

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

MECHANISMEN DES NUKLEÄREN TRANSPORTS VON TRAIL- REZEPTOREN IN PDAC-ZELLEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
PIERRE TEICHMANN
aus Aachen

Kiel 2021

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Anna Trauzold

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.12.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Anna Trauzold

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Pankreaskrebs	1
1.2 TRAIL.....	1
1.3 TRAIL-Rezeptoren	1
1.4 Apoptose.....	3
1.5 Non-apoptotische Signalwege.....	3
1.6 Therapieansätze mittels TRAIL	4
1.7 Resistenzmechanismen	5
1.8 Intrazelluläre Lokalisation von TRAIL-Rezeptoren als Resistenzmechanismus	6
1.9 Endozytose von TRAIL-Rezeptoren	7
1.10 Intrazellulärer Transport von TRAIL-Rezeptoren	8
1.11 Fragestellung der Arbeit	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Puffer und Lösungen	12
2.1.2 Kits.....	13
2.1.3 shRNAs.....	13
2.1.4 Antikörper für die Immunpräzipitation	13
2.1.5 Antikörper für die Western Blot Analyse	13
2.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie	14
2.1.7 Substanzen für die Behandlung von Zellen	14
2.1.8 Chemikalien	14
2.1.9 Geräte und weitere Materialien	15
2.2 Methoden	17
2.2.1 Zelllinien.....	17
2.2.2 shRNA-Transduktion.....	17
2.2.3 Zellkultur	17
2.2.4 Behandlung mit TRAIL	18
2.2.5 Behandlung mit anti-TRAIL Antikörper	18
2.2.6 Behandlung mit Leptomycin B (LMB)	18
2.2.7 Herstellung von Gesamtzelllysaten mittels RIPA-Puffer	18

2.2.8	Herstellung von Gesamtzelllysaten mittels IP-Lysepuffer	19
2.2.9	Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten	19
2.2.10	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	20
2.2.11	Immunpräzipitation	20
2.2.12	Biotinylierung oberflächlicher Proteine und deren Nachweis in den verschiedenen Zellfraktionen (sog. Biotinylierungsversuch)	21
2.2.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.2.14	Western Blot	24
2.2.15	Durchflusszytometrie	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Einfluss exogen zugeführten TRAILs auf die Verteilung der TRAIL-Rezeptoren	26
3.2	Einfluss des endogenen TRAILs auf die Verteilung der TRAIL-Rezeptoren	27
3.3	Markierung und Nachverfolgung der oberflächlichen TRAIL-Todesrezeptoren	28
3.4	Assoziation von CRM1 mit TRAIL-Rezeptoren	34
3.5	Auswirkungen einer Hemmung von CRM1 auf die Verteilung der intrazellulären TRAIL-Rezeptoren	37
3.6	Einfluss von TRAIL-Rezeptoren	39
4	Diskussion	47
5	Zusammenfassung	59
	Literatur	61
	Anhang	70
	Ermittlung potenzieller NES	70
	<i>TRAIL-R1</i>	70
	<i>TRAIL-R2 (lange Isoform)</i>	78
	<i>TRAIL-R3</i>	86
	<i>TRAIL-R4</i>	91
	Danksagung	98
	Veröffentlichungen	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunfluoreszenzfärbung von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und CRM1 mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bei Panc-1	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Erstellung von „Durchfluss“ und „Eluat“	23
Abbildung 3: TRAIL-Stimulation führt nach einer Stunde zur leichten nukleären Akkumulation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2	27
Abbildung 4: Einfluss der Neutralisierung des endogenen TRAIL auf die intrazelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren	28
Abbildung 5: Schema des Versuchs zur Untersuchung des Ursprungs nukleärer TRAIL-Rezeptoren (Biotinylierungsversuch)	29
Abbildung 6: Biotin-markierter Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 1 findet sich bei Panc-1-Zellen nach 4 Stunden in Zytoplasma und Zellkern	30
Abbildung 7: Biotin-markierter Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 1 findet sich bei Colo357- und PancTu-I-Zellen nach 4 Stunden in Zytoplasma und Zellkern	31
Abbildung 8: Nachweis von Biotin-markiertem Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 2 bei Panc-1-Zellen ergibt im Zytoplasma und Zellkern Western-Blot-Banden unklarer Relevanz	32
Abbildung 9: Nachweis von Biotin-markiertem Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 2 bei Colo357-Zellen ergibt im Zellkern und im Gesamtzelllysat Western-Blot-Banden unklarer Relevanz	33
Abbildung 10: Biotin-markierter Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 2 findet sich bei PancTu-I-Zellen nach 4 Stunden in Zytoplasma und Zellkern	34
Abbildung 11: Immunpräzipitation zur Untersuchung einer Assoziation von TRAIL-Rezeptoren mit CRM1	35
Abbildung 12: TRAIL-R2 interagiert mit dem Kernexportprotein CRM1	37
Abbildung 13: Leptomycin B-Behandlung von Panc89-Zellen mit Fraktionierung der Zellen und Nachweis von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Western Blot	38
Abbildung 14: Gegenseitige Beeinflussung der TRAIL-Rezeptoren auf ihre intrazelluläre Expression in PancTu-I-Zellen	40
Abbildung 15: PancTu-I-Durchflusszytometrie mit Färbung der oberflächlichen TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4 bei Knockdown einzelner Rezeptoren – Histogrammdarstellung	41
Abbildung 16: PancTu-I-Durchflusszytometrie mit Färbung der oberflächlichen TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4 bei Knockdown einzelner Rezeptoren – Säulendiagramm	42
Abbildung 17: Veränderungen der subzellulären TRAIL-R1/R2-Präsenz in PancTu-I-Zellen bei Knockdown der TRAIL-Rezeptoren (Zusammenfassung)	43
Abbildung 18: Gegenseitige Beeinflussung der TRAIL-Rezeptoren auf ihre intrazelluläre Expression in Colo357-Zellen	44

Abbildung 19: Colo357-Durchflusszytometrie mit Färbung der TRAIL-Rezeptoren 2 und 4 bei Knockdown der Rezeptoren 1, 2 und 4.....	45
Abbildung 20: Veränderungen der subzellulären TRAIL-R1/R2-Präsenz in Colo357-Zellen bei Knockdown der TRAIL-Rezeptoren (Zusammenfassung).....	46
Abbildung 21: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R1.....	70
Abbildung 22: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R2 (lange Isoform)	78
Abbildung 23: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R3.....	86
Abbildung 24: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R4.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung	12
Tabelle 2: Verwendete Kits.....	13
Tabelle 3: Verwendete shRNA-Sequenzen	13
Tabelle 4: Antikörper für die Immunpräzipitation.....	13
Tabelle 5: Antikörper für den Western Blot	13
Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie (APC-konjugiert).....	14
Tabelle 7: Verwendete Substanzen zur Behandlung der Zellen.....	14
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien	14
Tabelle 9: Verwendete Geräte und Materialien.....	15

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AkK	Antikörper-Kontrolle
ANN	<i>artificial neural network</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	Allophycocyanin
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspase	<i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>
CF	Zytoplasmatische Fraktion
c-FLIP	<i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1 protein homolog</i>
DcR1	<i>Decoy Receptor 1 (TRAIL-R3)</i>
DcR2	<i>Decoy Receptor 2 (TRAIL-R4)</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DR4	<i>death receptor 4 (TRAIL-R1)</i>
DR5	<i>death receptor 5 (TRAIL-R2)</i>
DTT	Dithiothreitol
Dyn-1	Dynamin-1
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGF(R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FLICE	<i>FADD-like IL-1β-converting enzyme</i>
FU	Fluoruracil

GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GZL	Gesamtzelllysat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGS-ETR1	<i>Human Genome Science Extracellular TRAIL-Receptor 1</i> ; Mapatumumab
HGS-ETR2	<i>Human Genome Science Extracellular TRAIL-Receptor 2</i> ; Lexatumumab
HMM	<i>hidden Markov model</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAP	<i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
ICD	<i>intracellular domain</i>
IFN- γ	Interferon γ
IP	Immunpräzipitation
let-7	<i>Lethal-7</i>
KD	<i>Knockdown</i>
Ktrl.	Kontrolle
LMB	Leptomycin B
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
miRNA	<i>micro-RNA</i>
MRIN	Membranrezeptoren im Nukleus
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NF	Nukleäre Fraktion
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NN	<i>neural network</i>
NP-40	Nonidet P-40 = IGEPAL CA-630
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
nTRAIL-R1	nukleärer TRAIL-Rezeptor 1
nTRAIL-R2	nukleärer TRAIL-Rezeptor 2
OPG	Osteoprotegerin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
R1	TRAIL-R1
R2	TRAIL-R2

R4	TRAIL-R4
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
tBid	trunkiertes Bid
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TRAIL-R2(S)	kleine Isoform von TRAIL-R2
TRAIL-R2(L)	große Isoform von TRAIL-R2
UTR	<i>untranslated region</i>
WB	Western Blot
XPO1	Exportin 1

1 Einleitung

1.1 Pankreaskrebs

In Deutschland ist Bauchspeicheldrüsenkrebs die vierthäufigste Krebstodesursache und die Tumorerkrankung mit der schlechtesten Prognose. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der häufigsten Form – dem pankreatischen duktaalen Adenokarzinom (PDAC) – liegt bei 6%. Zu den Risikofaktoren gehören Nikotinabusus, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2, aber auch genetische Einflüsse werden diskutiert. Nur eine komplette chirurgische Entfernung verspricht derzeit Heilungschancen, jedoch werden 80–85% der Pankreaskarzinome aufgrund langer Symptombefreiheit erst im irresektablen Stadium diagnostiziert (Vincent et al., 2011; Ying et al., 2016; GEKID, 2019).

1.2 TRAIL

Auf der Suche nach neuen Therapiekonzepten bei malignen Erkrankungen erlangte das Zytokin TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*; auch bekannt als Apo-2 Ligand) in den vergangenen Jahrzehnten Interesse bei Forschenden, da gezeigt werden konnte, dass TRAIL Krebszellen in den programmierten Zelltod führen kann, während es keine toxischen Einflüsse auf gesunde Körperzellen zu haben scheint (Ashkenazi et al., 1999). Als Mitglied der TNF-Superfamilie weist TRAIL (bestehend aus 281 Aminosäuren) eine hohe Homologie zu anderen Proteinen dieser Familie auf, wie z. B. Fas-Ligand (FasL) oder TNF- α (Wiley et al., 1995). Das Typ-II-Transmembranprotein bindet als Trimer an die zugehörigen Rezeptoren. Durch Proteasen kann es auch in eine lösliche Form überführt werden, wobei die transmembranöse Form als potenter gilt (Pitti et al., 1996; Hymowitz et al., 2000; De Miguel et al., 2016). Ebenso wie FasL ist TRAIL in der Lage, die Apoptose bei einem breiten Spektrum an Zelllinien auszulösen. Während FasL hauptsächlich von T-Zellen exprimiert wird, findet sich TRAIL jedoch in vielen verschiedenen Geweben (Wiley et al., 1995).

Physiologisch spielt TRAIL u. a. eine Rolle in der Immunüberwachung durch NK-Zellen oder aktivierte T-Zellen (Smyth et al., 2003). Der Einsatz von TRAIL oder agonistischer TRAIL-Rezeptor-Antikörper als Krebstherapeutika scheiterte bisher – unter anderem durch die Entwicklung von Resistenzmechanismen bei den behandelten Tumorzellen (Newsom-Davis et al., 2009).

1.3 TRAIL-Rezeptoren

Beim Menschen sind fünf verschiedene TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R) bekannt. Die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 werden auch als TRAIL-Todesrezeptoren (*death receptors* DR4 bzw. DR5) bezeichnet, da sie als Typ-I-Transmembranproteine über ihre intrazelluläre

Todesdomäne die Apoptose induzieren können (Pan et al., 1997a; Pan et al., 1997b). Sie werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (Spierings et al., 2004) und weisen eine Homologie von 58% auf (Walczak et al., 1997). TRAIL-R2 kommt in zwei funktionellen Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen entstehen (Screaton et al., 1997). Interessanterweise induzieren die TRAIL-Todesrezeptoren weitere sogenannte non-apoptotische Signalwege wie die Nekroptose (Voigt et al., 2014) oder sogar diverse malignitätsfördernde Signalwege (s. u.). Lemke et al. (2010) zeigten, dass der Zelltod bei den PDAC-Zelllinien Colo357, Panc89 und PT45 bevorzugt über TRAIL-R1 induziert wird. Jedoch scheint die Präferenz, ob die TRAIL-induzierte Apoptose über TRAIL-R1 oder -R2 vermittelt wird, abhängig von der jeweiligen PDAC-Zelllinie zu sein. Dabei gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Präferenz und der Menge des einzelnen Rezeptors an der Zelloberfläche (Mohr et al., 2015). Bei Ligandenbindung kommt es zur Bildung heteromerer Komplexe aus TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Kischkel et al., 2000; Lemke et al., 2010).

Mit TRAIL-Rezeptor 3 und 4 sind zwei Rezeptoren mit antagonistischem Einfluss bekannt. Obwohl TRAIL mit hoher Affinität bindet, kommt es nachfolgend nicht zur Induktion der Apoptose. Sie werden auch als sogenannte *Decoy-Rezeptoren* (DcR; zu Deutsch: Köder) bezeichnet unter der Vorstellung, dass sie mit den funktionellen Rezeptoren um TRAIL konkurrieren. Als weiterer Mechanismus wurde für TRAIL-R4 die Bildung inaktiver Heterokomplexe mit TRAIL-R1 und TRAIL-R2 beschrieben (Clancy et al., 2005; Mérino et al., 2006; Neumann et al., 2014). Eine hohe Expression der *Decoy-Rezeptoren* ist bei vielen Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert (O’Leary et al., 2015). TRAIL-R3 (DcR1) ist über einen GPI-Anker an der Plasmamembran befestigt und besitzt im Gegensatz zu den übrigen membrangebundenen TRAIL-Rezeptoren keine intrazelluläre Domäne (Degli-Esposti et al., 1997b). Bei untersuchten PDAC-Zelllinien konnte er zwar in den Zellen nachgewiesen werden, jedoch ohne Anwesenheit an der Zelloberfläche (Lemke et al., 2010). TRAIL-R4 (DcR2) besitzt eine gekürzte Todesdomäne, über die die Apoptose nicht initiiert werden kann. Wie TRAIL-R1 und -R2 (s. u.) kann TRAIL-R4 jedoch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen, was zusätzlich zu einer Apoptose-Resistenz beitragen könnte. Er wird von den meisten Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten exprimiert (Degli-Esposti et al., 1997a; O’Leary et al., 2015).

Emery et al. (1998) konnten mit Osteoprotegerin (OPG) einen fünften Rezeptor für TRAIL identifizieren, der im Gegensatz zu den anderen TRAIL-Rezeptoren nur in löslicher Form vorkommt. Die Hauptfunktion von OPG liegt im Knochenstoffwechsel, wo es die Knochendichte durch Hemmung von RANKL erhöht, aber auch immunologisch spielt es eine Rolle. Der lösliche Rezeptor besitzt eine geringere TRAIL-Affinität als die übrigen TRAIL-Rezeptoren. Seine Bedeutung im TRAIL-TRAIL-R-System ist weitgehend unklar (Walsh & Choi, 2014).

1.4 Apoptose

Die Apoptose, also der programmierte Zelltod, ist ein Prozess von herausragender Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase von Organismen. So verhindert sie ein unkontrolliertes Wachstum entarteter Zellen. Es wird zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg der Apoptose-Induktion unterschieden. Bei letzterem führen DNA-Schäden etwa durch UV-Belastung oder zytotoxischen Stress sowie Wachstumsfaktor-Entzug zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (MacFarlane, 2003). Zytoplasmatisches Cytochrom C bildet zusammen mit Apaf-1 und Procaspase 9 das Apoptosom – einen Multiproteinkomplex. Dadurch wird Procaspase 9 aktiviert und kann ihrerseits proteolytisch die Effektorcaspasen aktivieren, die den Zelltod einleiten. Mitglieder der sogenannten Bcl-2-Familie regulieren den intrinsischen Weg über Beeinflussung der mitochondrialen Integrität. Die anti-apoptotischen Vertreter Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 stehen den pro-apoptotischen Vertretern Bak, Bax und Bok gegenüber (Falschlehner et al., 2007).

Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch Liganden der Todesrezeptoren initiiert wie z. B. TRAIL. Bei Binden von TRAIL an trimerisierten TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 kommt es an den Todesdomänen (DD, *death domain*) zur Rekrutierung des Adapterproteins *Fas-associated protein with death domain* (FADD). Über seine Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*) bindet FADD wiederum Procaspase 8 und Procaspase 10. Der Tod-induzierende Signalkomplex (DISC, *death-inducing signaling complex*) formiert sich (De Miguel et al., 2016). Dies führt wiederum zur Aktivierung der Effektorcaspasen. Die Endstrecke beider Wege besteht in der Kernpyknose mit Kondensation und Degradierung der DNA, Zellschrumpfung sowie Fragmentierung zu *apoptotic bodies* (MacFarlane, 2003).

Extrinsischer und intrinsischer Pfad stehen miteinander in Verbindung. Die über die Todesrezeptoren aktivierte Caspase 8 spaltet das Protein Bid in die aktive Form tBid, welche in die Mitochondrien transloziert und dort die Freisetzung von Cytochrom C bewirkt (Luo et al., 1998). Es wird zwischen Typ-I- und Typ-II-Zellen unterschieden. Bei Typ-I-Zellen kann die Apoptose allein extrinsisch über die Aktivierung der Todesrezeptoren erfolgen, wohingegen Typ-II-Zellen einen zusätzlichen Anstoß über den mitochondrialen Weg benötigen (Scaffidi, 1998; Hinz et al., 2000).

1.5 Non-apoptotische Signalwege

Neben der Induktion der Apoptose kann TRAIL weitere Signalwege aktivieren, wie zum Beispiel – unter Inhibition der Caspasen – die Nekroptose, einen alternativen Weg des regulierten Zelltodes (Voigt et al., 2014). TRAIL-Stimulation kann das Tumorstadium aber auch unterstützen, abhängig von der Verteilung der Rezeptoren auf der Plasmamembran. Während TRAIL-Rezeptor-Lokalisierung in *lipid rafts* bei Bildung des DISC mit konsekutiver

Apoptose verbunden ist, sind TRAIL-Rezeptoren außerhalb der *lipid rafts* teilweise mit weiteren Signalwegen assoziiert, wie z. B. der Aktivierung von MAP-Kinasen, Proteinkinase C (PKC) oder des PI3K/Akt-Signalweges, was zu verminderter Apoptose oder gesteigerter Proliferation führen kann (Azijli et al., 2013; Song et al., 2007). So wurde *in vitro* gezeigt, dass TRAIL-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von PKC und von pro-inflammatorischem Transkriptionsfaktor NF- κ B die Entstehung einer Apoptose-Resistenz in PDAC-Zellen begünstigt (Trauzold et al., 2001). NF- κ B kann die Expression anti-apoptotischer Proteine wie IAP, c-FLIP, Bcl-xL und TRAIL-R3 steigern (Wajant, 2004). Neben der Apoptose-Hemmung trägt die Aktivierung von NF- κ B über Förderung von Proliferation, epithelial-mesenchymaler Transition (EMT), Metastasierung und Vaskularisierung zur Tumorentstehung bei (Hoesel & Schmid, 2013). Hierbei spielt auch von den Tumorzellen eigens produziertes, sogenanntes endogenes TRAIL eine Rolle, denn in verschiedenen TRAIL-resistenten Tumoren wie u. a. PDAC fördert ebendieses endogene TRAIL das Tumorwachstum (Brittingham, 2011; von Karstedt et al., 2015). Dies kann auch durch eine TRAIL-vermittelte Veränderung der Tumor-Mikroumgebung bedingt sein (Hartwig et al., 2017). Auch *in vivo* konnten unter Inhibition der Apoptose proinflammatorische und Invasions-begünstigende Effekte von TRAIL nachgewiesen werden (A. Trauzold et al., 2006). Durch die gezielte Inhibition der alternativen Signalwege kann experimentell eine Re-Sensitivierung für TRAIL-vermittelte Apoptose erzielt werden (Azijli et al., 2013).

1.6 Therapieansätze mittels TRAIL

Als Teil der sogenannten „*hallmarks of cancer*“ gehört die Verhinderung des Zelltods zu den elementaren Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegen eine erfolgreiche Krebstherapie (Hanahan & Weinberg, 2011). Bei vielen Tumoren ist dies mit der Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 zu erklären, der bei DNA-Schäden – verursacht z. B. durch Chemotherapeutika – normalerweise zur Aktivierung des intrinsischen Weges der Apoptose führt. Beim PDAC findet sich zu 60–70 % eine Mutation im p53-Gen. Todesrezeptoren können die Apoptose unabhängig von p53 über den extrinsischen Weg einleiten, wodurch man den Resistenzmechanismus zu umgehen erhofft (Almasan & Ashkenazi, 2003; Ryan et al., 2014). Übliche Chemotherapeutika wirken vor allem über eine Hemmung der Proliferation. Eine gezielte Induktion der Apoptose hingegen ermöglicht, Krebszellen zu töten anstatt nur ihr Wachstum zu stoppen (Lemke et al., 2014). Tatsächlich zeigte sich bei p53-mutierten Kolonkarzinomen eine synergistische Wirkung zwischen TRAIL und dem Chemotherapeutikum Irinotecan (Ravi et al., 2004).

TRAIL hat die besondere Fähigkeit, bei Tumorzellen die Apoptose auszulösen, während gesunde Zellen verschont bleiben (*in vitro* und *in vivo*) (Pitti et al., 1996; Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Dies will man sich therapeutisch mittels rekombinanten TRAIL oder

agonistischen TRAIL-Rezeptor-spezifischen Antikörpern zu Nutze machen (Lemke et al., 2014). Jedoch ist das erfolgreiche Auslösen der Apoptose durch TRAIL zelllinienabhängig. Während einige Tumorzelllinien primär TRAIL-sensitiv sind oder sekundär nach Chemotherapie sensitiviert werden, zeigte sich bei anderen Tumorentitäten eine Resistenz gegenüber TRAIL-Behandlung oder gar ein Profit durch diese (Wajant et al., 2005; Newsom-Davis et al., 2009). Randomisierte kontrollierte Studien mit Dulanermin, einem rekombinanten TRAIL-Präparat, sowie mit agonistischen TRAIL-Rezeptor-spezifischen Antikörpern zeigten bei guter Verträglichkeit keinen signifikanten Vorteil in der Krebsbehandlung verglichen zum normalen Therapieregime. Die bisher wenig erfolgreiche Krebstherapie über die TRAIL-Rezeptoren wird u. a. mit einer geringen intrinsischen Aktivität der getesteten Wirkstoffe erklärt, sodass stärkere Agonisten entwickelt werden. Neu entwickelte TRAIL-Rezeptor-Agonisten wie APG350 können zu höhergradigen Komplexen oligomerisieren, wodurch eine effektivere Rezeptor-Aktivierung sowie eine längere Halbwertszeit erhofft wird (Lemke et al., 2014; Legler et al., 2018). Es wurden TRAIL-Analoga entwickelt, die spezifisch TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 adressieren. Die TRAIL-R1-spezifische Form erreichte bei den PDAC-Zelllinien Colo357 und PancTu-I *in vitro* eine signifikant höhere Apoptose-Induktionsrate als die Wildtyp-Form. In einem Xenograft-Mausmodell mit Colo357-Zellen konnte die höhere Effektivität ebenfalls gezeigt werden (Yu et al., 2014). Die Hemmung der non-apoptotischen Signalwege stellt einen möglichen unterstützenden Bestandteil einer TRAIL-basierten Therapie dar (Lemke et al., 2014).

