

Für anregende Gespräche in entspannter Runde und willkommene Abwechslung in schwierigen Zeiten möchte ich mich bei meinen Freunden, allen voran Mario, Wolfgang und Lennard, sowie den Jungs und Mädels aus der Mainzer Zeit bedanken.

Mein tiefempfundener Dank gilt meiner Freundin Claudia, die mich in den etwas aufreibenden Wochen der Fertigstellung dieser Arbeit von häuslichen Verpflichtungen weitgehend entbunden hat und mir mit Rat, Tat und einer frischen Tasse Kaffee immer hilfreich zur Seite stand. Meine Schatz, ich danke Dir für Deine Geduld und Deine humorvolle und liebenswerte Art, mich von unangenehmen Dingen abzulenken.

Zu besonderem Dank bin ich meiner Familie in Fulda und Hattersheim verpflichtet. Eure langjährige Unterstützung während des Studiums, der konstante Optimismus auch in schwierigen Zeiten und die aufbauenden Telefonate und Motivationspakete mit Kuchen und „Buchteln“ haben erheblich zum erfolgreichen Abschluss meiner Studienzeit und zur Durchführung meines Promotionsvorhabens beigetragen.