1.7 Resistenzmechanismen

Für TRAIL-resistente Tumoren werden Strategien erforscht, die Resistenzmechanismen zu unterdrücken und die Zellen so für eine Therapie zu re-sensitivieren (Lemke et al., 2014). Die Resistenzen können ihren Ursprung an verschiedenen Stellen des Signalweges haben. Zunächst einmal kommen eine verminderte TRAIL-Rezeptor-Synthese respektive inaktivierende Mutationen der Rezeptoren infrage (Indran et al., 2011). Jedoch konnte keine direkte Korrelation zwischen Expressionsrate der TRAIL-Todesrezeptoren und Sensitivität gegen TRAIL-Behandlung festgestellt werden (Zhang & Zhang, 2008). Ganz im Gegenteil werden die TRAIL-Todesrezeptoren von vielen Karzinomen oft hoch exprimiert, wobei eine TRAIL-Stimulation nur eingeschränkt zum Zelltod führt (Todaro et al., 2008). Die Hochregulation der Decoy-Rezeptoren, also der Apoptose-inhibierenden TRAIL-Rezeptoren 3 und 4, ist ein weiterer Mechanismus der Resistenzbildung (Mérino et al., 2006). Die Herunterregulation Apoptose-vermittelnder Proteine, die der TRAIL-Stimulation nachgeschaltet sind, wie z. B. FADD, sind ebenfalls vorstellbar (Trauzold et al., 2003).

Bei Typ-II-Zellen kann eine TRAIL-Resistenz durch Verlust von Bax oder Hochregulation von protektiven Enzymen wie Bcl-2 oder Bcl-xL entstehen (Hinz et al., 2000; Huang & Sinicrope,

2008; Lemke et al., 2014). IAP-Proteine (*inhibitor of apoptosis*) sind weitere bekannte Hemmer der Apoptose, die hauptsächlich über Interaktion mit Caspasen wirken. Ihr Vertreter XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) spielt beim Pankreaskrebs eine dominante Rolle für die TRAIL-Resistenz (Salvesen & Duckett, 2002; Trauzold et al., 2003; Yu et al., 2014). Ein *Knockdown* von XIAP führt in den PDAC-Zelllinien PancTu-I und PaTull zur Sensitivierung für TRAIL-vermittelte Apoptose, wobei sogar eine Bcl-2-Überexpression überwunden wird (Vogler et al., 2008).

c-FLIP-Proteine dienen als negative Regulatoren der TRAIL-Rezeptor-vermittelten Apoptose, indem sie am DISC die Aktivierung der Procaspasen blockieren. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Tumorzellen durch Hochregulation von c-FLIP einer TRAIL-vermittelten Apoptose entgehen (Kaminsky et al., 2013; De Miguel et al., 2016). Vice versa führte ein *Knockdown* von c-FLIP mittels siRNA bei TRAIL-resistenten HCC-Zellen zu einer Sensitivierung für TRAIL-vermittelte Apoptose (Ganten et al., 2004).

Die Fehlfunktion der Bildung von *lipid rafts* an der Plasmamembran führt ebenfalls zu verringertem Ansprechen auf TRAIL (s. o.). Das Flavonoid Quercetin und das Steroid Bufalin führt zu einer Re-Organisation von TRAIL-R1 und -R2 in die *lipid rafts*, wodurch die TRAIL-Sensitivität erhöht wird (Psahoulia et al. 2007; Yan et al., 2014). Des Weiteren werden epigenetische Vorgänge als Mechanismus für eine TRAIL-Resistenz diskutiert (Elias et al., 2009). Auch posttranslationale Modifikationen wie O-Glykosylierung der TRAIL-Rezeptoren können einen Einfluss auf die Sensitivität haben (Wagner et al., 2007).

1.8 Intrazelluläre Lokalisation von TRAIL-Rezeptoren als Resistenzmechanismus

Entgegen der Erwartung findet man bei vielen Tumoren eine erhöhte Expression von TRAIL-Rezeptoren, die sich dann vorzugsweise intrazellulär befinden. Dies ist in vielen Fällen mit einer negativen Prognose assoziiert (Bertsch et al., 2014). So weisen PDAC-Zellen im Vergleich zu nicht-neoplastischem Gewebe eine signifikant erhöhte Menge an zytoplasmatischem wie auch nukleärem TRAIL-R2 (nTRAIL-R2) auf (Haselmann et al., 2014). Histologisch können beim Großteil der Pankreaskarzinome TRAIL-R1 und -R2 intrazellulär nachgewiesen werden – oft sowohl zytosolisch als auch nukleär. An der Zelloberfläche von PDAC-Zellen werden TRAIL-R1 und -R2 seltener exprimiert als im umliegenden Gewebe. Der Verlust von TRAIL-R2 an der Plasmamembran verschlechtert die Prognose (Gallmeier et al., 2013). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass sich die TRAIL-Todesrezeptoren bei resistenten Tumorzellen unterschiedlicher Entität vermindert an der Plasmamembran und vermehrt im Zellinneren finden lassen. Sobald sowohl TRAIL-R1 als auch TRAIL-R2 an der Plasmamembran fehlen, besteht eine vollständige TRAIL-Resistenz (Zhang & Zhang, 2008).

Daraus lässt sich schließen, dass die Verlagerung der Rezeptoren nach intrazellulär einen weiteren Resistenzmechanismus darstellt, denn im Inneren der Zelle sind die Rezeptoren nicht disponibel für eine Triggerung durch den Liganden TRAIL (Gallmeier et al., 2013). TRAIL-Rezeptoren können zudem einem *Ectodomain-Shedding*, d. h. der enzymatischen Abspaltung der Ektodomäne, unterliegen, wodurch die Expression an der Zelloberfläche vermindert werden kann. Die Hemmung des *Shedding* stellt die Expression wieder her und erhöht die Toxizität von TRAIL (Kagawa et al., 2012). Erstaunlicherweise korreliert die Expressionsrate der TRAIL-Rezeptoren 1 oder 2 an der Zelloberfläche von PDAC-Zellen nicht mit der Bevorzugung eines Rezeptors für die Apoptose-Induktion, sodass auch andere Einflüsse wesentlich für die TRAIL-Sensitivität sein dürften (Mohr et al., 2015).

Ein besonderes Augenmerk gilt dem Vorkommen von TRAIL-Rezeptoren – vor allem von TRAIL-R2 – im Zellkern. So korreliert nukleärer TRAIL-R2 bei Tumorzellen mit einer TRAIL-Resistenz, und umgekehrt ist im Zellkern fehlender TRAIL-R2 mit erhöhter TRAIL-Sensitivität assoziiert (Kojima et al., 2011). Immunfluoreszenz-Bilder aus der Arbeitsgruppe von Prof. Trauzold zeigen, dass bei Panc-1, einer relativ TRAIL-resistenten PDAC-Zelllinie (Huang & Sinicrope, 2008), TRAIL-R1 vermehrt im Zytoplasma vorliegt, während TRAIL-R2 vor allem im Kern lokalisiert ist (Abb. 1). Undifferenzierte PDAC-Zellen weisen eine große Menge nukleären TRAIL-R2s auf, wohingegen die Menge bei differenzierten Zellen gering ist. Eine hohe Rate an nTRAIL-R2 ist beim Pankreaskarzinom in frühen Stadien mit einer schlechten Prognose verknüpft (Haselmann et al., 2014). Nukleärer TRAIL-R1 (nTRAIL-R1) beeinflusst die Prognose hingegen nicht (Gundlach et al., 2018). nTRAIL-R1 interagiert nur schwach mit nukleären Proteinen, während TRAIL-R2 im Zellkern mit mehreren Proteinen der RNA-Prozessierung assoziiert ist. Es wurde gezeigt, dass nTRAIL-R2 über Interaktion mit dem Mikroprozessor-Komplex die Reifung von sogenannter let7-mikroRNA hemmt. Dadurch steigt die Menge der Proteine Lin28B und HMGA2 an, was im Endeffekt zu einer Förderung der Proliferation sowie zu erhöhter Malignität von Tumoren führt, so auch beim PDAC (Haselmann et al., 2014). Über die Funktion des nTRAIL-R1 fehlen Kenntnisse.

1.9 Endozytose von TRAIL-Rezeptoren

Dass TRAIL-Rezeptoren via Endozytose in die Zelle aufgenommen werden können, wurde bereits beschrieben. Bei Abwesenheit des Liganden TRAIL kommt es in geringem Maße zur Endozytose der Rezeptoren 1 und 2. Durch Behandlung mit TRAIL kann die Internalisierung deutlich gesteigert werden (Kohlhaas et al., 2007). An einer TRAIL-sensitiven Mammakarzinom-Zelllinie wurde gezeigt, dass wiederholte Behandlung mit subtoxischen Dosen TRAIL zu einer TRAIL-Resistenz der Zellen führt. Dies ist mit einer signifikant reduzierten Exposition der TRAIL-Todesrezeptoren an der Zelloberfläche verbunden, wobei die Gesamtexpression der Rezeptoren innerhalb der Zellen unverändert bleibt (Yoshida et al.,

2009). Dies lässt vermuten, dass die vermehrte Endozytose nach TRAIL-Stimulation zur Resistenzbildung führt. So könnten Tumorzellen oder umgebende Stromazellen auto- bzw. parakrin TRAIL sezernieren und somit eine Resistenz induzieren (Bertsch et al., 2014).

Austin et al. (2006) berichten, dass die ligandenabhängige Endozytose von TRAIL-R2 Clathrin-vermittelt stattfindet. Tatsächlich besitzen sowohl TRAIL-R1 als auch -R2 an der zytoplasmatischen Domäne mit der Sequenz EAQC³³⁷LL bzw. ESEHLL ein klassisches Signal für die Clathrin-abhängige Endozytose (Zhang & Zhang, 2008; Akazawa et al., 2009; Kozik et al., 2010). Dynamine spielen bei der Abschnürung endozytotischer Vesikel von der Plasmamembran eine Rolle. Von den drei bekannten Isoformen scheint insbesondere Dynamin-1 (Dyn-1) an der Endozytose der TRAIL-Rezeptoren beteiligt zu sein. Reis et al. haben einen Mechanismus beschrieben, wie TRAIL bei Binden an die Zelle die Endozytose der TRAIL-Todesrezeptoren induziert. Über Caspase-8 kommt es zur Aktivierung des ER-gebundenen Ryanodin-Rezeptors und zum Calcium-Einstrom ins Zytoplasma. In der Folge wird Calcineurin-abhängig die GTPase Dyn-1 und damit die Clathrin-vermittelte Endozytose aktiviert (Ferguson & De Camilli, 2012; Reis et al., 2017). Bei der Endozytose der TRAIL-Rezeptoren scheinen aber auch Clathrin-unabhängige Mechanismen eine Rolle zu spielen (Kohlhaas et al., 2007).

Zwei Arbeitsgruppen beobachteten bei TRAIL-resistenten Zellen, dass das Einbringen eines Plasmids für TRAIL-R1 nicht zur Expression an der Zelloberfläche führt, was mit einer gestörten Sortierungsmaschinerie erklärt wird. Die Hemmung der Glykosylierung in dem einen Fall und die direkte Hemmung der Endozytose im anderen Fall stellten die Expression der TRAIL-Rezeptoren an der Plasmamembran wieder her und hatten eine Sensitivierung für TRAIL-vermittelte Apoptose zu Folge. Die Herunterregulation des Endozytose-Proteins Clathrin oder seines Adapterproteins AP2 hatten den gleichen Effekt (Jin et al., 2004; Zhang & Zhang, 2008).

1.10 Intrazellulärer Transport von TRAIL-Rezeptoren

Abgesehen von den genannten Erkenntnissen zur Endozytose ist das Wissen über die Transportmechanismen der TRAIL-Rezeptoren rar. Einige Aspekte der Verteilung der TRAIL-Rezeptoren und deren Regulation sind jedoch bekannt. Der Signalerkennungspartikel (SRP, *signal recognition particle*) scheint am Transport von TRAIL-R1 zur Plasmamembran beteiligt zu sein. SRP ist ein Ribonukleoprotein, das co-translational an der Einschleusung von Membranproteinen ins ER beteiligt ist. Herunterregulation von SRP führt zu einer deutlich verringerten TRAIL-R1-Exposition an der Plasmamembran, was eine Apoptose-Resistenz bei Stimulation mit TRAIL oder agonistischen TRAIL-R1-Antikörpern zur Folge hat. Das Level an TRAIL-R1-mRNA bleibt dabei unberührt. Die Expression von TRAIL-R2 an der Plasmamembran wird nicht signifikant beeinflusst (Ren et al., 2004).

Kojima et al. (2011) konnten zeigen, dass das Karyopherin Importin β 1 für den Kerntransport von TRAIL-R2 verantwortlich zu sein scheint. Durch Herunterregulation von Importin β 1 wird die Menge an TRAIL-R2 im Kern vermindert, während die Expression an der Plasmamembran steigt. Dies führt zu einem gesteigerten TRAIL-Ansprechen. Die Lokalisation von TRAIL-R1 hingegen wird durch *Knockdown* von Importin β 1 nicht beeinflusst. Des Weiteren werden zwei für den Kernimport obligate Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signals*) in der Proteinsequenz von TRAIL-R2 beschrieben (Kojima et al., 2011).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Anna Trauzold gab es Hinweise auf eine Assoziation von TRAIL-R2 mit dem Kernexportprotein CRM1 (*chromosome region maintenance 1 protein homolog*; s. Abb. 1). Das Karyopherin CRM1 – auch bekannt als Exportin-1 (XPO1) – bindet sein Substrat über nukleäre Exportsignale (NES). Unter Bildung eines ternären Komplexes aus CRM1, RanGTP und der Fracht erfolgt der Kernexport durch eine Kernpore (NPC, *nuclear pore complex*). Im Zytoplasma dissoziiert der Komplex unter Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP. Daraufhin rezirkulieren CRM1 und RanGDP in den Kern, wo RanGDP zu RanGTP reaktiviert wird. Ein RanGTP/GDP-Konzentrationsgefälle zwischen Kern und Zytoplasma dient als Antrieb des Prozesses (Stade et al., 1997; Lu et al., 2015). Bei TRAIL-R3 und -R4 gibt es ebenfalls Hinweise auf Sequenzen, die kompatibel mit CRM1 sein könnten (Zhang et al., 2000).

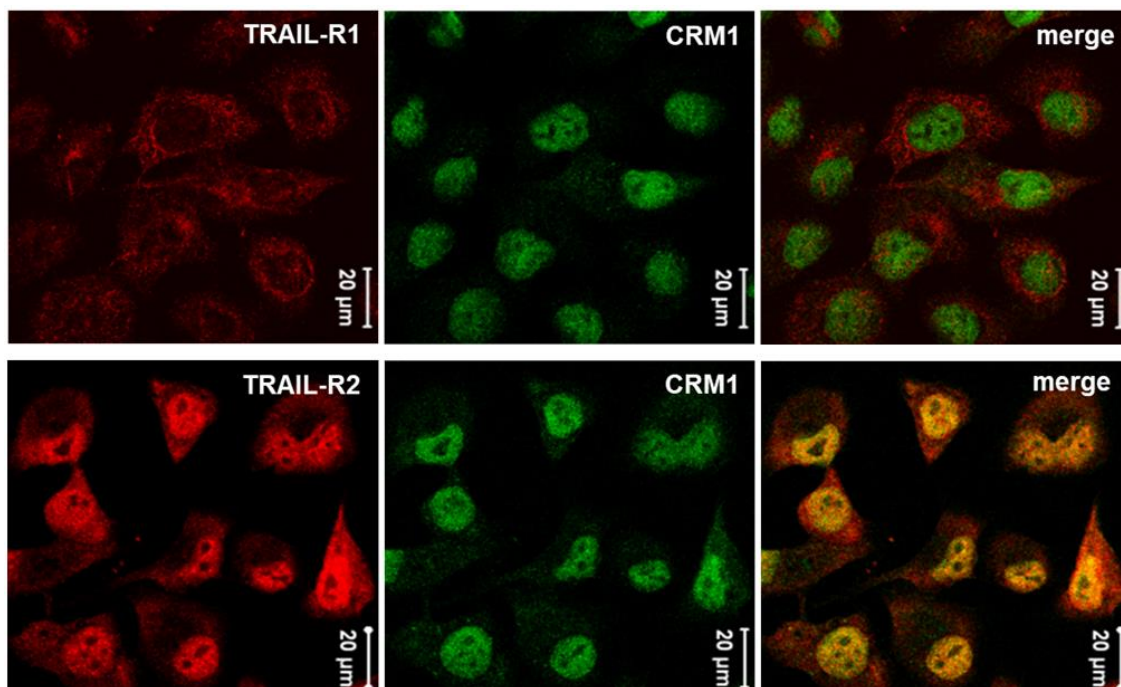


Abbildung 1: Immunfluoreszenzfärbung von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und CRM1 mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bei Panc-1

Immunfluoreszenzbilder von Panc-1-Zellen aus der AG Trauzold zeigen eine Co-Lokalisation von TRAIL-R2 und CRM1. Zudem wird deutlich, dass TRAIL-R1 vermehrt im Zytoplasma exprimiert wird, während TRAIL-R2 bevorzugt im Zellkern vorkommt. CRM1 ist größtenteils nukleär lokalisiert.

Wenn die subzelluläre Verteilung von TRAIL-Rezeptoren untersucht werden soll, lohnt sich der Blick auf andere intrazellulär auftretende Membranrezeptoren. Von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) ist bekannt, dass sie internalisiert werden, um nachfolgend in Lysosomen abgebaut zu werden oder zur Plasmamembran zu rezirkulieren. Inzwischen weiß man, dass nach der Endozytose auch weitere intrazelluläre Ziele wie Golgi-Apparat, Mitochondrien oder Zellkern angesteuert werden. Beim EGF-Rezeptor führt die Ligandenbindung zur Endozytose mit konsekutivem Transport in den Zellkern. Dort wirkt EGFR als Transkriptionsfaktor. Die Autoren Wang & Hung schlugen für dieserart translozierte Rezeptoren die Bezeichnung MRIN (Membranrezeptoren im Nukleus) vor (Carpenter & Liao, 2009; Wang & Hung, 2009, 2012). Ob TRAIL-Rezeptoren auf analoge Weise in den Kern gelangen, ist bislang ungeklärt.

1.11 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit werden Mechanismen betrachtet, die die subzelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren beeinflussen könnten. Zunächst sollen PDAC-Zellen dahingehend untersucht werden, ob eine Stimulation mit TRAIL die Verteilung verändert. Dies könnte Hinweise auf eine ligandenabhängige Internalisierung der TRAIL-Rezeptoren geben, wie sie bei anderen Zelllinien bereits beschrieben wurde (Kohlhaas et al., 2007). Neben der Menge an TRAIL-Rezeptoren im Zytoplasma interessiert hierbei vor allem die Menge im Zellkern, um – in Analogie zum EGF-Rezeptor und anderen RTK – Rückschlüsse auf eine etwaige ligandenabhängige Translokation der Rezeptoren von der Plasmamembran zum Zellkern zu ziehen. Damit der mögliche Einfluss von auto- oder parakrin sezerniertem TRAIL beurteilt werden kann, soll dieses experimentell neutralisiert werden und anschließend die Verteilung der Rezeptoren betrachtet werden.

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die Herkunft der nukleären TRAIL-Rezeptoren. Sie könnten einerseits aus einem unabhängigen Pool an TRAIL-Rezeptoren stammen und direkt nach ihrer Synthese in den Kern gelangen, ohne dass eine Verbindung zu den Plasmamembran-gebundenen Rezeptoren besteht. Andererseits könnten die TRAIL-Rezeptoren wie bei den RTK von der Zelloberfläche aus zum Zellkern gelangen. Zur Klärung des Ursprungs sollen die oberflächlichen TRAIL-Rezeptoren durch das Vitamin Biotin markiert werden. Biotin per se gelangt nicht nach intrazellulär und bindet an freie Aminogruppen der oberflächlichen Proteine (Von Boxberg et al., 1990). Wenn sich nach einiger Zeit markierte TRAIL-Rezeptoren im Zellkern wiederfinden, weist das auf eine Herkunft von der Zelloberfläche hin. So soll eine mögliche Wanderung der TRAIL-Rezeptoren nachvollzogen werden.

Auch der Kerntransport der TRAIL-Rezeptoren soll betrachtet werden. Während Importin $\beta 1$ als Karyopherin für den Kernimport identifiziert wurde (Kojima et al., 2011), fehlen Kenntnisse über verantwortliche Kernexportproteine. Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Anna

Trauzold geben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Proteins CRM1, was in dieser Arbeit weiter untersucht werden soll. Ein größeres Verständnis über den Kernexport könnte dazu dienen, die nukleäre Menge der TRAIL-Rezeptoren – insbesondere des mit einer schlechten Prognose assoziierten nTRAIL-R2 – therapeutisch zu reduzieren. Über Immunpräzipitationsversuche soll CRM1 als Interaktionspartner der TRAIL-Rezeptoren bestätigt werden. Außerdem soll CRM1 durch Leptomycin B (LMB) gehemmt werden und der Einfluss auf die nukleäre Menge der TRAIL-Rezeptoren betrachtet werden. LMB ist ein Antibiotikum und Antimykotikum sowie Hemmer des eukaryotischen Zellzyklus. Zudem wurde es als spezifischer CRM1-Inhibitor identifiziert, indem es kovalent an die Aminosäure Cys528 bindet (Kudo et al., 1999).

Die verschiedenen TRAIL-Rezeptoren können miteinander interagieren – sowohl an der Plasmamembran als auch intrazellulär (Neumann et al., 2014). Deshalb liegt ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Korrelation zwischen den verschiedenen TRAIL-Rezeptoren und auf der gegenseitigen Beeinflussung ihrer Lokalisation. Dazu wird je ein TRAIL-Rezeptor runterreguliert und anschließend die Expression der Rezeptoren an der Zelloberfläche sowie im Zytoplasma und im Zellkern untersucht. Die stabile Herunterregulation der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren erfolgt über eine lentivirale Transfektion mit shRNA (*short hairpin RNA*). Diese shRNA bindet nach einer Prozessierung an die mRNA des Zielgens und führt zur Degradation des mRNA-Stranges. Im Gegensatz zu transient wirkender siRNA wird shRNA von der transfizierten Zelle stetig neu produziert, nachdem sie retroviral ins Genom integriert worden ist (Moore et al., 2010). Mit den Ergebnissen sollen Kenntnisse über Abhängigkeiten und mögliche gemeinsame Transportmechanismen der TRAIL-Rezeptoren erlangt werden.

Das Pankreaskarzinom ist ein Malignom mit sehr schlechter Prognose. Obgleich TRAIL oder TRAIL-Agonisten potenzielle Therapeutika darstellen, sind viele Tumoren resistent. Die intrazelluläre Lokalisation der TRAIL-Rezeptoren stellt einen möglichen Resistenzmechanismus vor TRAIL-vermittelter Apoptose dar. Zudem können nukleäre TRAIL-Rezeptoren über non-apoptotische Funktionen tumorfördernd wirken (Haselmann et al., 2014). Über eine pharmakologische Beeinflussung der Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren könnte eine TRAIL-Resistenz rückgängig gemacht werden bzw. eine Resistenzentwicklung verhindert werden (Jin et al., 2004). Kenntnisse über Regulationsmechanismen der subzellulären TRAIL-Rezeptor-Verteilung könnten deshalb von essenzieller Bedeutung sein, um Zellen für eine TRAIL-Behandlung zu sensitivieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Puffer und Lösungen

Vor dem Erstellen von Lysaten wurden die jeweiligen Puffer mit einem Protease-Inhibitor versetzt, um einen Protein-Verdau zu verhindern.

Tabelle 1: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung	Mengenangabe
Elutionspuffer	TRIS HCl pH 6,8	62,5 mM
	SDS	1 % w/v
	Glycerol	10 % v/v
	DTT	50 mM
EMSA-I-Puffer	DTT	1 mM
	EDTA	0,2 mM
	HEPES pH 7	10 mM
	KCl	10 mM
IP-Lysepuffer	Glycerol	1 % v/v
	NaCl	120 mM
	TRIS Base pH 7,4	30 mM
	Triton X-100	1 % v/v
Kern-Lyse-Puffer	Glycerol	1 % v/v
	NaCl	120 mM
	TRIS Base pH 7,4	30 mM
	NP-40	0,5 % v/v
Laufpuffer	Glycin	192 mM
	SDS	1 % v/v
	TRIS Base pH 7,4	25 mM
Lämmli-Probenpuffer 4fach	Bromphenolblau	0,02 % w/v
	DTT	200 mM
	Glycerol	40 % v/v
	TRIS HCl pH 6,8	250 mM
	SDS	8 % w/v
MACS/ Azid	PBS	50 ml
	BSA	0,5 % w/v
	Natriumazid	0,05 % w/v
MACS/ Formalin	PBS	50 ml
	BSA	0,5 % w/v
	Formaldehyd	1 % v/v
Magermilch/ TBS-T (5 %)	TBS-T 1fach	300 ml
	Magermilchpulver	15 g
Polysomenpuffer NP-40 0,5 %	HEPES pH 7	10 mM
	KCl	150 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NP-40	0,5 % v/v

RIPA-Puffer	TRIS Base pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	1 % v/v
	Na-Desoxycholat	1 % w/v
	SDS	0,2 % w/v
TBS-T 1fach	NaCl	140 mM
	TRIS Base pH 7,4	20 mM
	Tween 20	0,1 % v/v
Transferpuffer 1fach	Methanol	20 % v/v
	Glycin	190 mM
	TRIS Base	100 mM

2.1.2 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

2.1.3 shRNAs

Tabelle 3: Verwendete shRNA-Sequenzen

Zielstruktur	Sequenz-ID	Sequenz
TRAIL-R1	383714	Antisense: TGATCATGAAGTTTGATGG
TRAIL-R2	16711	Antisense: GCATTAAAGCAGCGTATC
TRAIL-R4	16774	Antisense: TCTGATATAAATTTCTCCC
TRAIL-R4	239709	Antisense: TAACAAGTAAGACAAGCTG
TRAIL-R4	344449	Antisense: AAGAAATGAATTTCTTCCG

2.1.4 Antikörper für die Immunpräzipitation

Tabelle 4: Antikörper für die Immunpräzipitation

Primärantikörper	Wirt	Hersteller
Anti-CRM1	Maus	BD Biosciences, Heidelberg
HGS-ETR1 (Mapatumumab)	Mensch	Human Genome Sciences Inc., UK
HGS-ETR2 (Lexatumumab)	Mensch	Human Genome Sciences Inc., UK
HS101	Maus	Alexis Biochemicals, Schweiz
HS201	Maus	Alexis Biochemicals, Schweiz
HS402	Maus	Alexis Biochemicals, Schweiz

2.1.5 Antikörper für die Western Blot Analyse

Tabelle 5: Antikörper für den Western Blot

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalog Nr.
Anti- α -Tubulin	Kaninchen	1:50.000	Epitomics, Hamburg	1878-1
Anti- β -Actin	Maus	1:20.000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	A5441
Anti-CRM1	Maus	1:500	BD Biosciences, Heidelberg	611832
Anti-CRM1	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	E7784
Anti-Lamin A/C	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technology, UK	2032
Anti-TRAIL-R1	Kaninchen	1:5000	Millipore GmbH, Schwalbach	16955
Anti-TRAIL-R2	Kaninchen	1:3000	ProSci Inc., USA	2019
Anti-TRAIL-R2	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	AB16942
Anti-TRAIL-R4	Maus	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA	sc-65310

2.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie (APC-konjugiert)

Zielstruktur	Wirt	Hersteller	Katalog Nr.
TRAIL-R1	Maus	R&D Systems Inc., USA	FAB347A
TRAIL-R2	Maus	R&D Systems Inc., USA	FAB6311A
TRAIL-R4	Maus	R&D Systems Inc., USA	FAB633A
IgG1	Maus	R&D Systems Inc., USA	IC002A
IgG2B	Maus	R&D Systems Inc., USA	IC0041A

2.1.7 Substanzen für die Behandlung von Zellen

Tabelle 7: Verwendete Substanzen zur Behandlung der Zellen

Substanz	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Katalog Nr.
Anti-TRAIL	Kaninchen	1 μ g/ml	Abcam, Berlin	ab9959
Leptomycin B	Streptomyces sp.	20 nmol/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	87081-35-4
Rekombinantes humanes TRAIL	E. coli	10 ng/ml	PeproTech EC., UK	310-04

2.1.8 Chemikalien

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Accutase	Innovative Cell Technologies Inc., USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BSA (bovines Serumalbumin)	Biomol GmbH, Hamburg
complete Mini Protease-Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Curix 60 Developer G153 A und B	Agfa-Gevaert N.V., Belgien
Curix 60 Rapid Fixer G354	Agfa-Gevaert N.V., Belgien
ddH ₂ O	Millipore Reinstwasseranlage
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DPBS	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fetales Kälberserum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
GlutaMAX Supplement 100fach	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
IGEPAL CA-630 (Nonidet P-40 = NP40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol 70%	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Avantor Performance Materials B.V., NL
Natrium-Dodecylsulfat (SDS) Rotistock 20 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natrium-Dodecylsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat 100fach	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein G Sepharose Beads 4 Fast Flow	GE Healthcare Europe GmbH, München
Puromycin Dihydrochlorid (P8833)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RPMI 1640 Kulturmedium	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Salzsäure 25 %	Avantor Performance Materials B.V., NL
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
TRIS Base	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin /EDTA Lösung 10 fach	Biochrom GmbH, Berlin
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.9 Geräte und weitere Materialien

Tabelle 9: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte & weitere Materialien	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklav	CS	Webeco, Selmsdorf
Autoradiographie-Kassette	Hypercassette RPN11642	GE Healthcare, Freiburg
Blottingkammer	Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Cellulose-Chromatographiepapier	Sorte 3 Chr	Whatman, Dassel
Combitips advanced	5 ml	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
ECL-Chemilumineszenz-Film	CL-X Posure Film	Thermo Fisher Scientific, USA
Filmentwickler	Curix 60	Agfa-Gevaert, Belgien
Flockeneisbereiter	AF 200	Scotsman, Italien
Handdispenser	Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Injektionskanülen	0,4 mm x 40 mm (27G 1 1/2")	Becton-Dickinson, Heidelberg
Kapillarspitzen	Multiflex Round Tips (200 µl)	Sorenson BioScience, USA
Kühlzentrifuge	5415 R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Microloader	0,5 – 20 µL, 100 mm	Eppendorf, Hamburg

Mikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrotiterplatten (Durchflusszytometrie)	96-Well, konischer Boden	Thermo Fisher Scientific, USA
Mikrotiterplatten (Proteinbestimmung)	96-Well, Flachboden, transparent	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten-Photometer	Sunrise	Tecan Group, Schweiz
Pasteurpipetten	ISO 7712 (230 mm)	Thermo Fisher Scientific, USA
Petrischalen	TC Schale 150, Standard	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Messgerät	inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
PVDF-Membran	Immobilon-P	Merck, Darmstadt
Reagenzglasschüttler	REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Reaktionsgefäße/ Reagiergefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Rollenmischer	RM5	Assistent, Sondheim v. d. Rhön
Rundboden-Röhrchen	5 ml	Thermo Fisher Scientific, USA
SDS-PAGE Gelkammer	XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific, USA
Serologische Pipetten	5 ml; 10 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sonifiziergerät	PG.1029	MSE, UK
Spannungsgeber	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Spritze (1 ml)	BD Plastipak Spritze	Becton-Dickinson, Heidelberg
Spritze (50 ml)	BD Perfusion Spritze	Becton-Dickinson, Heidelberg
Thermoblock	Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Mini Spin Plus	Eppendorf, Hamburg
Tris-Glycin Gel 4–20 %	1,0 mm, 10-/12-/15-Well	Thermo Fisher Scientific, USA
Ultrazentrifuge Optima XL-80	Rotor SW28Ti; Rotor SW60Ti	Beckmann Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge TL100	Rotor TLA-100	Beckmann Coulter, Krefeld
Verschlussfolie	Parafilm M	Bemis Company, USA
Zählkammern zur Zellzählung	SD100 Cellometer	Nexcelom Bioscience, USA
Zellkulturflaschen	T25, T75, T175	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	6-/12-/96-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturzentrifuge	Rotina 48 R	Hettich, Tuttlingen
Zellschaber	16 cm; 25 cm; 39 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellzahlmessgerät	Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience, USA
Zentrifugenröhrchen (Falcons)	15 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Es wurden vier verschiedene humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinien verwendet. Panc-1- und PancTu-I-Zellen stammen aus Primärtumoren, während Colo357- und Panc89-Zellen aus Lymphknotenmetastasen etabliert wurden. Alle Zelllinien weisen adhärentes Wachstum auf (Sipos et al., 2003).

2.2.2 shRNA-Transduktion

Um eine stabile Runterregulation der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren zu erreichen, wurden mit shRNA transfizierte Zellen im Labor von Prof. Anna Trauzold etabliert. Als Vektor dienten modifizierte Lentiviren (Dharmacon GIPZ Lentiviral shRNA), sodass die Arbeiten unter der biologischen Sicherheitsstufe 2 erfolgten. Gemäß den Herstellerangaben wurden die lentiviralen Partikel in HEK293T-Zellen vervielfältigt und danach aus dem Überstand der Zellen gewonnen. Anschließend wurden die Zielzellen Colo357 und PancTu-I mit den Partikeln transfiziert. Durch die Behandlung mit dem Antibiotikum Puromycin, gegen das erfolgreich transfizierte Zellen eine Resistenz aufweisen, konnten die shRNA-tragenden Zellen selektiert werden.

Es wurden Zelllinien erstellt, die entweder TRAIL-R1, -R2 oder -R4 herunterregulieren. In eine Kontrollzelllinie wurde ein „leerer“ Vektor, der kein Gen ausschaltet, eingebracht (als *non-silencing* bezeichnet). Für die Herunterregulation von TRAIL-R4 wurden teils verschiedene Vektoren verwendet (shRNA 16774 und shRNA 344449 bei Colo357-Zellen bzw. shRNA 16774 und shRNA 239709 bei PancTu-I-Zellen).

2.2.3 Zellkultur

Für die Zellkultur wurde RPMI-1640 Medium verwendet, das zu 10 % mit FCS sowie mit 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM GlutaMAX versetzt wurde. Die Zellen wurden in T25-, T75- und T175-Flaschen im Brutschrank bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % kultiviert. Ein Passagieren der Zellen fand zweimal wöchentlich bei einer Konfluenz von 80–95 % statt. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal kurz mit PBS gewaschen und anschließend mittels der Serinprotease Trypsin abgelöst. Das Verdauungsenzym spaltet die Adhäsionsmoleküle der Zellen, sodass sie bei einer Inkubationszeit von 8–10 min bei 37 °C in Suspension gehen. Es wurden 1,5 ml Trypsin (1-fach) für T25-, 4 ml für T75- und 8 ml für T-175-Flaschen verwendet. Wenn eine schonendere Ablösung der Zellen erwünscht war (z. B. im Rahmen der Untersuchung von Oberflächenproteinen via Durchflusszytometrie), wurde statt Trypsin die Enzym-Lösung Accutase in gleichen Volumina verwendet.

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von äquivalenten Mengen Medium gestoppt und die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Nach Zentrifugation mit 400 g für 4 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in frisches Kulturmedium resuspendiert und im gewünschten Teilungsverhältnis in neue Zellkultur-Flaschen überführt.

2.2.4 Behandlung mit TRAIL

Die Zellen wurden für unterschiedliche Dauer mit TRAIL stimuliert (1 h, 3 h, 6 h, 18 h), um den Einfluss von TRAIL in einer Zeitkinetik beobachten zu können. Für jeden dieser Zeitpunkte wurden die Zellen in 6-*Well*-Platten ausgesät, wobei 5×10^5 Zellen pro *Well* (bei den Ansätzen 1 h, 3 h, 6 h; inkl. Platte für Kontroll-Ansatz ohne Stimulation) bzw. 3×10^5 Zellen pro *Well* (bei dem über Nacht stimulierten Ansatz von 18 h Dauer; inkl. Platte für Kontroll-Ansatz ohne Stimulation) ausgesät wurden. Alle Ansätze wuchsen zunächst ohne Stimulation für 24 h. Dann erfolgte die Stimulation mit TRAIL in einer Konzentration von 10 ng/ml für den jeweiligen Zeitraum. Anschließend wurden die Zellen lysiert (s. u.).

2.2.5 Behandlung mit anti-TRAIL Antikörper

Es wurden Zellen auf je einer 6-*Well*-Platte für die anti-TRAIL-Behandlung und den Kontroll-Ansatz ausgesät, wobei 3×10^5 Zellen pro *Well* verwendet wurden. Zur Behandlung wurde dem Medium direkt bei der Zellaussaat neutralisierender anti-TRAIL Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml zugefügt. Nach einem Wachstum von 48 h wurden die Zellen lysiert (s. u.). Die Funktion von anti-TRAIL wurde in Vorarbeiten unter verschiedenen Konzentrationen von TRAIL getestet.

2.2.6 Behandlung mit Leptomycin B (LMB)

Es wurden Zellen auf je einer 6-*Well*-Platte für die LMB-Behandlung und für die Kontrolle ausgesät, wobei erstere 24 h nach dem Aussäen mit 20 nmol/l Leptomycin B behandelt wurden. Nach 8 h wurden fünf der sechs *Wells* zur Erstellung von Kern-/Zytoplasma-Lysaten verwandt, das übrige *Well* zur Erstellung von Gesamtzelllysate.

2.2.7 Herstellung von Gesamtzelllysaten mittels RIPA-Puffer

Alle Schritte der Erstellung der Gesamtzelllysate erfolgten – wenn nicht anders bezeichnet – auf Eis. Der RIPA-Puffer wurde mit Protease- sowie einem Phosphatase-Inhibitoren versetzt. Die in 6-*Well*-Platten kultivierten Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und danach je nach Zelldichte mit 100 µl (bei 50 % Konfluenz) bis zu 200 µl (bei 90–100 % Konfluenz) RIPA-Puffer benetzt. Anschließend wurden die lysierten Zellen mittels Zellschaber abgekratzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden für 10 min stehen gelassen, dann

bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Durch Sonifikation für 10 sec wurde die Zelllyse weiter unterstützt. Die Proben wurden für 15 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen transferiert. Wenn die Lysate nicht unmittelbare Verwendung fanden, wurden sie bei -20 °C verwahrt.

2.2.8 Herstellung von Gesamtzelllysaten mittels IP-Lysepuffer

Je nach Versuch wurden 3–7 große Petrischalen ausgesät, wobei die Zellen bei Gewinnung der Lysate nach 36 h zu 70–90 % konfluent waren. Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS wurden 4 ml IP-Lysepuffer hinzugegeben, die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in Reagiergefäße überführt. Die Lysate wurden für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zunächst bei 2.300 g für 5 min und dann bei 16.000 g für 30 min zentrifugiert (beides bei 4 °C). Die Überstände wurden in neue Gefäße überführt und die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem *DC Protein Assay Kit* (Bio-Rad). Die Lysate wurden bei -20 °C eingefroren.

2.2.9 Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten

Zur Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten wurden die Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät und je nach Versuch entsprechend behandelt. Bei Erstellen der Lysate waren die Zellen zu 80–100 % konfluent. Fünf der sechs *Wells* dienten der Kern-/ Zytoplasma-Fraktionierung, das sechste der Erstellung von RIPA-Gesamtzelllysaten (s.o.). Nach Absaugung des Mediums wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und dieses abgesaugt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis respektive mit einer auf 4 °C eingestellten Kühlzentrifuge. Die Zellen wurden mit 200 µl EMSA1-Puffer pro *Well* lysiert, mit einem Zellschaber abgelöst und in einem 2 ml-Reagiergefäß zusammengeführt. Anschließend wurden die Lysate 8 min auf Eis stehen gelassen, um eine optimale Lyse zu erreichen. Der hypotone EMSA1-Puffer führt zum Platzen der Zellen, sodass nach Zentrifugation für 8 min bei 16.000 g der Überstand als zytoplasmatische Fraktion abgenommen werden kann, während sich Kerne und Zelltrümmer im Pellet befinden. Da kein Detergens verwendet wird, kann der Überstand als rein zytosolische Fraktion betrachtet werden, die keine Organellen oder intrazelluläre Membranen mehr enthält. Zur Gewinnung der Kernfraktion wurde das Pellet viermal mit je 1 ml EMSA1-Puffer vorsichtig resuspendiert, für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dies garantiert, dass die Zellen im Pellet zum Platzen gebracht werden und die Reinheit der nukleären Fraktion erreicht wird. Dann wurde das Pellet mit 150 µl Polysomenpuffer versetzt und resuspendiert. Zur Verbesserung der Lyse wurde die Flüssigkeit mehrmals durch eine Spritze mit Nadel (26 Gauge) gezogen. Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 16.000 g wurde der Überstand als nukleäre Fraktion abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Dem Kernextrakt wurden 7,5 µl Polysomenpuffer mit einem

Anteil von 10 % IGEPAL CA-630 zugesetzt, um eine Endkonzentration dieses Detergens von etwa 0,5 % im Lysat zu erhalten.

2.2.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die quantitative Bestimmung von Proteinen erfolgte in RIPA-Gesamtzelllysaten mithilfe des *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher), in IP-Lysaten und Kern-/Zytoplasma-Extrakten hingegen mithilfe des *DC Protein Assay Kit* (Bio-Rad). Eine Verdünnungsreihe von BSA diente als Kalibrierung. Für das *Pierce BCA Protein Assay Kit* wurden die Proben zweimal 1:10 verdünnt, um dann je zweimal auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen zu werden. Beim *DC Protein Assay Kit* wurden die Proben unverdünnt und ebenfalls vierfach aufgetragen. Nach Zugabe der nötigen Reagenzien gemäß Herstellerinstruktionen wurden die Proteinkonzentrationen kalorimetrisch vom Photometer bestimmt.

2.2.11 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) ermöglicht, Proteine anzureichern sowie Interaktionen zwischen Proteinen zu detektieren. Mithilfe spezifischer Antikörper werden die zu untersuchenden Proteine aus dem Lysat isoliert. Bindungspartner dieser Proteine werden dabei ebenfalls isoliert und können in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Auf diese Weise kann die Komplexbildung von Proteinen untersucht werden, wobei keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Proteine direkt miteinander interagieren oder aber über ein oder mehrere Vermittlermoleküle. Es kamen sogenannte Protein G Sepharose *Beads* zum Einsatz, etwa 90 µm große Partikel aus dem Polysaccharid Sepharose, die mit rekombinantem Protein G beschichtet sind. Protein G bindet den Fc-Teil von IgG-Antikörpern.

Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis. Zunächst erfolgte ein sogenanntes *Preclearing* des Lysats, wodurch unspezifische Bindungen an die Protein G Sepharose minimiert werden sollten. Pro Probe wurde hierfür ein Reagiergefäß (1,5 ml) mit 40 µl Protein G Sepharose befüllt. Da die Sepharose in 20 % Ethanol vorlag, musste sie zunächst „umgepuffert“ werden, indem sie zweimal mit je 1 ml IP-Lysepuffer gewaschen wurde. Zwischen den Waschsritten wurden die *Beads* für 30 sec bei 835 g zentrifugiert und der Überstand wurde mit *Microloader*-Pipettenspitzen abgenommen. Dadurch wurde der Verlust der *Beads* auf ein Minimum gesenkt. Das Lysat wurde entsprechend einer Menge von 1 mg Protein auf die *Beads* gegeben. Das Volumen wurde in allen Proben mit Lysepuffer auf 1,3 ml erhöht. Die Proben wurden mit Parafilm abgedichtet und für drei Stunden bei 4 °C invertiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 30 sec bei 835 g zentrifugiert und das Lysat wurde mittels *Microloader*-Spitzen in ein neues Röhrchen überführt. Die *Beads* wurden verworfen.

Nun wurden die Antikörper für die Präzipitation zu den Lysaten gegeben. Für jeden Antikörper wurde zusätzlich eine sogenannte Antikörper-Kontrolle (AkK) erstellt, wobei statt des Zelllysats lediglich reiner Lysepuffer mit dem Antikörper versetzt wurde. Die Kontrolle diente später der Unterscheidung, ob eine Bande im Western Blot ein gebundenes Antigen oder nur den verwendeten Antikörper abbildet. Die mit Parafilm abgedichteten Proben wurden über Nacht bei 4 °C invertiert. Diese Zeit diente dem Binden der Antikörper an die im Lysat befindlichen Antigene. Neben Antikörpern gegen die TRAIL-Rezeptoren und gegen CRM1 wurde für die Präzipitation zudem sogenanntes TRAIL-FLAG-Fc verwendet. Hierbei ist der Ligand TRAIL über die Aminosäuresequenz FLAG an einen Fc-Teil gebunden, sodass es ebenfalls über Protein G isoliert werden kann (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch H. Wajant, Universitätsklinikum Würzburg).

Neue Röhrchen wurden mit 40 µl Protein G Sepharose versehen, wobei die *Beads* in den IP-Lysepuffer überführt werden mussten (s.o.). Das Lysat bzw. die AkK wurden hinzugefügt und die Proben wurden wiederum für drei Stunden rotiert, damit die Antikörper mit dem Fc-Teil an das Protein G binden konnten. Zur Kontrolle wurden zudem *Beads* mit Lysat versetzt, dem zuvor kein Antikörper beigefügt worden war (*Beads*-Kontrolle).

Anschließend wurden die *Beads* fünfmal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen. Die Proben wurden jedes Mal für 30 sec bei 835 g zentrifugiert, der Überstand wurde mit *Microloader*-Pipettenspitzen abgesaugt und verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die trocken gelegten *Beads* bei Raumtemperatur mit 60 µl Lysepuffer und 40 µl vierfachem Lämmli-Probenpuffer versetzt. Um die Proteine von den *Beads* zu lösen, wurden die Proben auf dem Heizblock für 10 min bei 80 °C geschüttelt. Die Reaktionsgefäße wurden erneut zentrifugiert und der Überstand wurde mittels *Microloader*-Spitzen in neue Röhrchen überführt. Bis zur Analyse via Western Blot wurden die Proben bei -20 °C eingefroren. Für Präzipitation und *Blotting* wurden Antikörper unterschiedlicher Spezies verwendet, um die Detektion des IP-Antikörpers im Western Blot zu verhindern.

2.2.12 Biotinylierung oberflächlicher Proteine und deren Nachweis in den verschiedenen Zellfraktionen (sog. Biotinylierungsversuch)

Die Markierung der Oberflächenproteine von Zellen durch Biotin und die nachfolgende Isolierung der biotinylierten Proteine aus verschiedenen Zellfraktionen erfolgte mit dem *Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit* von Thermo Scientific.

Es wurden 16 T-75-Flaschen Panc-1-Zellen so ausgesät, dass sie am Folgetag eine Konfluenz von 90–95 % aufwiesen. Die Hälfte der Flaschen wurde für die Biotinylierung der Zellen verwendet, die andere Hälfte fungierte als unbiotinylierte Kontrolle. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen. Den

Herstellerangaben folgend wurden 24 mg Sulfo-NHS-SS-Biotin in 96 ml PBS gelöst. Pro T75-Flasche wurden 10 ml der Biotin-Lösung auf die Zellen gegeben. Bei den Kontroll-Ansätzen wurden 10 ml PBS verwendet. Die Zellen wurden schwenkend für 30 min bei 4 °C inkubiert, damit das Biotin an die Oberflächenproteine bindet. Durch Hinzufügen von 500 µl *Quenching* Lösung je Flasche wurde die Markierungsreaktion gestoppt. Die Lösung wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe frischen Mediums auf die Zellen. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Hälfte der Flaschen zur Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten, die andere Hälfte zur Gewinnung von RIPA-Gesamtzelllysaten verwendet. Dazu wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 10 ml kaltem PBS mit 500 µl PBS versetzt, abgeschabt und der Inhalt von vier T-75-Flaschen in einem Falcon-Röhrchen (50 ml) vereint. Die Zellen wurden bei 400 g für 5 min zentrifugiert und die Pellets in dem jeweiligen Puffer resuspendiert. Das Vorgehen bei der Kern-/Zytoplasma-Fraktionierung entspricht der bereits oben erläuterten Methode, wobei in diesem Fall je 800 µl EMSA1-Puffer auf die Pellets gegeben wurde. Nach einer Inkubation für 8 min auf Eis und Zentrifugation für 8 min bei 16.000 g wurden 500 µl des Überstandes als zytoplasmatische Fraktion in ein neues 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Für die nun folgenden Waschschriffe wurden die Pellets auf je vier Röhrchen aufgeteilt, um eine effektivere Lyse verbliebener intakter Zellen zu ermöglichen. Nach dem Waschen (s. o.) wurden sie wieder vereint, für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert und das Pellet in 500 µl Polysomenpuffer resuspendiert. Zur Gewinnung von RIPA-Gesamtzelllysaten wurden die aus den Flaschen abgeschabten Zellen nach Zentrifugation in 500 µl RIPA-Puffer aufgenommen, dann wie oben beschrieben 10 min auf Eis stehen gelassen, eingefroren, auf Eis aufgetaut, 10 sec sonifiziert, 15 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt.

Als Nächstes folgte die Isolierung der markierten Proteine aus den verschiedenen Lysaten. Dazu wurden spezielle Röhrchen („Säulen“) verwendet, die mit 500 µl NeutrAvidin Agarose versetzt wurden (im Kit enthalten). Nach einem dreimaligen Waschschriff der Säulen mit 500 µl Waschpuffer (s. Kit) wurden die Lysate zu den Säulen gegeben. Die Säulen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur überkopfrotiert. NeutrAvidin bindet Biotin und damit auch die mit Biotin markierten Proteine. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Lysate ausgewaschen und als sogenannter „Durchfluss“ aufgefangen. Die Säulen wurden nach Protokoll viermal mit 500 µl Waschpuffer gespült. Da die NeutrAvidin Agarose dabei nicht ausgewaschen wird, verbleibt diese mitsamt der gebundenen biotinylierten Proteine in der Säule. Um die Proteine von der Agarose zu lösen, wurden die Säulen mit Elutionspuffer (*SDS-PAGE Sample Buffer* + 50 mM DTT) versetzt. Das Sulfo-NHS-SS-Biotin ist über einen sogenannten *Spacer*-Arm mit dem Protein verbunden. Dieser *Spacer*-Arm enthält eine Disulfidbrücke. Durch das im Elutionspuffer enthaltene Reduktionsmittel DTT wird diese Brücke gespalten und das Protein löst sich, wobei eine Sulfhydrylgruppe am Protein verbleibt (Herstellerangaben).

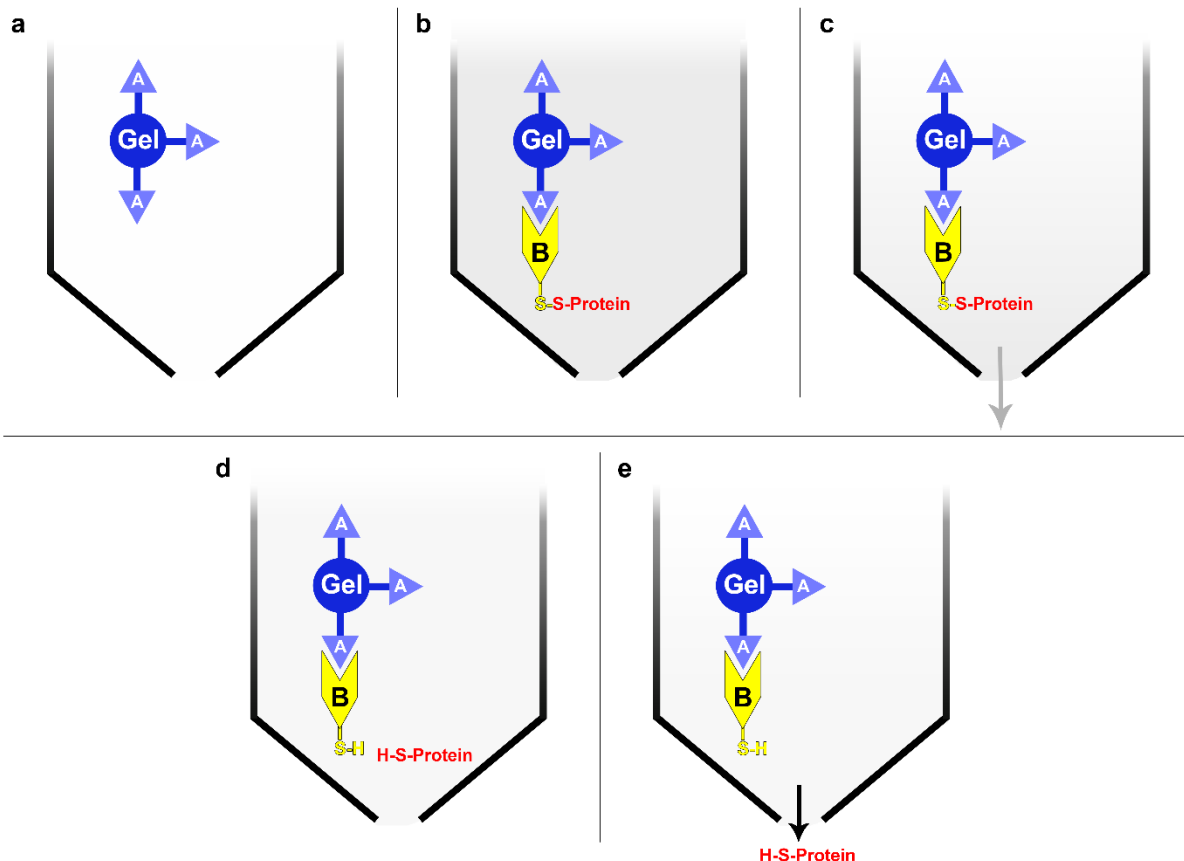


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Erstellung von „Durchfluss“ und „Eluat“

a: NeutrAvidin Agarose (blau dargestellt) befindet sich in einer Säule. **b:** Das Lysat wird hinzugegeben. Biotinmoleküle (gelb) binden mitsamt den assoziierten Proteinen (rot) an Avidin. **c:** Alles, was nicht an Avidin gebunden hat, wird als sogenannter „Durchfluss“ ausgewaschen. **d:** Elutionspuffer wird hinzugefügt. Disulfidbrücken zwischen Biotin und Proteinen werden aufgelöst. **e:** Frei gewordenes Protein kann im „Eluat“ gewonnen werden.

A = Avidin; B = Biotin; –S–S– = Disulfidbrücke; –S–H/ H–S– = Sulfhydrylgruppe

Bei den RIPA-Gesamtzelllysaten wurden 400 µl Elutionspuffer auf die Säulen gegeben, bei den Kern-/ und Zytoplasma-Lysaten je 200 µl. Nach einer Überkopfrotation für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Eluate in Reagiergefäßen aufgefangen und mit 5 µl vierfachem Lämmli-Probenpuffer versetzt. Die „Durchfluss“-Lysate wurden mit 125 µl vierfachem Lämmli-Probenpuffer versetzt. Alle Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und bis zur Verwendung für eine SDS-PAGE bei -20 °C eingefroren.

2.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts durch Gelelektrophorese wurden fertige Tris-Glycin Polyacrylamid-Gele (Gradient 4–20 %, Dicke 1,0 mm, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dabei kamen Gele mit 10, 12 oder 15 Taschen zum Einsatz. Die Gele wurden den Herstellerangaben entsprechend in die passenden Gelkammern (XCell SureLock Mini-Cell, Thermo Fisher Scientific) eingespannt und mit Laufpuffer versehen.

Nach vorsichtigem Entfernen der Kämme und Waschen der Taschen mit dem Laufpuffer wurden die mit Lämmli-Puffer versetzten Proben mittels Kapillarspitzen in die Taschen pipettiert. Das Volumen richtete sich dabei nach der jeweils gewünschten Proteinmenge. Bei jedem Gel wurden 10 µl Marker (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*) als Komigrationsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 125 V für die Dauer von zwei Stunden.

2.2.14 Western Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine via Western Blot auf eine Membran übertragen. Dazu wurden PVDF-Membranen genutzt, die zunächst für 30 sec in 100 % Methanol aktiviert wurden. Es wurde ein Tank-Blot-System verwendet, bei dem Gel und Membran in einer Blotkassette im Sandwichprinzip zwischen mit Puffer genässtem Cellulosepapier und Schwämmchen platziert wurden. Die Membran wurde anodenseitig auf das Gel gelegt. Nun wurde die Kassette gemäß Herstellerangaben in die mit Transferpuffer befüllte Blottingkammer überführt. Der Proteintransfer erfolgte innerhalb von 75 min bei 400 mA und konstanter Spannung.

Nach dem *Blotting* wurde die Membran für 30 sec in Methanol inkubiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurde sie nacheinander für je 30 sec in Methanol und TBS-T überführt. Um unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch/TSB-T geschwenkt.

Für die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde ein Falcon-Röhrchen (50 ml) mit 4 ml 5 % Magermilch/TBS-T und dem verdünnten Antikörper versehen. Nach einem kurzen Waschschrift in TBS-T wurde die Membran in das Röhrchen überführt und über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten zwei kurze und drei 10-minütige Waschschriffe in TBS-T auf einem Plattformschüttler. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch/TBS-T mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

Der Nachweis der Zielproteine erfolgte über das chemilumineszente Detektionsreagenz ECL, das bei Anwesenheit von HRP Licht emittiert und so einen Röntgenfilm schwarz färbt. Dazu wurde die Membran wie zuvor mit TBS-T gewaschen, auf eine Folie gelegt und mit 2 ml der ECL-Lösung bedeckt. Nach einer Minute wurde die Membran in eine Filmkassette überführt und dabei in transparente Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm in die Kassette gelegt und nach einer Expositionszeit von 1 min bis zu 2 h entwickelt. Die Dauer wurde je nach Stärke des emittierten Lichts variiert, um optimale Banden zu erhalten. Wenn die Banden zu schwach waren, wurde die Membran kurz gewaschen und der Vorgang mit dem Substrat ECL Plus nach Herstellerangaben wiederholt.

Eine Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der Programme *ImageJ 1.53a* und *Microsoft Excel*.

2.2.15 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie kann unter anderem zur Analyse der Präsenz bestimmter Proteine an der Zelloberfläche verwendet werden. Die Zellen werden mit einem Antikörper inkubiert, der gegen das untersuchte Oberflächenprotein gerichtet ist. Am Fc-Teil ist der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Im Zytometer werden die Zellen einzeln durch eine dünne Küvette geleitet und passieren einen Laser. Neben Informationen über Größe und Granularität der Zellen wird die Fluoreszenzintensität gemessen, die Aussagen über das Ausmaß der Exponierung des markierten Proteins macht (Givan, 2011).

Die verwendeten, mit shRNA transfizierten Zellen exprimieren GFP (grün fluoreszierendes Protein) als Transfektionskontrolle, dessen Emissionsmaximum bei 508 nm liegt. Für die Zytometrie wurden deshalb APC-gekoppelte Antikörper verwendet, die ihr Emissionsmaximum bei 660 nm haben.

Je Ansatz wurden Zellen auf einer 6-Well-Platte ausgesät mit 2×10^5 Zellen pro Well. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Wells mit je 500 µl Accutase versetzt, um die Zellen nach 10 min schonend abzulösen. Die Zellen wurden in einem Zentrifugenröhrchen vereint, runterzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 700 µl MACS/Azid-Puffer resuspendiert. FcR-Blocking Reagenz wurde im Verhältnis 1 : 100 zugefügt, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in eine 96-Loch-Platte gegeben, wobei je 1×10^5 Zellen pro Well überführt wurden. Pro Ansatz wurden Wells befüllt für die jeweiligen APC-gekoppelten Antikörper, für APC-gekoppelte IgG1- bzw. IgG2B-Isotypkontrollen sowie für eine Kontrolle ohne Antikörper. Die Platte wurde für 5 min bei 250 g und 4 °C zentrifugiert, danach vorsichtig am Waschbecken dekantiert, um den Überstand zu entfernen. Nun wurden die Proben mit 10 µl der jeweiligen Antikörper respektive der Kontrollen für 30 min inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 100 µl MACS/Azid, bei denen die Proben wie zuvor zentrifugiert und dekantiert wurden, wurden die Zellen in 100 µl MACS/Formalin aufgenommen und in Rundboden-Röhrchen überführt.

Am Durchflusszytometer wurde eine Zellzahl von je 10.000 Zellen mit dem FL4-Detektor gemessen und mit den Computerprogrammen *Weasel 3.1* und *Microsoft Excel* ausgewertet. Der Median der gemessenen Signalintensität wurde jeweils in Beziehung gesetzt zur entsprechenden Isotypkontrolle.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss exogen zugeführten TRAILs auf die Verteilung der TRAIL-Rezeptoren

Eine Stimulation mit TRAIL kann zu vermehrter Internalisierung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 führen (Kohlhaas et al., 2007). Zunächst sollte untersucht werden, ob dies auch für PDAC-Zellen zutrifft und wie die subzelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren dadurch beeinflusst wird. Hierfür wurden Colo357-Zellen im Sinne einer Zeitkinetik für 1 h, 3 h, 6 h und 18 h mit TRAIL in subtoxischer Dosierung (10 ng/ml) behandelt. Zusätzlich wurden Kontrollen erstellt, die nicht stimuliert wurden. Die Behandlung über 18 h erhielt aufgrund einer geringeren Zellaussaat einen eigenen Kontrollansatz. Für jeden Zeitpunkt wurden Zytoplasma-Extrakt, Kern-Extrakt sowie Gesamtzelllysate erstellt. Nachfolgend wurde die Expression der TRAIL-Todesrezeptoren in den Proben mittels Western Blot untersucht. Das Gesamtzelllysate (GZL) ist ein Abbild aller Fraktionen, schließt also Kern, Zytoplasma und Plasmamembran mit ein. Um ein gleichmäßiges Auftragen der Proben und die Reinheit der einzelnen Fraktionen zu kontrollieren, folgte dem TRAIL-Rezeptor-Nachweis die Immundetektion von Lamin A/C und α -Tubulin. Lamine sind kennzeichnend für den Zellkern, wohingegen Tubuline als Bestandteile des Zytoskeletts nur im Zytoplasma vorkommen. Im Gesamtzelllysate sind folglich sowohl Lamin A/C als auch α -Tubulin zu erwarten.

In Abbildung 3 wird ersichtlich, dass TRAIL-R1 und -R2 intrazellulär exprimiert werden und dabei sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommen. Insgesamt finden sich zu den verschiedenen Zeitpunkten keine deutlichen Unterschiede in der Expression der Rezeptoren. Bei genauer Betrachtung lässt sich eine leichte Erhöhung der nukleären Menge sowohl von TRAIL-R1 als auch von TRAIL-R2 nach einer Stunde erkennen. Die Ladekontrolle zeigt, dass dies nicht mit Fehlern bei der Beladung des Gels zu erklären ist. Die Menge der Rezeptoren im Zytoplasma und im Gesamtzelllysate ist unverändert.

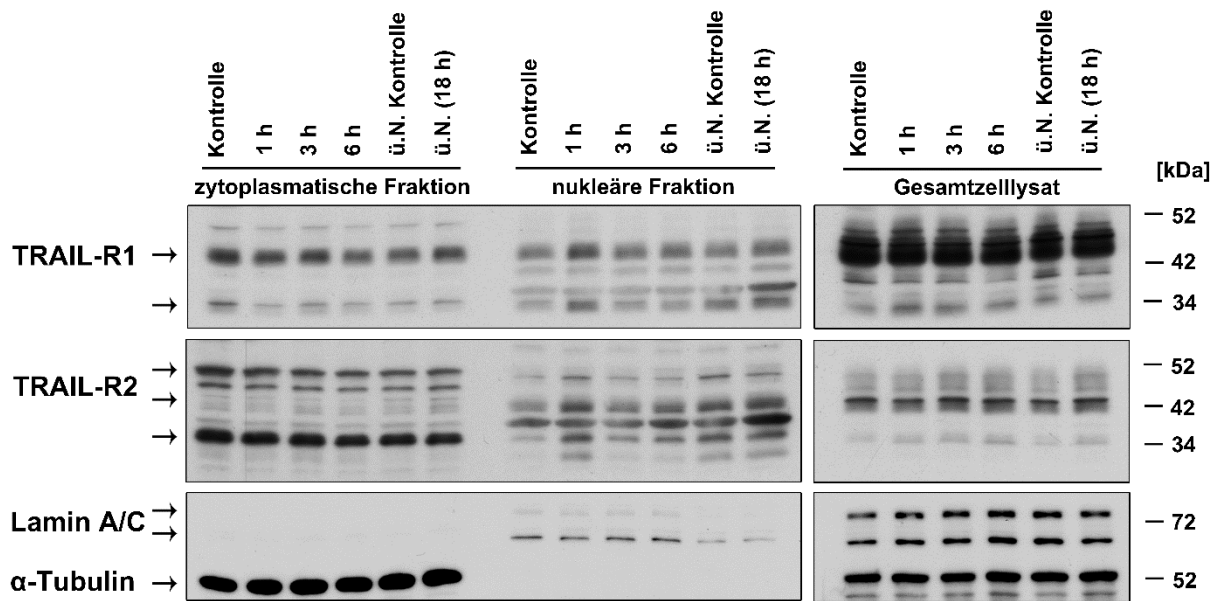


Abbildung 3: TRAIL-Stimulation führt nach einer Stunde zur leichten nukleären Akkumulation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2

Colo357-Zellen wurden für eine Dauer von 1 h, 3 h, 6 h bzw. 18 h (über Nacht) mit TRAIL stimuliert. Die Expression der TRAIL-Todesrezeptoren in zytoplasmatischer und nukleärer Fraktion sowie im Gesamtzelllysat wurde im Western Blot untersucht. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung sowie der Reinheit der Fraktionen wurden parallel die Level von Lamin A/C und α -Tubulin untersucht.

ü. N. = über Nacht

3.2 Einfluss des endogenen TRAILS auf die Verteilung der TRAIL-Rezeptoren

Auch wenn die Zellen nicht aktiv mit TRAIL stimuliert werden, stehen sie dennoch unter dem Einfluss von auto- und parakrin sezerniertem TRAIL. Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob sich ein Fehlen von TRAIL auf die Verteilung der TRAIL-Todesrezeptoren auswirkt. Um das endogene TRAIL zu neutralisieren, wurde ein gegen TRAIL gerichteter Antikörper ins Medium gegeben. In einem weiteren Ansatz wurde TRAIL-R2-Fc zur Hemmung verwendet - ein löslicher, an einen Fc-Teil gekoppelter TRAIL-R2, der TRAIL abfängt (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Zellen wurden für 48 h mit den Substanzen stimuliert, anschließend wurden wie zuvor Extrakte des Zytoplasmas, des Kerns und der Gesamtzelle erstellt.

Bei mehrfacher Durchführung des Versuches (mit Colo357- und Panc-1-Zellen) konnte kein reproduzierbarer Einfluss der TRAIL-Hemmung auf die intrazelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 festgestellt werden.

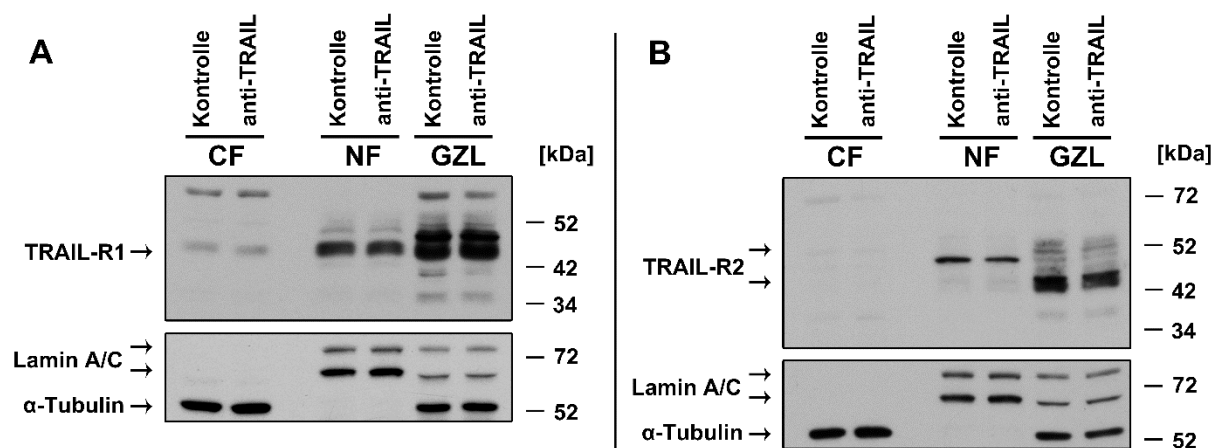


Abbildung 4: Einfluss der Neutralisierung des endogenen TRAIL auf die intrazelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren

Colo357-Zellen wurden für 48 h mit neutralisierenden anti-TRAIL Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden Extrakte der zytoplasmatischen Fraktion, der nukleären Fraktion sowie Gesamtzelllysate im Western Blot untersucht. Lamin A/C (Marker der Kernfraktion) und α -Tubulin (Marker des Zytoplasmas) dienten als Ladekontrolle.

CF = zytoplasmatische Fraktion; NF = nukleäre Fraktion; GZL = Gesamtzelllysate

3.3 Markierung und Nachverfolgung der oberflächlichen TRAIL-Todesrezeptoren

Dass TRAIL-Rezeptoren in Zytoplasma und Zellkern vorkommen, ist bekannt und wurde in den vorangegangenen Versuchen bestätigt. Der Zusammenhang und Fluss zwischen den Rezeptoren der unterschiedlichen Fraktionen ist hingegen noch weitgehend unbekannt. Man weiß, dass TRAIL-Rezeptoren endozytiert werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein Transfer der plasmamembrangebundenen TRAIL-Rezeptoren nur zum Zytoplasma oder auch zum Zellkern besteht. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob die nukleären TRAIL-Rezeptoren einem separaten Pool oder aber der Zelloberfläche entstammen.

Die Proteine auf der Zelloberfläche – unter anderem auch die dort vorhandenen TRAIL-Rezeptoren – wurden mithilfe von Biotin markiert. Nach einer vierstündigen Inkubation wurde wie zuvor eine Kern-/Zytoplasma-Fraktionierung durchgeführt sowie Gesamtzelllysate erstellt. Die biotinylierten Proteine wurden mittels Avidin aus den jeweiligen Lysaten isoliert und im Western Blot nachgewiesen. So sollte nachvollzogen werden, ob sich die markierten TRAIL-Rezeptoren der Zelloberfläche nach einer gewissen Zeit in den verschiedenen Fraktionen wiederfinden lassen (Abb. 5). Als Kontrolle dienten unbiotinylierte Zellen.

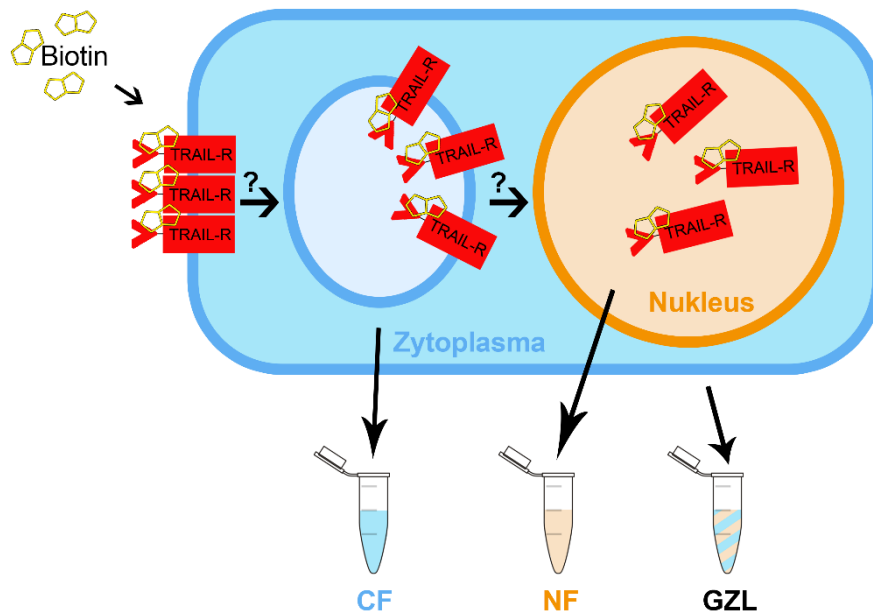


Abbildung 5: Schema des Versuchs zur Untersuchung des Ursprungs nukleärer TRAIL-Rezeptoren (Biotinylierungsversuch)

Proteine der Zelloberfläche – so auch die Plasmamembran-gebundenen TRAIL-Rezeptoren – wurden Biotin-markiert. Es wurden Extrakte des Zytoplasmas, des Zellkerns sowie Gesamtzelllysate erstellt. Im Falle eines Transfers der TRAIL-Rezeptoren zum Zellkern müssten die markierten Rezeptoren dort nachweisbar sein.

CF = cytoplasmatische Fraktion; NF = nukleäre Fraktion; GZL = Gesamtzelllysate

Das sogenannte „Eluat“ stellt denjenigen Teil der Proben dar, der isoliert worden ist. Als „Durchfluss“ wird hingegen der übrige Teil der Lysate bezeichnet – also alle unmarkierten Proteine (s. Abb. 2 im Methodenteil). Der Nachweis eines TRAIL-Rezeptors im Eluat zeigt, dass die entsprechende Fraktion TRAIL-Rezeptor enthält, der zuvor an der Plasmamembran markiert worden war.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse für TRAIL-R1 bei Panc-1-Zellen. Die folgenden Aussagen beziehen sich immer auf den biotinylierten Anteil der Proben. Erwartungsgemäß kann TRAIL-R1 im Eluat des Gesamtzelllysats nachgewiesen werden. Denn das Gesamtzelllysate beinhaltet die Plasmamembran, an der die Proteine biotinyliert worden sind. TRAIL-R1 ist zudem im Eluat von Zytoplasma und Kern nachweisbar. Dies bedeutet, dass sich an der Zelloberfläche markierter TRAIL-R1 nach 4 Stunden teilweise im Zytoplasma und im Kern befindet. Die Betrachtung des Durchflusses als „Negativbild“ des Eluates bestätigt dies. Hier ist die Menge an zytoplasmatischem und nukleärem TRAIL-R1 im Vergleich zur unbiotinylierten Kontrolle geringer und folglich wurde biotinylierter TRAIL-R1 durch Isolierung aus dem Lysat entfernt. Der Durchfluss des Gesamtzelllysats ist im Gegensatz zu den übrigen Proben schon nach kurzer Belichtungsdauer deutlich sichtbar, was mit der deutlich höheren Proteinmenge erklärt werden kann.

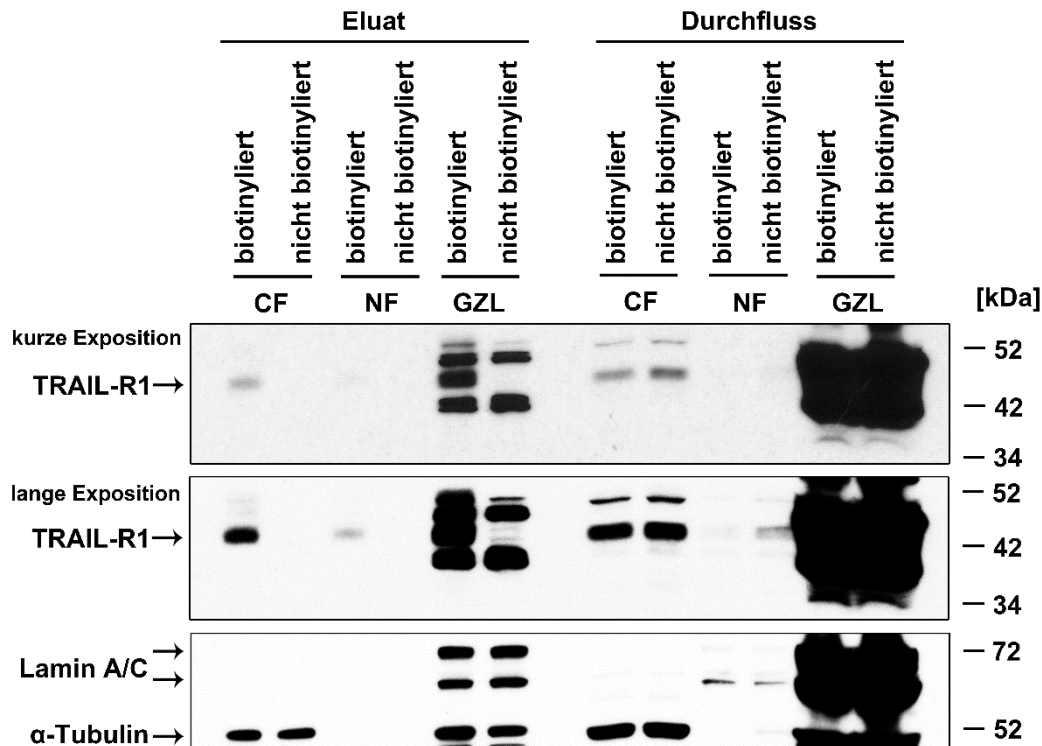


Abbildung 6: Biotin-markierter Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 1 findet sich bei Panc-1-Zellen nach 4 Stunden in Zytoplasma und Zellkern

Panc-1-Zellen wurden mittels Biotin markiert. Nach vier Stunden bei 37 °C wurden Extrakte von Kern und Zytoplasma sowie Gesamtzelllysate erstellt, aus denen im nächsten Schritt die biotinylierten Proteine als sogenanntes Eluat isoliert wurden. Der Rest wurde als sogenannter Durchfluss ausgewaschen und stellt das Negativbild der zugehörigen Eluat-Proben dar. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Lysate von Zellen untersucht, die zuvor nicht mit Biotin markiert worden waren. Sie werden hier als „nicht biotinyliert“ bezeichnet. Im Western Blot wurden die Proben auf das Vorhandensein von TRAIL-R1 untersucht. Der Nachweis von Lamin A/C und α-Tubulin diene als Lade- und Fraktionierungskontrolle.

CF = zytoplasmatische Fraktion; NF = nukleäre Fraktion; GZL = Gesamtzelllysate

Die Fraktionierungskontrolle erfolgte erneut mit α-Tubulin und Lamin A/C. Im Durchfluss ist erkennbar, dass die zytoplasmatische Fraktion Tubulin, wohingegen die nukleäre Fraktion Lamin enthält. Unerwarteterweise sind die Markerproteine auch im Eluat nachweisbar, obwohl sie eigentlich nicht hätten markiert und isoliert werden sollen. Da sie sowohl in den biotinylierten als auch in den unbiotinylierten Kontrollen auftauchen, handelt es sich vermutlich um unspezifische Bindungen an die im Versuch verwendete Avidin-Agarose. In den Eluaten der Kernfraktion konnte kein Lamin nachgewiesen werden, wohl aber im zugehörigen Durchfluss, wodurch die nukleären Proben auch als ebensolche zu betrachten sind.

Um das Translokations-Phänomen bei weiteren PDAC-Zelllinien zu untersuchen, wurde der Biotinylierungsversuch auch mit Colo357- und PancTu-I-Zellen durchgeführt (Abb. 7). Analog zu den Panc-1-Zellen ist TRAIL-R1, der an der Plasmamembran markiert worden ist, nach vier Stunden im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert.

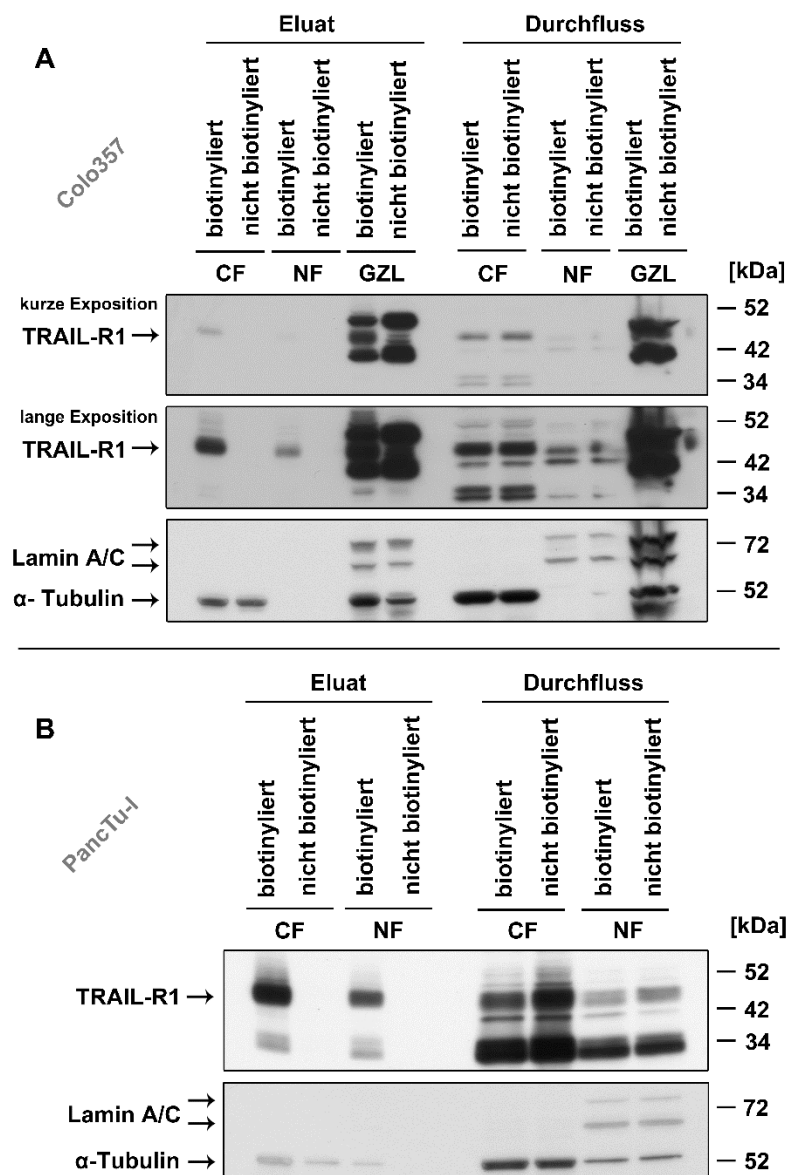


Abbildung 7: Biotin-markierter Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 1 findet sich bei Colo357- und PancTu-I-Zellen nach 4 Stunden in Zytoplasma und Zellkern

Die Oberflächenproteine von Colo357- (A) und PancTu-I-Zellen (B) wurden mit Biotin markiert. Nach 4 h wurde eine Kern-/Zytoplasma-Fraktionierung durchgeführt. Bei den Colo357-Zellen wurde zusätzlich Gesamtzelllysat (GZL) untersucht. TRAIL-R1 wurde im Western Blot nachgewiesen. Biotinylierte Proteine befinden sich im Eluat, die restlichen im Durchfluss. Lamin A/C und α-Tubulin dienen als Lade- und Fraktionierungskontrolle.

CF = zytoplasmatische Fraktion; NF = nukleäre Fraktion; GZL = Gesamtzelllysat

Beim Versuch mit den PancTu-I-Zellen zeigt die Ladekontrolle, dass der als „nukleäre Fraktion“ bezeichnete Teil neben Lamin auch in geringem Maße Tubulin aufweist (Abb. 7B). Die Probe scheint demnach mit zytoplasmatischen Anteilen verunreinigt zu sein. Auf die Untersuchung des Gesamtzelllysats wurde bei diesem Versuch verzichtet.

Der Nachweis einer möglichen Translokation des TRAIL-Rezeptors 2 von der Plasmamembran nach intrazellulär bzw. -nukleär gestaltete sich schwieriger. Bei Panc-1-Zellen ist der

zuvor biotinylierte Rezeptor zwar im Gesamtzelllysat detektierbar – erkennbar an den typischen Banden bei ca. 40 und 48 kDa (Abb. 8). Es können jedoch keine typischen TRAIL-R2-Banden im Zytoplasma oder im Zellkern nachgewiesen werden. Es zeigen sich lediglich zusätzliche Banden bei ca. 55 kDa. Ob die Banden tatsächlich TRAIL-R2 darstellen, ist unklar. In weiteren Versuchsansätzen mit Panc-1-Zellen traten sie nicht auf. Die Ladekontrolle zeigt in diesem Versuch Tubulin-Banden im Zellkern, sodass die nukleäre Fraktion als unrein zu betrachten ist.

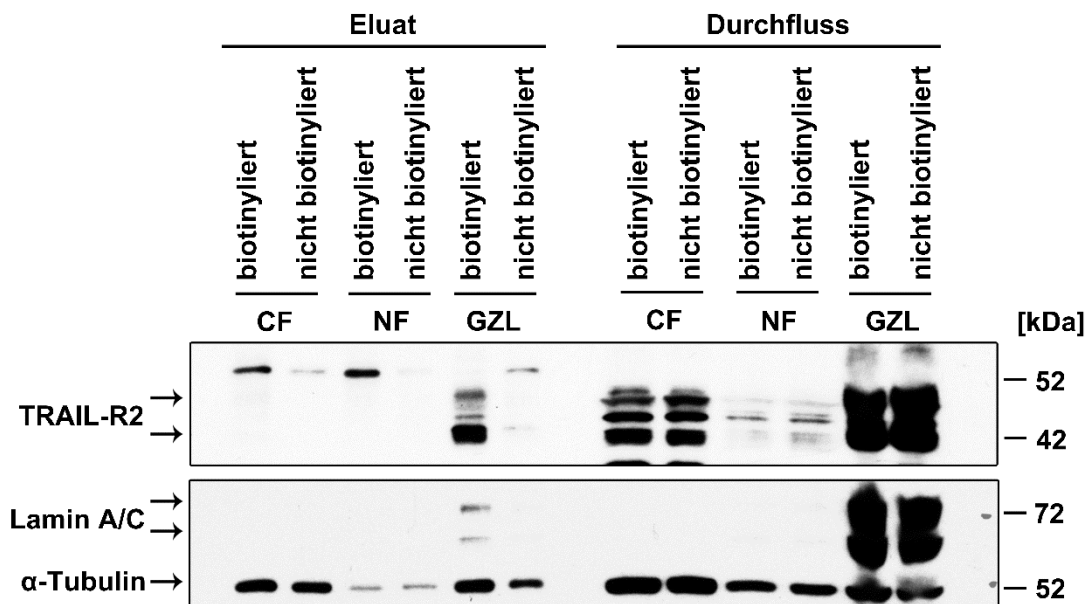


Abbildung 8: Nachweis von Biotin-markiertem Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 2 bei Panc-1-Zellen ergibt im Zytoplasma und Zellkern Western-Blot-Banden unklarer Relevanz

Panc-1-Zellen wurden mittels Biotin markiert. Nach vier Stunden bei 37 °C und wurden Lysate von Kern, Zytoplasma sowie der Gesamtzelle erstellt, aus denen im nächsten Schritt die biotinylierten Proteine als sogenanntes Eluat isoliert wurden. Der Rest wurde als sogenannter Durchfluss ausgewaschen und stellt das Negativbild der zugehörigen Eluat-Proben dar. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Lysate von Zellen untersucht, die zuvor nicht mit Biotin markiert worden waren. Sie werden hier als „nicht biotinyliert“ bezeichnet. Im Western Blot wurden die Proben auf das Vorhandensein von TRAIL-R2 untersucht. Der Nachweis von Lamin A/C und α -Tubulin wurde als Lade- und Fraktionierungskontrolle durchgeführt.

CF = zytoplasmatische Fraktion; NF = nukleäre Fraktion; GZL = Gesamtzelllysat

Beim Biotinylierungsversuch mit Colo357-Zellen ergaben sich nur schwache Banden für TRAIL-R2. Die typischen Banden bei ca. 40 und 48 kDa sind im Gesamtzelllysat erahnbar. Es findet sich keine typische TRAIL-R2-Bande im zytoplasmatischen oder nukleären Eluat. Ähnlich wie bei den Panc-1-Zellen findet sich jedoch ebenfalls eine Bande im höheren Bereich (bei ca. 60 kDa) – und zwar vor allem im Zellkern und im Gesamtzelllysat der biotinylierten Proben (Abb. 9).

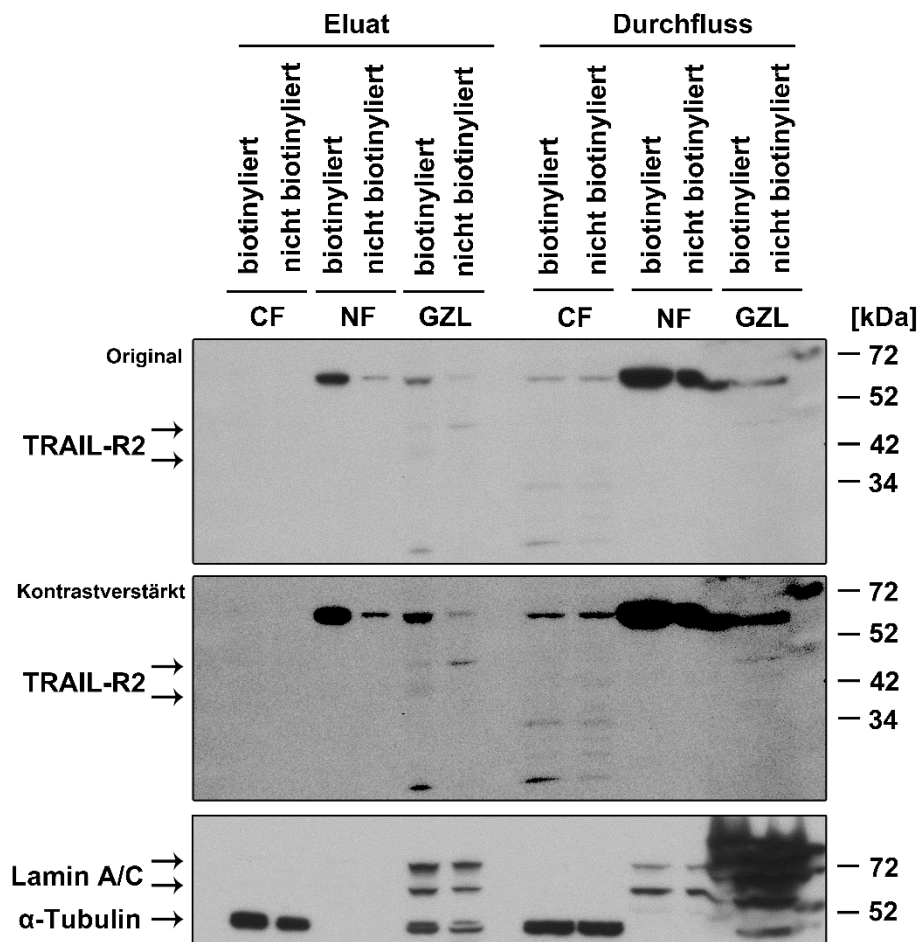


Abbildung 9: Nachweis von Biotin-markiertem Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 2 bei Colo357-Zellen ergibt im Zellkern und im Gesamtzelllysat Western-Blot-Banden unklarer Relevanz

Die Oberflächenproteine von Colo357-Zellen wurden mit Biotin markiert. Nach 4 h wurde eine Kern-/Zytoplasma-Fraktionierung durchgeführt sowie Gesamtzelllysat erstellt. TRAIL-R2 wurde im Western Blot nachgewiesen. Biotinylierte Proteine befinden sich im Eluat, die restlichen im Durchfluss. Lamin A/C und α -Tubulin dienen als Lade- und Fraktionierungskontrolle. Zur besseren Sichtbarkeit schwacher Banden wurde der Kontrast des Films am Computer mittels Tonwertkorrektur gleichmäßig verstärkt.

CF = zytoplasmatische Fraktion; NF = nukleäre Fraktion; GZL = Gesamtzelllysat

Abbildung 10 zeigt den TRAIL-R2-Nachweis des Biotinylierungsversuchs mit PancTu-I-Zellen. Im Eluat ergeben sich (nach Markierung der Oberflächenproteine mit Biotin) sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär schwache, charakteristische TRAIL-R2 Banden. Dies zeigt, dass auch TRAIL-R2 von der Plasmamembran ins Zellinnere transloziert. Die Banden im höheren Bereich finden sich hier lediglich im Durchfluss. In der Ladekontrolle kann – wie zuvor – α -Tubulin neben dem Durchfluss auch im Eluat der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden, in diesem Fall deutlich vermehrt in der biotinylierten Probe. Dies könnte auf eine Co-Präzipitation von α -Tubulin mit membranständigen Proteinen hinweisen.

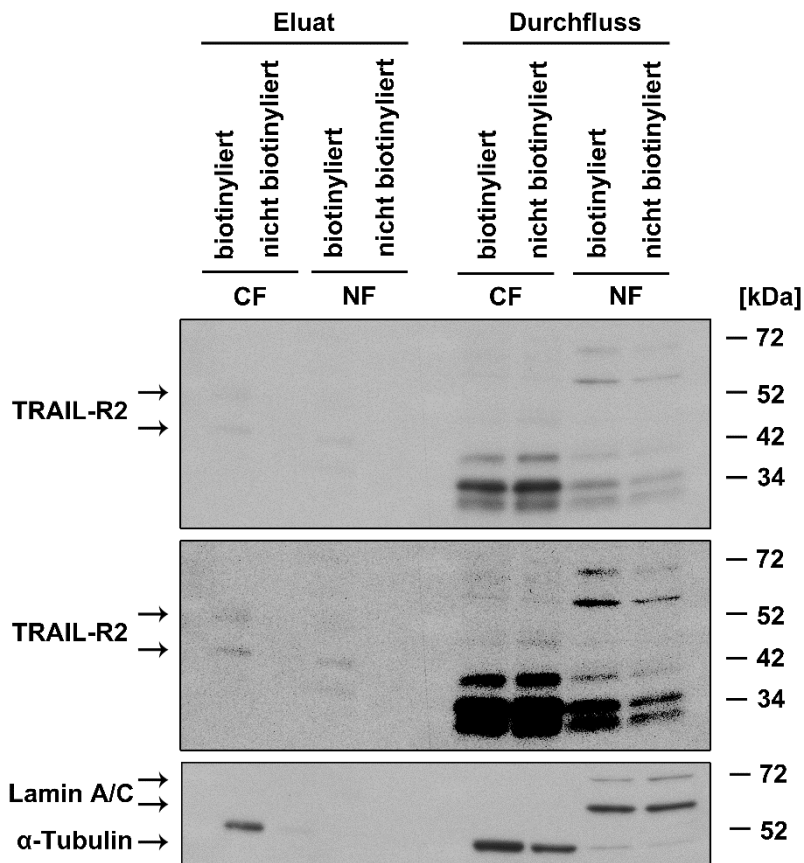


Abbildung 10: Biotin-markierter Plasmamembran-TRAIL-Rezeptor 2 findet sich bei PancTu-I-Zellen nach 4 Stunden in Zytoplasma und Zellkern

Die Oberflächenproteine von PancTu-I-Zellen wurden mit Biotin markiert. Nach 4 h wurde eine Kern-/Zytoplasma-Fraktionierung durchgeführt. TRAIL-R2 wurde im Western Blot nachgewiesen. Biotinylierte Proteine befinden sich im Eluat, die restlichen im Durchfluss. Lamin A/C und α -Tubulin dienen als Lade- und Fraktionierungskontrolle. Zur besseren Sichtbarkeit schwacher Banden wurde der Kontrast des Films am Computer mittels Tonwertkorrektur gleichmäßig verstärkt.

CF = zytoplasmatische Fraktion; NF = nukleäre Fraktion

3.4 Assoziation von CRM1 mit TRAIL-Rezeptoren

Das Shuttle-Protein CRM1 (Exportin 1) bindet sein Substrat über NES (Stade et al., 1997). Im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung von CRM1 am Kernexport der TRAIL-Rezeptoren wurden mit dem Computerprogramm *NetNES Server* der Technischen Universität Dänemark im Rahmen der vorliegenden Arbeit potenzielle NES für TRAIL-R1 und -R2 ermittelt (s. Anhang).

Mittels Immunpräzipitation (IP) wurde eine Interaktion zwischen CRM1 und TRAIL-Rezeptoren weiter untersucht. Über die Antikörper HS101, HS201 und HS402 wurden TRAIL-R1, TRAIL-R2 bzw. TRAIL-R4 mitsamt ihrer Bindungspartner aus dem Lysat von Panc-1-Zellen isoliert. Zusätzlich wurden die TRAIL-Rezeptoren über TRAIL-FLAG-Fc präzipitiert. Dies stellt den Liganden dar, der über eine Aminosäuresequenz (FLAG) mit einem Fc-Teil gekoppelt ist,

wodurch er ebenfalls an die *Beads* bindet. Anschließend wurden die TRAIL-Rezeptor-Präzipitate mittels Western Blot hinsichtlich Anwesenheit von CRM1 als Co-Präzipitat untersucht. Des Weiteren wurde versucht, vice versa CRM1 über einen entsprechenden Antikörper aus dem Lysat zu separieren und nachfolgend die TRAIL-Rezeptoren im Western Blot als Co-Präzipitat zu identifizieren. Antikörper- und *Beads*-Kontrollen wurden auf das Gel aufgetragen, um ausschließen zu können, dass sichtbare Banden lediglich unspezifische Bindungen darstellen (s. Methodenteil).

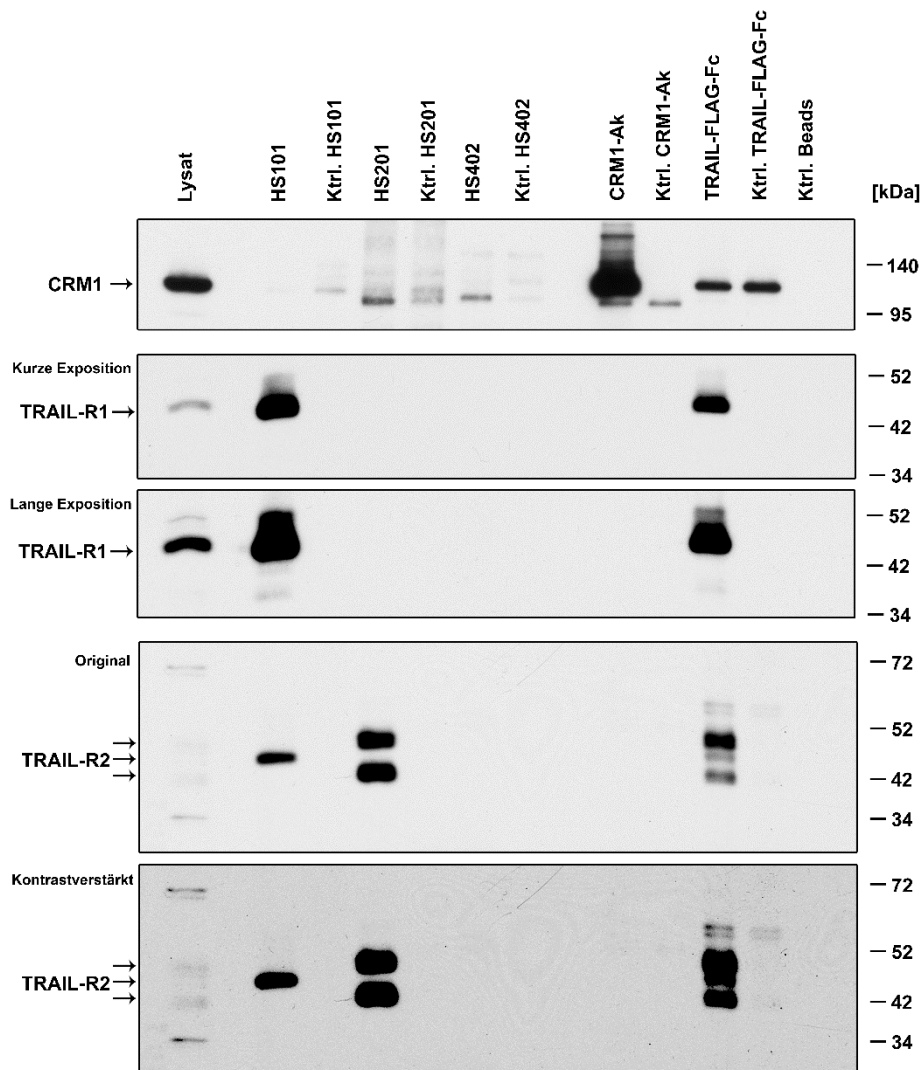


Abbildung 11: Immunpräzipitation zur Untersuchung einer Assoziation von TRAIL-Rezeptoren mit CRM1

Panc-1-Gesamtzelllysat wurde für eine Immunpräzipitation von TRAIL-R1 (HS101), -R2 (HS201), -R4 (HS402) sowie von CRM1 mit nachfolgendem Nachweis von TRAIL-R1, -R2 und CRM1 im Western Blot genutzt. „Lysat“ stellt den Western-Blot-Nachweis ohne vorherige Immunpräzipitation dar. TRAIL-FLAG-Fc ist TRAIL, gekoppelt an FLAG und einen Fc-Teil. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden Antikörper-Kontrollen sowie eine Beads-Kontrolle durchgeführt (s. Methoden). Die Pfeile zeigen die Höhe der typischen Banden des jeweiligen Proteins an. Der TRAIL-R1-Nachweis ist nach unterschiedlich langen Expositionszeiten dargestellt. Zur besseren Sichtbarkeit von (trotz langer Expositionszeit) schwachen TRAIL-R2-Banden wurde der Kontrast des Films am Computer mittels Tonwertkorrektur gleichmäßig verstärkt.

Ktrl. = Kontrolle; Ak = Antikörper

Die Proteine CRM1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 können im unbehandelten Lysat mit ihren typischen Banden nachgewiesen werden, wobei das Signal für TRAIL-R2 schwach ausfällt (Abb. 11). Anhand des Western Blot-Nachweises eines zuvor präzipitierten Proteins kann der Erfolg der IP sichtbar gemacht werden. So funktioniert die Präzipitation von TRAIL-R1 mit HS101 als auch die von TRAIL-R2 mit HS201, denn die Rezeptoren lassen sich in den jeweiligen Proben nachweisen. TRAIL-R2 wird durch HS101 co-präzipitiert, was auf eine Interaktion von TRAIL-R1 mit TRAIL-R2 hinweist. Hierbei stellen sich für TRAIL-R2 jedoch nicht wie üblich zwei Banden bei ca. 40 kDa und 48 kDa dar, sondern eine Bande bei ca. 45 kDa. Im Präzipitat von TRAIL-R2 mit HS201 ist kein TRAIL-R1 detektierbar. TRAIL-FLAG-Fc präzipitiert sowohl TRAIL-R1 als auch alle drei TRAIL-R2-Banden, wobei bevorzugt die große TRAIL-R2-Isoform gebunden wird. Signale im CRM1-Blot nach IP mit HS201 weisen auf eine mögliche Interaktion von CRM1 mit TRAIL-R2 hin. Umgekehrt kann nach CRM1-Präzipitation jedoch kein TRAIL-R2 im Western Blot nachgewiesen werden. Nach Präzipitation mit HS402 findet sich eine schwache CRM1-Bande unklarer Signifikanz. Die „CRM1-Banden“ nach Präzipitation mit TRAIL-FLAG-Fc treten auch in der Kontrolle auf, sodass sie keine Rückschlüsse auf eine Assoziation von CRM1 mit TRAIL-Rezeptoren erlauben.

Auf analoge Weise wurde der Immunpräzipitationsversuch mit den Antikörpern Mapatumumab („Mapa“) für TRAIL-R1 respektive Lexatumumab („Lexa“) für TRAIL-R2 mit Kernextrakt von Panc-1-Zellen durchgeführt (Abb. 12). Dieser Versuch wurde von Verena Haselmann in der AG Trauzold durchgeführt. Auch Mapatumumab co-präzipitiert TRAIL-R2 in einer Höhe von 45 kDa. Dies zeigt eine Interaktion von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Zellkern.

Während im TRAIL-R1-Präzipitat kein CRM1 detektiert werden konnte, konnte das Exportprotein mit Lexatumumab co-präzipitiert werden. Dies impliziert eine Assoziation von CRM1 und TRAIL-R2 im Zellkern. Die IP wurde ergänzend unter Zugabe von RNase durchgeführt, um eine Beteiligung von RNA an den Komplexbildungen zu untersuchen. RNase scheint die Komplexbildung zwischen CRM1 und TRAIL-R2 zu begünstigen. Zur Kontrolle wurden je 20 µg Lysat-Protein auf ein Gel aufgetragen, um dort Lamin A/C als Kernmarker nachzuweisen.

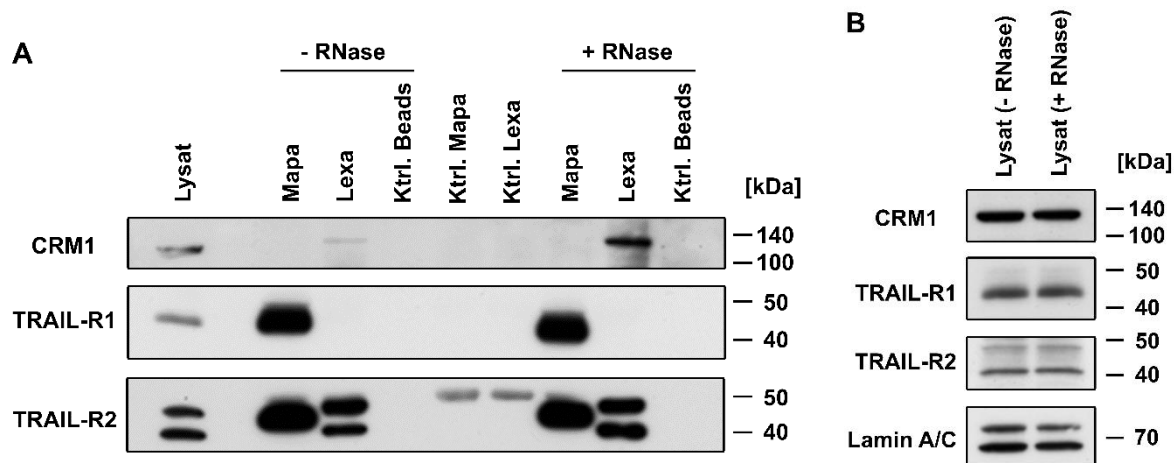


Abbildung 12: TRAIL-R2 interagiert mit dem Kernexportprotein CRM1

A: Die Präzipitation aus dem Kernextrakt von Panc-1-Zellen erfolgte bei TRAIL-R1 mit dem Antikörper Mapatumumab, bei TRAIL-R2 mit Lexatumumab. Die Proteinkomplexe wurden mittels Western Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden zum einen die Lysate ohne Antikörper inkubiert (Ktrl. Beads), zum anderen die Antikörper in PBS analysiert (Ktrl. Mapa, Ktrl. Lexa). Um die Beteiligung von RNA an der Komplexbildung zu untersuchen, wurde der Versuch auch an mit RNase behandeltem Lysat durchgeführt. **B:** Zur Kontrolle der Kernextrakte wurde im Western Blot Lamin A/C nachgewiesen. Versuch durchgeführt von Verena Haselmann.

Mapa= Mapatumumab; Lexa = Lexatumumab; Ktrl. = Kontrolle

3.5 Auswirkungen einer Hemmung von CRM1 auf die Verteilung der intrazellulären TRAIL-Rezeptoren

Panc89-Zellen wurden mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B (LMB) behandelt. Im Falle einer Beteiligung von CRM1 am Kernexport von TRAIL-R1/ -R2 müsste eine Hemmung des Karyopherins zur Akkumulation der Rezeptoren im Kern führen. Es wurden Lysate aus zytoplasmatischer und nukleärer Fraktion sowie der Gesamtzellen erstellt und im Western Blot auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 untersucht. Zum Vergleich wurden die Lysate unbehandelter Zellen verwendet. Als Kontrolle diente der Nachweis von α -Tubulin und Lamin A/C.

Bei den mit LMB behandelten Panc89-Zellen ist die Menge der beiden Rezeptoren im Zytoplasma vermindert und im Kern erhöht, während sie im Gesamtzelllysat weitgehend unverändert ist. Dies unterstützt die Hypothese der Beteiligung von CRM1 am Transport der TRAIL-Todesrezeptoren. Des Weiteren fällt auf, dass TRAIL-R1 neben seiner üblichen Bande bei ca. 45 kDa eine weitere Bande bei ca. 34 kDa aufweist. Analog findet sich bei TRAIL-R2 neben den bekannten Banden bei 34 kDa, 40 kDa und 48 kDa eine weitere Bande im Bereich von 30 kDa. Die zusätzlichen Banden sind – in Relation zu den üblichen Banden – intrazellulär stärker ausgeprägt als im Gesamtzelllysate. Die Effekte der LMB-Behandlung machen sich bei ihnen besonders stark bemerkbar (Abb. 13).

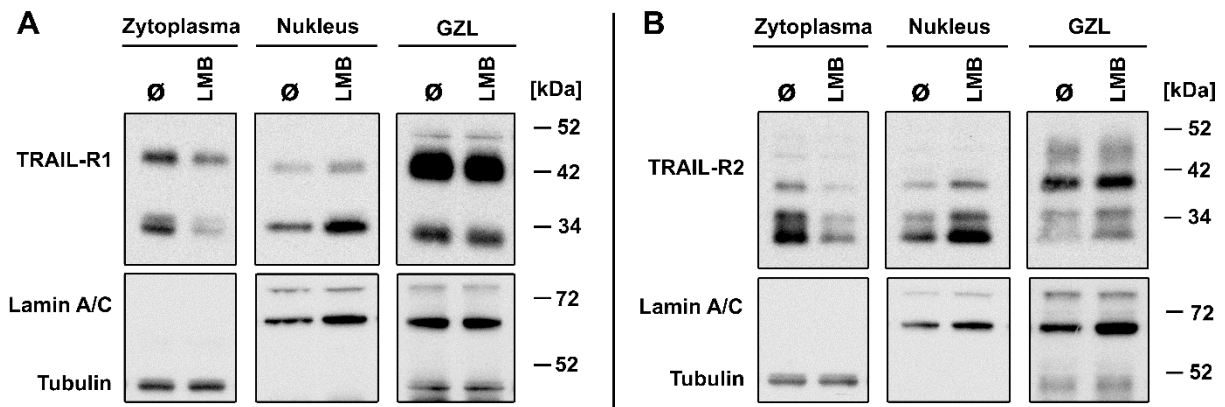


Abbildung 13: Leptomycin B-Behandlung von Panc89-Zellen mit Fraktionierung der Zellen und Nachweis von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Western Blot

Panc89-Zellen wurden für 8 Stunden mit Leptomycin B behandelt. Anschließend wurden Zytoplasma- und Zellkernextrakte sowie Gesamtzelllysate hergestellt. Die Präsenz der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 in den Proben wurde mittels Western Blot untersucht. Als Vergleich dienten Lysate unbehandelter Zellen. Lamin und Tubulin dienten als Fraktionierungs- und Ladekontrolle.

GZL = Gesamtzelllysate; LMB = Leptomycin B; ø = unbehandelte Zellen

Dieser Versuch wurde ebenfalls mit Panc-1- und Colo357-Zellen durchgeführt, wobei der Effekt hier bei schwachem Rezeptor-Nachweis in den Fraktionen nicht gezeigt werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.6 Einfluss von TRAIL-Rezeptoren

Um den Einfluss der TRAIL-Rezeptoren auf die intrazelluläre Verteilung der jeweils anderen TRAIL-Rezeptor-Typen zu untersuchen, wurde je ein Rezeptor-Typ durch shRNA supprimiert. Die erfolgreiche Herunterregulation wurde auf PCR-Ebene überprüft (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Versuche wurden mit PancTu-I- sowie Colo357-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, in die ein Vektor ohne supprimierende Eigenschaften eingebracht wurde (bezeichnet als „*non-silencing*“, n.s.). Mittels Zellfraktionierung wurden Lysate von Zytoplasma, Kern sowie der gesamten Zelle erstellt. Im Western Blot wurden die TRAIL-Rezeptoren in den verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen, wobei der Versuch insgesamt dreimal mit PancTu-I-Zellen und zweimal mit Colo357-Zellen durchgeführt wurde. Lamin und Tubulin dienten als Beladungs- und Reinheitskontrolle. Zusätzlich wurde die Expression der TRAIL-Rezeptoren an der Zelloberfläche mithilfe der Durchflusszytometrie studiert.

Abbildung 14 stellt die Ergebnisse bei den PancTu-I-Zellen dar. Die Banden im Western Blot müssen immer im Vergleich zur Kontrollbande (n.s.) betrachtet werden. Eine erfolgreiche Herunterregulation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 kann konstatiert werden, denn die Rezeptoren sind bei entsprechendem Knockdown (KD) kaum mehr nachweisbar. TRAIL-R1 können zwei Banden – bei ca. 38 kDa bzw. 50 kDa – zugeordnet werden. Der *Knockdown* von TRAIL-R2 beeinflusst die subzelluläre TRAIL-R1-Expression nicht. Ein Runterregulieren von TRAIL-R4 (shRNA 239709) führt zu einer erhöhten nukleären sowie gesamtzellulären Präsenz von TRAIL-R1 (Abb. 14A & 17A). Im Zytoplasma ist bei TRAIL-R4-Knockdown kein deutlicher Unterschied in der Expression von TRAIL-R1 zu erkennen.

Wie Abbildung 14B zeigt, stellt sich TRAIL-R2 im Wesentlichen auf einer Höhe von ca. 34 kDa, 40 kDa und 48 kDa dar. Insbesondere im Zellkern findet sich eine weitere Bande bei 32 kDa. Die 48 kDa-Bande ist im Zytoplasma – wenn überhaupt – nur sehr schwach nachweisbar. Sowohl bei Runterregulation von TRAIL-R1 als auch von TRAIL-R4 findet sich deutlich mehr TRAIL-R2 im Kern im Vergleich zur Kontrolle, wobei der Anstieg vor allem die kleineren Banden bei 32 kDa, 34 kDa und 40 kDa betrifft. Die Signalintensität der großen TRAIL-R2-Isoform bei 48 kDa bleibt unberührt. Auch im Gesamtzelllysat steigt die Menge an TRAIL-R2. Die Menge im Zytoplasma hingegen verändert sich kaum.

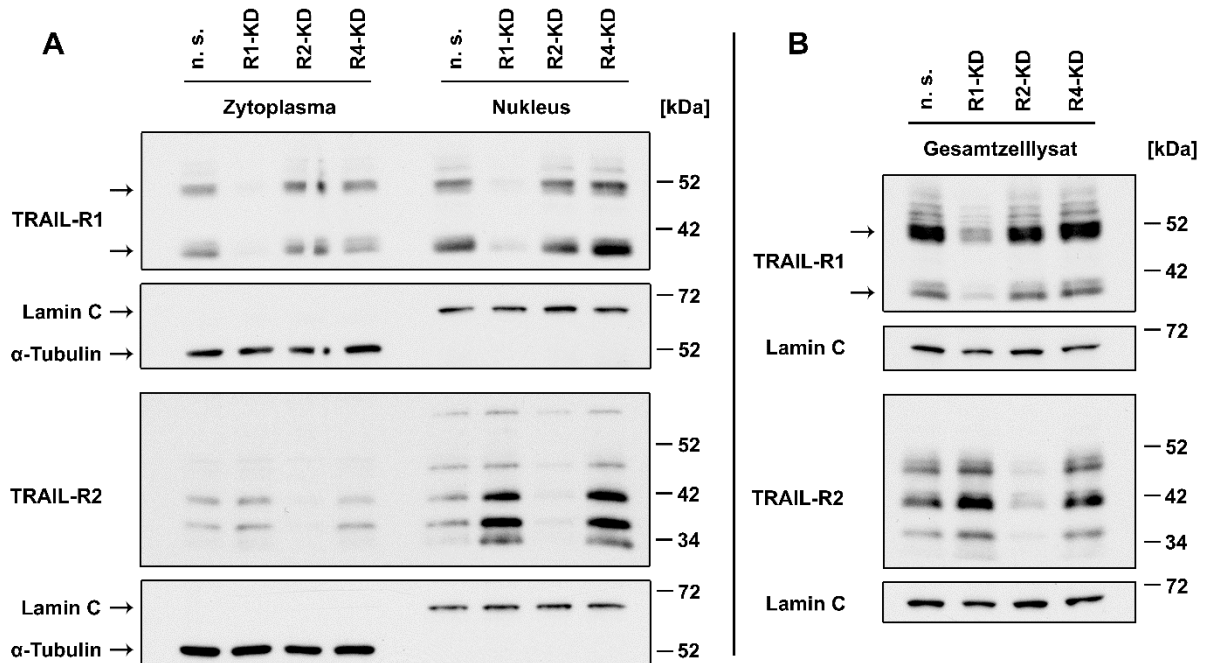


Abbildung 14: Gegenseitige Beeinflussung der TRAIL-Rezeptoren auf ihre intrazelluläre Expression in PancTu-I-Zellen

Herunterregulation von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und TRAIL-R4 mittels shRNA und nachfolgende Untersuchung der verschiedenen Zellkompartimente auf die Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Als Vergleich diente ein Vektor ohne TRAIL-R-Suppression (*non-silencing*). Zur Lade- und Fraktionierungskontrolle wurden Lamin und Tubulin verwendet.

n. s. = *non-silencing*; R1 = TRAIL-R1; R2 = TRAIL-R2, R4 = TRAIL-R4; KD = *Knockdown*

Die am besten untersuchte und verstandene Funktion der TRAIL-Rezeptoren ist die an der Zelloberfläche. Die Gesamtzelllysate beinhalten zwar die an der Plasmamembran gebundenen TRAIL-Rezeptoren, jedoch ebenso die Rezeptoren aller anderen Fraktionen. Um die Expression an der Oberfläche isoliert zu betrachten, wurden die oben verwendeten PancTu-I-Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert. Zur Färbung wurden dabei APC-gekoppelte Antikörper gegen TRAIL-R1, -R2 oder -R4 verwendet. Ähnlich dem vorangegangenen Versuch sollte untersucht werden, wie sich die Suppression eines Rezeptors auf die Expression der anderen Rezeptoren auswirkt. Die Zellen ohne *Knockdown* (n. s.) dienten erneut als Referenz.

Wie Abbildung 15 darstellt, führt die Herunterregulation eines Rezeptors wie erwartet zu einer deutlich verringerten Expression dieses Rezeptors an der Plasmamembran, wobei der Effekt bei TRAIL-R4 nur schwach ist. Der TRAIL-R2-Antikörper weist die größte Signalintensität auf. Jedoch kann dies nicht als höchste Rezeptorexpression auf der Plasmamembran quantifiziert werden, da das Ausmaß der Signalstärke zum einen von der zugehörigen Isotypkontrolle und zum anderen von der Affinität des jeweiligen Antikörpers zu seiner Zielstruktur abhängig ist. Nur innerhalb eines Rezeptors kann die Signalstärke der verschiedenen Klone in Relation gesetzt werden.

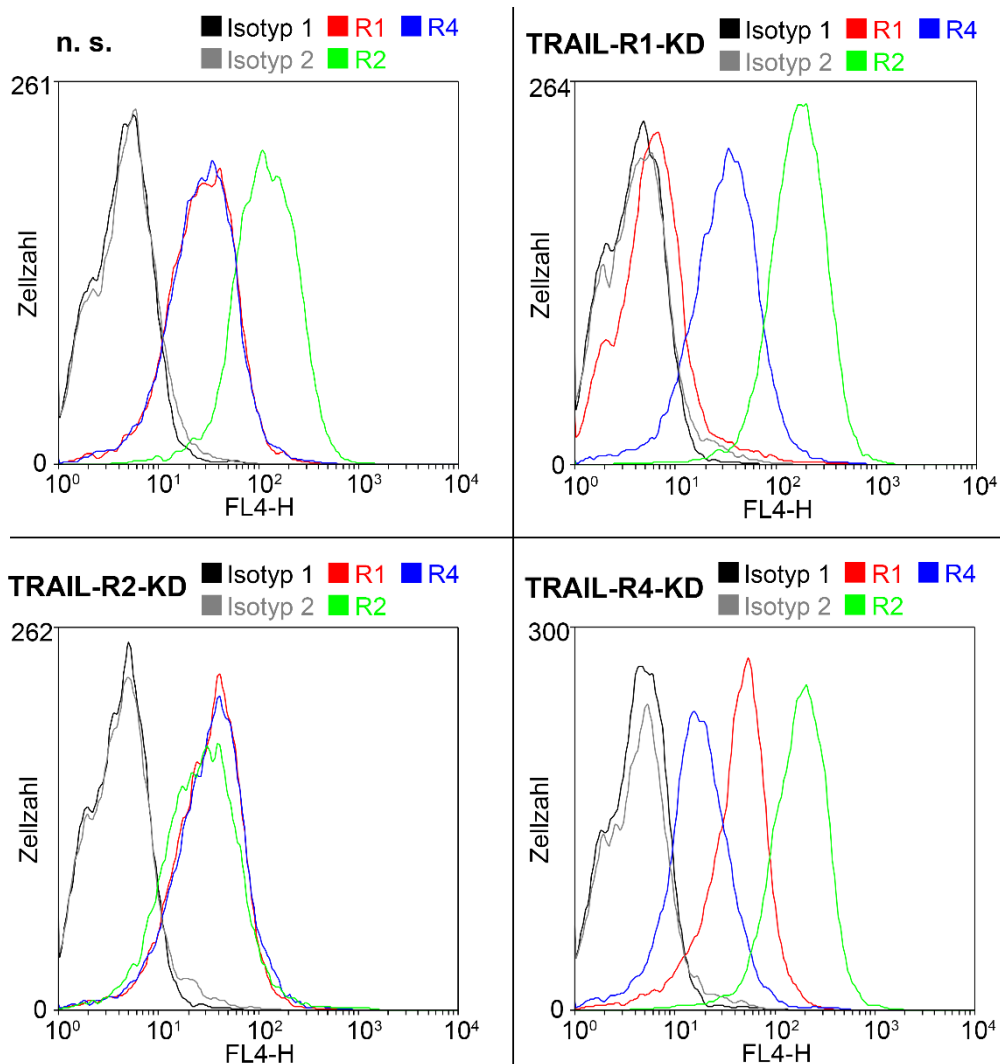


Abbildung 15: PancTu-I-Durchflusszytometrie mit Färbung der oberflächlichen TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4 bei Knockdown einzelner Rezeptoren – Histogrammdarstellung

Es wurden PancTu-I-Klone mit Knockdown von TRAIL-R1, -R2 und -R4 sowie ein Kontroll-Klon („non-silencing“) untersucht. Die Histogramme zeigen die gemessene Signalintensität (FL4-H) nach Fluoreszenzfärbung mit den jeweiligen APC-gekoppelten Antikörpern. Bei den TRAIL-R1- und TRAIL-R4-Antikörpern dient Isotyp 1 als Kontrolle, beim TRAIL-R2-Ak ist es Isotyp 2. Eine quantifizierte Darstellung dieser Ergebnisse bietet Abbildung 16.

n. s. = non-silencing; R1 = TRAIL-R1; R2 = TRAIL-R2; R4 = TRAIL-R4; KD = Knockdown

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in einem Säulendiagramm. Die Herunterregulation eines TRAIL-Rezeptors geht in jedem Fall mit einer Zunahme der übrigen Rezeptoren an der Membran einher. Am stärksten ist dieser Effekt bei TRAIL-R2, dessen Exposition an der Membran bei Knockdown von TRAIL-R1 bzw. von TRAIL-R4 deutlich ansteigt. Bei Knockdown von TRAIL-R4 steigt auch TRAIL-R1 klar an. Der Anstieg von TRAIL-R1 nach TRAIL-R2-KD fällt nur gering aus. Dieses Ergebnis war in mehreren Versuchen reproduzierbar.

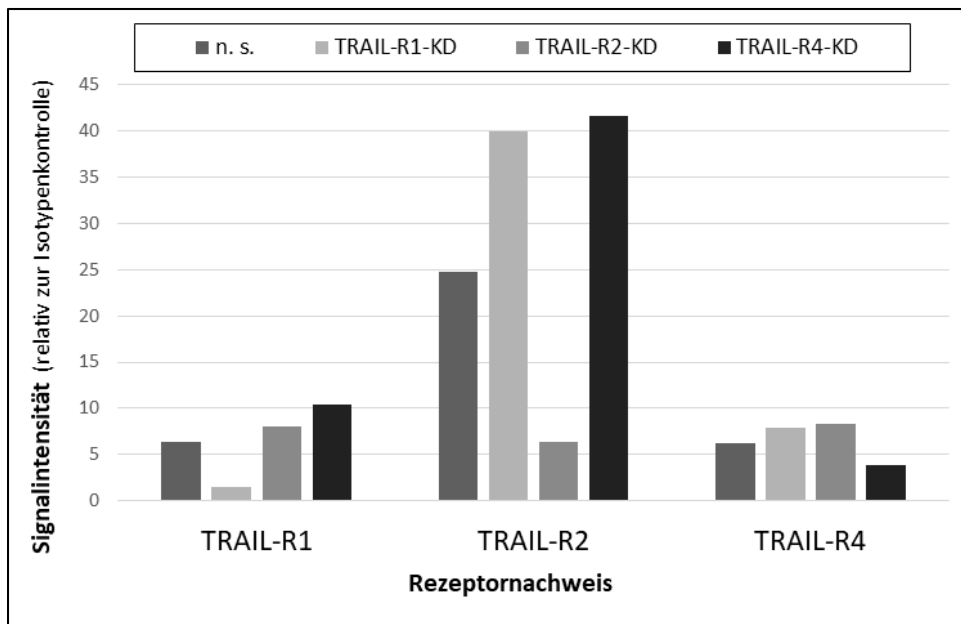


Abbildung 16: PancTu-I-Durchflusszytometrie mit Färbung der oberflächlichen TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4 bei Knockdown einzelner Rezeptoren – Säulendiagramm

Das Diagramm zeigt die TRAIL-Rezeptor-Expression in den verschiedenen Zellklonen. Es stellt die Signalintensität der membrangebundenen TRAIL-Rezeptoren in Relation zur Intensität der Isotypkontrolle dar – und zwar bei Knockdown von TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder TRAIL-R4 sowie ohne Knockdown (n. s.).

n. s. = *non-silencing*; KD = *Knockdown*

Die Ergebnisse des Western Blots (Abb. 14) wurden quantifiziert und gemeinsam mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (Abb. 15 & 16) in einer gemeinsamen Darstellung zusammengefasst (Abb. 17). Die Werte sind jeweils in Beziehung gesetzt zur Kontrolle ohne Herunterregulation (*non-silencing*). Da es sich bei Western Blot und Durchflusszytometrie um verschiedene Methoden handelt, können die Veränderungen der Expression nicht eins zu eins miteinander in Relation gesetzt werden. Man gewinnt aber einen Überblick darüber, wie sich die Herunterregulation eines Rezeptors auf die Expression in den verschiedenen Zellkompartimenten auswirkt. Erneut wird deutlich, dass die Herunterregulation von TRAIL-R1 und -R4 zu einer Zunahme von TRAIL-R2 v. a. im Zellkern führt.

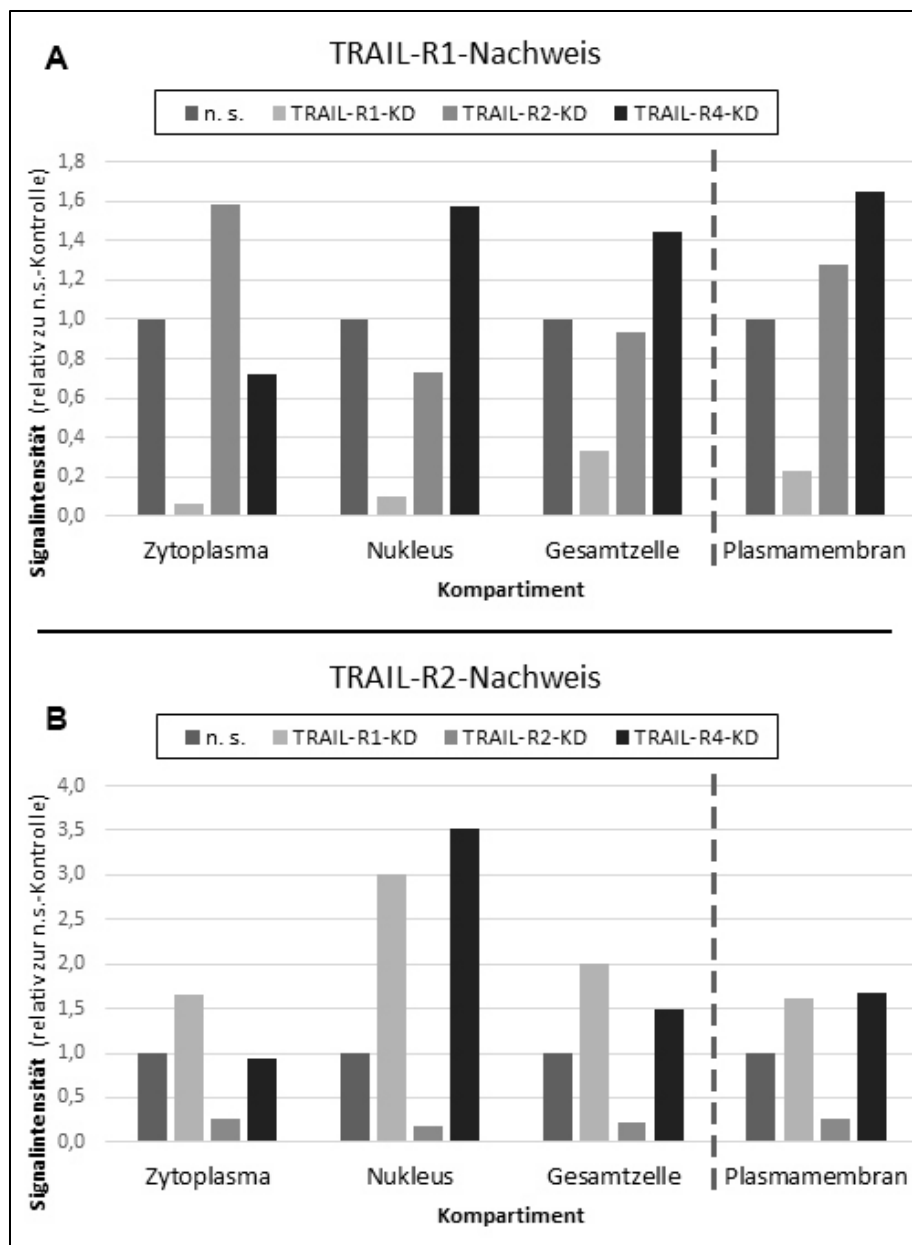


Abbildung 17: Veränderungen der subzellulären TRAIL-R1/R2-Präsenz in PancTu-I-Zellen bei Knockdown der TRAIL-Rezeptoren (Zusammenfassung)

Die Western-Blot-Ergebnisse aus Abbildung 14 wurden quantifiziert und gemeinsam mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie dargestellt. Dadurch gewinnt man einen Überblick über die Expression von TRAIL-R1 (A) bzw. TRAIL-R2 (B) in den verschiedenen Zellkompartimenten (Zytoplasma, Zellkern, Gesamtzelllysate, Plasmamembran) bei Herunterregulation der einzelnen TRAIL-Rezeptoren – jeweils bezogen auf die Kontrolle ohne Herunterregulation („non-silencing“).

n. s. = non-silencing; KD = Knockdown

Die Versuche wurden ebenfalls mit Colo357-Zellen durchgeführt (Abb. 18–20). Im Gesamtzelllysate ist die erfolgreiche Herunterregulation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 sichtbar. In der nukleären oder zytoplasmatischen Fraktion bildet sich der Knockdown von TRAIL-R2 kaum ab. Einzig die Bande bei 34 kDa zeigt im Kern eine deutliche Abblässung im Vergleich zur Kontrolle.

Analog zu den PancTu-I-Zellen steigt die nukleäre Präsenz von TRAIL-R1 bei Suppression von TRAIL-R4. Im Zytoplasma und im Gesamtzelllysate zeigen sich keine deutlichen Unterschiede der TRAIL-R1-Expression. Erneut ist eine zusätzliche TRAIL-R1-Bande bei ca. 38 kDa erkennbar (Abb. 18A).

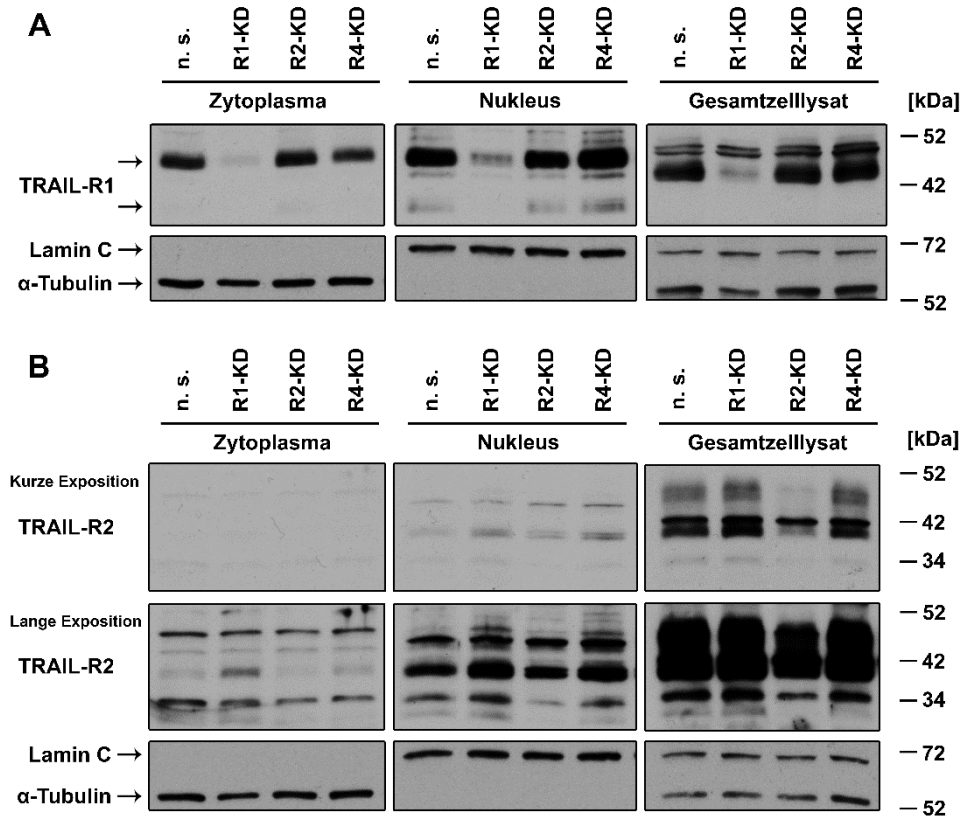


Abbildung 18: Gegenseitige Beeinflussung der TRAIL-Rezeptoren auf ihre intrazelluläre Expression in Colo357-Zellen

Mittels shRNA wurden Colo357-Klone mit Herunterregulation von TRAIL-R1, TRAIL-R2 bzw. TRAIL-R4 etabliert. Es wurden Lysate von zytoplasmatischer und nukleärer Zellfraktion sowie von Gesamtzelllysate erstellt. Im Western Blot erfolgte der Nachweis von TRAIL-R1 (**A**) und TRAIL-R2 (**B**) in den verschiedenen Lysaten der Klone. Als Vergleich diente ein Vektor ohne TRAIL-R-Suppression („non-silencing“). Zur Lade- und Fraktionierungskontrolle wurden Lamin C und α-Tubulin verwendet.

n. s. = non-silencing; R1 = TRAIL-R1; R2 = TRAIL-R2; R4 = TRAIL-R4; KD = Knockdown

TRAIL-R2 lässt sich im Zytoplasma insgesamt nur schwach nachweisen. Bei Herunterregulation von TRAIL-R1 steigt die zytoplasmatische Menge an TRAIL-R2 leicht an. Auch bei den Colo357-Zellen ist TRAIL-R2 im Kern erhöht, wenn TRAIL-R1 oder TRAIL-R4 runterreguliert werden. Im Gesamtzelllysate ist die Expression unter diesen Bedingungen ebenfalls leicht erhöht. Insgesamt findet sich bei Supprimieren von TRAIL-R1 also in allen drei Lysaten (Zytoplasma, Kern, Gesamtzelle) eine Erhöhung von TRAIL-R2. Wie in vorangegangenen Versuchen sind TRAIL-R2-Banden bei ca. 32 kDa und 34 kDa erkennbar, die im Zytoplasma und Nukleus prominenter erscheinen im Vergleich zum Gesamtzelllysate. Es

handelt sich dabei nicht um unspezifische Signale, denn bei Runterregulation von TRAIL-R2 verblissen sie (Abb. 18B).

Während die erfolgreiche Herunterregulation von TRAIL-R2 im Gesamtzelllysat deutlich nachgewiesen werden konnte, fällt die Verminderung an der Plasmamembran in der Durchflusszytometrie etwas geringer aus. In der Durchflusszytometrie bestätigt sich die erfolgreiche – wenn auch nicht sehr potente – Herunterregulation von TRAIL-R4. Der TRAIL-R1-Nachweis fehlt hier leider. Die Suppression eines Rezeptors führt zu einer mehr oder weniger starken Erhöhung der anderen Rezeptoren an der Membran. Besonders deutlich zeigt sich analog zu PancTu-I die Erhöhung von TRAIL-R2 an der Plasmamembran, wenn TRAIL-R1 oder TRAIL-R4 herunterreguliert werden (Abb. 19).

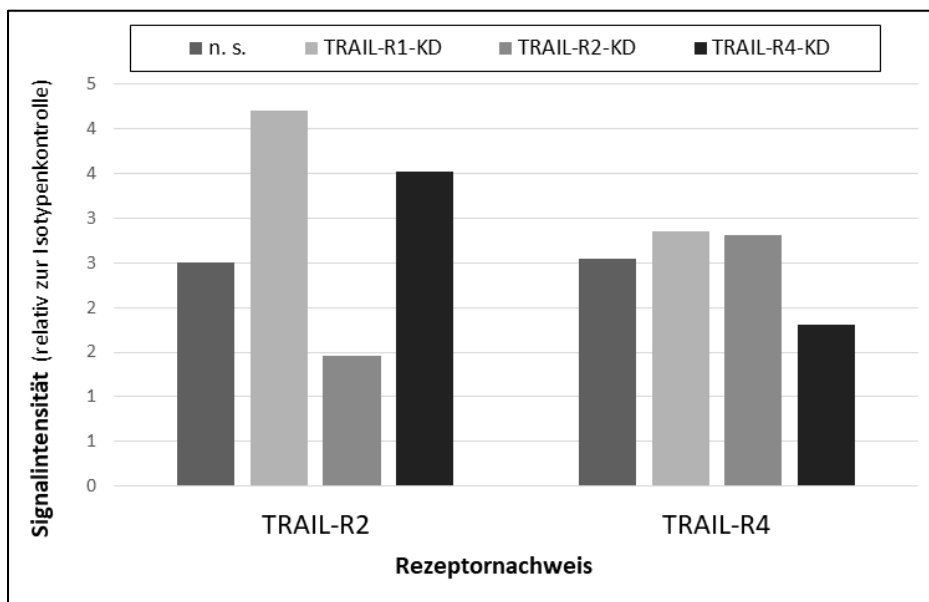


Abbildung 19: Colo357-Durchflusszytometrie mit Färbung der TRAIL-Rezeptoren 2 und 4 bei Knockdown der Rezeptoren 1, 2 und 4

Das Säulendiagramm zeigt die TRAIL-Rezeptor-Expression in den verschiedenen Zellklonen. Es stellt die Signalintensität der membrangebundenen TRAIL-Rezeptoren in Relation zur Intensität der Isotypkontrolle dar – und zwar bei Knockdown (KD) von TRAIL-R1 (R1), TRAIL-R2 (R2) oder TRAIL-R4 (R4) sowie ohne KD (n.s.). Die TRAIL-R1-Färbung fehlt.

n. s. = *non-silencing*; KD = *Knockdown*

Die Ergebnisse aus Western Blot und Durchflusszytometrie für Colo357-Zellen wurden in Abbildung 20 zur besseren Übersicht zusammengefasst.

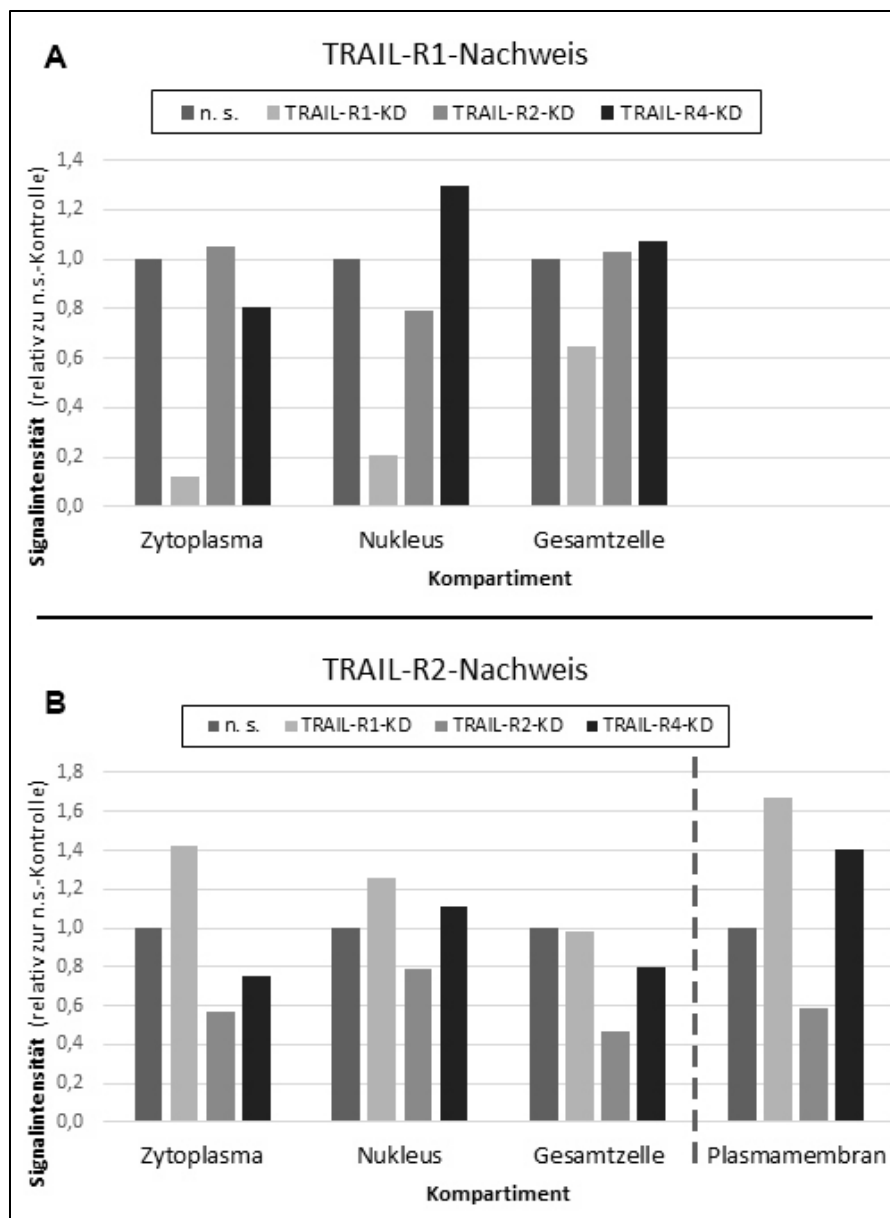


Abbildung 20: Veränderungen der subzellulären TRAIL-R1/R2-Präsenz in Colo357-Zellen bei Knockdown der TRAIL-Rezeptoren (Zusammenfassung)

Die Western-Blot-Ergebnisse aus Abbildung 18 wurden quantifiziert und gemeinsam mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (Abb. 19) dargestellt. Dadurch gewinnt man einen Überblick über die Expression von TRAIL R1 (**A**) bzw. TRAIL-R2 (**B**) in den verschiedenen Zellkompartimenten (Zytoplasma, Zellkern, Gesamtzelllysate, Plasmamembran) bei Herunterregulation der einzelnen TRAIL-Rezeptoren – jeweils bezogen auf die Kontrolle ohne Herunterregulation (n. s. = *non-silencing*). KD = *Knockdown*

4 Diskussion

Das Pankreasadenokarzinom ist in Deutschland neben dem Mesotheliom der Tumor mit der schlechtesten Prognose (GEKID, 2019). Eine kurative Therapie ist einzig durch vollständige chirurgische Entfernung des Tumors möglich. Nach R0-Resektion wird eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU/Folinsäure empfohlen. Bei Metastasen oder fortgeschrittenem Karzinom erfolgt eine palliative Chemotherapie. Die Radiotherapie spielt beim PDAC eine untergeordnete Rolle. Auch nach erfolgreicher R0-Resektion und adjuvanter Chemotherapie liegt das 5-Jahresüberleben bei nur 20 % (AWMF, 2013). Aus diesem Grund sind neue Therapiestrategien dringend erforderlich. TRAIL kommt als potenzielles Krebstherapeutikum in Frage. Lokalisiert an der Zellmembran, können TRAIL-Rezeptoren nach Ligandenbindung bei Tumorzellen selektiv den programmierten Zelltod auslösen. Der Durchbruch TRAIL-unterstützter Krebstherapie scheiterte bisher u. a. am Auftreten von TRAIL-Resistenzen. Zudem können TRAIL-Rezeptoren über non-apoptotische Signalwege teils tumorfördernd wirken (De Miguel et al., 2016). TRAIL-Rezeptoren finden sich in Tumorzellen sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zytosol, an ER und Golgi-Apparat, im Zellkern sowie in Autophagosomen und Lysosomen (Akazawa et al., 2009; Di et al., 2013; Haselmann et al., 2014). Insbesondere intrazellulär lokalisierte TRAIL-Rezeptoren sind häufig mit einer schlechten Prognose verknüpft. Über die Bedeutung und Regulierung der subzellulären Verteilung gibt es bisher nur wenige Kenntnisse. Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren zu untersuchen, die einen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren haben oder an ihrem Transport beteiligt sein könnten. Von besonderem Interesse war dabei die Herkunft der nukleären TRAIL-Rezeptoren.

Bei diversen Zelllinien findet eine ligandenabhängige Internalisierung der TRAIL-Rezeptoren statt (Kohlhaas et al., 2007; Zhang et al., 2009). Diese Umverteilung nach intrazellulär könnte von klinischer Relevanz sein, da auf diese Weise eine Apoptose-Resistenz induziert werden kann (Yoshida et al., 2009). Von Membranrezeptoren aus der EGFR-Familie ist bekannt, dass eine Ligandenbindung bei ihnen sogar zur Translokation bis zum Zellkern führen kann (Carpenter & Liao, 2009).

Um den Einfluss von TRAIL auf die Verteilung der TRAIL-Rezeptoren beim PDAC zu eruieren, wurden die Zellen mit subtoxischen Dosen TRAIL behandelt und die Verteilung der Rezeptoren in der Zelle betrachtet. TRAIL-R1 und -R2 sind bereits nach einer Stunde vermehrt im Zellkern lokalisiert. Die Menge im Gesamtzelllysat ist dabei nicht erhöht, sodass die erhöhte nukleäre Menge nicht auf eine gesteigerte Genexpression, sondern eine Verlagerung in den Kern zurückzuführen ist. Die Menge im Zytoplasma ist nicht vermindert. Dies weist bereits darauf hin, dass die vermehrten nukleären Rezeptoren von der Plasmamembran stammen, die im Versuch jedoch nicht getrennt betrachtet wurde. Eine Verminderung der Rezeptoren an der Zelloberfläche nach TRAIL-Stimulation sollte deshalb mittels Durchflusszytometrie

bestätigt werden. Die nukleäre Akkumulation der Rezeptoren nach TRAIL-Stimulation ist nach drei oder mehr Stunden nicht mehr nachweisbar. Zum einen verdeutlicht dies die Rapidität des Transportprozesses zum Zellkern, zum anderen eine Reversibilität der Verlagerung trotz fortgeführter Stimulation.

Die Inhibition des endogenen TRAILs über anti-TRAIL Antikörper konnte nach 48 Stunden keinen signifikanten Einfluss auf die subzelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren zeigen.

Für den EGF-Rezeptor ist eine Translokation von der Plasmamembran zum Zellkern beschrieben, wo er als Transkriptionsfaktor dient. Für Oberflächenrezeptoren mit derartigem Orts- und Funktionswechsel innerhalb der Zelle wurde der Begriff „Membranrezeptoren im Nukleus“ (MRIN) vorgeschlagen (Carpenter & Liao, 2009; Wang & Hung, 2009, 2012). Die Herkunft nukleärer TRAIL-Todesrezeptoren war bislang unklar. Zur Klärung sollte in der vorliegenden Arbeit der Biotinylierungsversuch dienen, indem durch Markierung der an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren ihr möglicher Transport gen intrazellulär nachvollzogen wird. In der Tat ließ sich biotinylierter TRAIL-R1 nach vier Stunden nicht nur im Gesamtzelllysat, sondern auch im Zytoplasma und in geringerer Menge sogar im Kern nachweisen, womit eine Herkunft nukleärer TRAIL-Rezeptoren von der Plasmamembran erstmals gezeigt werden konnte (Abb. 6 und 7). TRAIL-R1 wird also offensichtlich von der Membran zum Kern transportiert. Reis et al. (2017) berichten, dass TRAIL-Stimulation die Dyn-1-abhängige Endozytose der TRAIL-Rezeptoren bewirkt (Reis et al., 2017). Im Rahmen des Biotin-Versuches fand keine Stimulation mit TRAIL statt. Dennoch konnte eine Translokation von TRAIL-R1 von der Plasmamembran zum Zellkern nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass entweder ein ligandenunabhängiger, kontinuierlicher Fluss der TRAIL-Rezeptoren von der Oberfläche zum Zellkern besteht, oder aber, dass die Menge des endogenen TRAILs zur Induktion der Endozytose ausreicht.

Der Nachweis einer Translokation von TRAIL-R2 zum Kern gestaltete sich schwierig. Bei Panc-1- und Colo357-Zellen zeigten sich intrazellulär in den biotinylierten Ansätzen zwar zusätzliche Banden bei 55–60 kDa (Abb. 8 und 9). Die TRAIL-R2-Banden liegen normalerweise jedoch bei ca. 40 und 48 kDa. Einerseits könnte es sich also um unspezifische Banden handeln, wobei sich die Frage stellt, warum diese Banden nur im biotinylierten Versuchsansatz und nicht im unmarkierten Kontrollansatz auftreten. Andererseits könnten die Banden möglicherweise TRAIL-R2 darstellen, der modifiziert wurde oder intrazellulär mit anderen Molekülen stabile Komplexe eingegangen ist und deshalb im Western Blot auf einer anderen Höhe nachgewiesen wird. Der sogenannte Durchfluss stellt im Biotinylierungsversuch den Rest der Probe dar, der nicht isoliert wurde. Der Durchfluss entspricht quasi einem „Negativbild“ des Eluats, denn was mit dem Eluat isoliert wurde, ist im Durchfluss nicht mehr vorhanden. Interessanterweise ist TRAIL-R2 in der biotinylierten Kernfraktion des Durchflusses schwächer nachweisbar als in der entsprechenden unbiotinylierten Kontrolle

(Abb. 8). Dies könnte indirekt zeigen, dass sich biotinylierter TRAIL-R2 in der Kernfraktion befunden hatte, der mittels Avidin eliminiert wurde. Da beim Biotinylierungsversuch aus methodischen Gründen keine Proteinbestimmung und somit keine Angleichung der aufgetragenen Proteinmengen erfolgte, ist bei solchen Vergleichen jedoch Vorsicht geboten. Bei PancTu-I-Zellen konnten im biotinylierten Versuchsansatz vier Stunden nach Markierung schwache charakteristische TRAIL-R2-Banden im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen werden, was auf eine Internalisierung von TRAIL-R2 mit konsekutivem Transport zum Zellkern hinweist (Abb. 10). In weiterführenden Versuchen der Arbeitsgruppe konnte eine schnelle Translokation von TRAIL-R2 zum Zellkern bestätigt werden (s. u.). Möglicherweise befindet sich TRAIL-R2 nach der Internalisierung nur vorübergehend im Zellkern und verlässt den Zellkern bspw. über CRM1 wieder.

Im Biotin-Versuch überstrahlt das Gesamtzelllysate teils die anderen Banden. Im Falle einer erneuten Durchführung des Versuches sollten die Proben des Gesamtzelllysats verdünnt werden, um eine Überbelichtung zu verhindern. Lamin A/C und α -Tubulin dienten beim Biotinylierungsversuch als Kontrolle für eine erfolgreiche Kern-/Zytoplasma-Fraktionierung sowie für eine gleichmäßige Beladung der Taschen der jeweiligen Fraktion. Erwartungsgemäß konnte im Zytoplasma Tubulin, im Kern Lamin und im Gesamtzelllysate beides nachgewiesen werden. Unerwarteterweise scheinen Lamin und Tubulin unspezifisch an das Avidin zu binden, da sie auch in den Eluat nachzuweisen sind. Dies tritt sowohl bei den markierten als auch bei den Kontrolllysaten auf. Um eine Verunreinigung der Kern- und Zytoplasma-Lysate durch Plasmamembran sicher ausschließen zu können, sollte bei weiterführenden Versuchen zusätzlich ein Oberflächenmarker zur Fraktionierungskontrolle verwendet werden.

Bezogen auf den Kernimport der TRAIL-Rezeptoren wurde seinerzeit Importin $\beta 1$ als verantwortliches Karyopherin – zumindest für TRAIL-R2 – identifiziert (Kojima et al., 2011). Im Rahmen der aktuell durchgeführten TRAIL-Stimulation zeigte sich, dass erhöhte nukleäre Mengen der TRAIL-Rezeptoren nach kurzer Zeit wieder abfallen (Abb. 3). Dies könnte über einen aktiven Kernexport erfolgen. Bei TRAIL-Rezeptoren gibt es Hinweise auf potenzielle nukleäre Exportsignale (NES) und damit auf einen CRM1-vermittelten Kernexport (Zhang et al., 2000; Anhang). Tatsächlich konnte via Immunpräzipitation eine Interaktion von TRAIL-R2 mit dem Kernexportprotein CRM1 nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12). Unter Zugabe von RNase verstärkte sich die Interaktion zwischen CRM1 und TRAIL-R2, was zeigt, dass die Bindung nicht RNA-vermittelt ist. Im Gegenteil scheint RNA Bindungsstellen zu blockieren. Die Hemmung von CRM1 führt in Panc89-Zellen zu erhöhten Mengen der TRAIL-Rezeptoren im Zellkern und zugleich zu einer Verminderung im Zytoplasma. Dies ist damit zu erklären, dass die TRAIL-Rezeptoren aufgrund der Hemmung von CRM1 nicht mehr aus dem Kern geschleust werden und dort akkumulieren. Bemerkenswerterweise reichert sich neben TRAIL-R2 auch TRAIL-R1 im Zellkern an, obwohl mittels Immunpräzipitation keine Assoziation

zwischen TRAIL-R1 und CRM1 nachgewiesen werden konnte (Abb. 12 und 13). Letzteres könnte auf indirekte Einflüsse zurückzuführen sein. So besteht die Möglichkeit, dass eine direkte Interaktion aus methodischen Gründen nicht nachgewiesen werden konnte, z. B. weil die Bindung des TRAIL-R1-Antikörpers sterisch verhindert wird oder weil die Interaktion zwischen CRM1 und TRAIL-R1 schwächer und instabiler ist. Zusammenfassend zeigen die Versuche einen möglichen Kernexport von TRAIL-Rezeptoren durch CRM1. Ungeklärt ist, ob dieser Export in relevanter Menge geschieht und wie sich dies auf die Prognose von PDAC-Patienten auswirkt. Da nukleär lokalisierte TRAIL-Rezeptoren tumorfördernd wirken können, wäre es vorstellbar, dass einige Tumorzellen den Export der TRAIL-Rezeptoren selbst hemmen und so die Menge an TRAIL-Rezeptoren im Kern erhöhen. Demnach müsste eine Inhibition von CRM1 über die Akkumulation der Rezeptoren im Zellkern das Outcome der Patienten verschlechtern. In der Realität jedoch ist CRM1 bei Pankreastumoren erhöht und dann mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Analog dazu führt eine experimentelle Hemmung von CRM1 zu einer Sensitivierung gegenüber Zytostatika. Denn durch die ubiquitäre Beteiligung von CRM1 am Kernexport vieler Proteine betrifft eine Hemmung des Karyopherins u. a. auch Onkogene, die so nicht mehr den Ort ihres Wirkens erreichen, sowie Tumorsuppressoren wie p53, die dann im Kern vermehrt für die Hemmung von Wachstum zu Verfügung stehen (Turner et al., 2014; Lu et al., 2015). Ein Ausschalten von CRM1 durch Tumorzellen brächte also andere, antiproliferative Folgen mit sich. Die Beeinflussung der Verteilung der TRAIL-Rezeptoren spielt sich vermutlich auf einer anderen Ebene ab als über direkte Regulation von CRM1, wie z. B. durch Veränderungen am nukleären Exportsignal der TRAIL-Rezeptoren oder vermehrten Kern-Import.

Ein Aspekt der Dissertation widmete sich der gegenseitigen Beeinflussung der TRAIL-Rezeptoren auf ihre Expression und Lokalisation. Die Immunpräzipitations-Ergebnisse weisen auf eine Interaktion zwischen TRAIL-R1 und -R2 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus hin (Abb. 11 und 12). Darüber hinaus führt die Herunterregulation von TRAIL-R1 zu einem deutlichen Anstieg von TRAIL-R2 an der Plasmamembran und im Kern. Auch in der Gesamtzelle kommt es zu einem leichten Anstieg. Interessanterweise bleibt die Menge von TRAIL-R2 im Zytoplasma dabei weitgehend unberührt. Auf ähnliche Weise führt die Suppression von TRAIL-R4 zu einer erhöhten Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 an Zelloberfläche und im Kern, ohne Einfluss auf die zytoplasmatische Präsenz zu haben. Der *Knockdown* von TRAIL-R2 hat hingegen fast keinen Einfluss auf die Verteilung und Expression von TRAIL-R1 (Abb. 14–20). Über die Gründe dieser Zusammenhänge kann bisher nur spekuliert werden. Es könnte sich um kompensatorische Erhöhungen der Rezeptoren bei Runterregulation der übrigen handeln. Dies erklärte aber nicht die Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren und wieso sich die Veränderungen im Zytoplasma deutlich geringer darstellen. Vielleicht kommt es gerade an denjenigen Lokalisationen zu einer Kompensation

durch andere Rezeptoren, an denen die Expression von TRAIL-Rezeptoren essenziell ist – folglich an der Zellmembran zur Ausübung der Apoptose-Induktion und im Zellkern zur Wahrnehmung nukleärer Aufgaben. Die Rezeptoren weisen hohe strukturelle Homologien auf, sodass sie wahrscheinlich auch gemeinsame Bindungspartner aufweisen. In der aktuellen Publikation der AG Trauzold konnte durch Konfokalmikroskopie bestätigt werden, dass TRAIL-R1 und -R2 in PDAC-Zellen sowohl an Plasmamembran, im Zytoplasma als auch im Zellkern co-lokalisiert auftreten. Der ligandenabhängige Transport von TRAIL-R2 von der Zelloberfläche zum Zellkern wird bei Runterregulation von TRAIL-R1 verstärkt (Mert et al., 2019). Dies könnte auf gemeinsame Regulations- und Transport-Mechanismen für die Verteilung der beiden Todesrezeptoren hinweisen. Zudem könnten sie auch gemeinsame Funktionen im Zellkern wahrnehmen. Möglicherweise werden bei Wegfall eines Rezeptors Transportkapazitäten für die anderen Rezeptoren frei. TRAIL-R2 könnte durch TRAIL-R1 und -R4 im Zytoplasma gehalten werden, bspw. durch Verdecken einer Transportdomäne oder durch Competition um ein Transport-Protein. Bei Suppression der Rezeptoren könnte es zu einem vermehrten Fluss von TRAIL-R2 zu Plasmamembran und Nukleus kommen.

Die Erhöhung eines TRAIL-Rezeptors im Zellkern und an der Plasmamembran ohne nennenswerte Änderung in Zytoplasma und Gesamtzelle könnte darauf hinweisen, dass der Rezeptor aus anderen, hier nicht explizit untersuchten Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat oder dem ER akquiriert wurde. Die Menge von TRAIL-Rezeptoren an der Plasmamembran kann zudem über *Ectodomain-Shedding* vermindert und über eine Hemmung des *Sheddings* wiederhergestellt werden (Kagawa et al., 2012). Möglicherweise resultiert die Erhöhung an der Plasmamembran aus einem inhibierten *Shedding*. Dies könnte aufgrund des Ursprungs der nukleären Rezeptoren von der Plasmamembran sekundär zu vermehrtem Rezeptor im Zellkern führen.

Im Rahmen der Western Blot Experimente zeigten sich für TRAIL-R2 mehrere Banden. Die Banden bei ca. 40 und 48 kDa stellen die beiden bekannten Isoformen TRAIL-R2(S) und TRAIL-R2(L) dar. TRAIL-R2(L) wird im Vergleich zu TRAIL-R2(S) vermehrt durch TRAIL-FLAG-Fc präzipitiert (Abb. 11). Dies könnte auf eine höhere Affinität zum Liganden durch die lange Isoform hinweisen. Während sich nach Immunpräzipitation von TRAIL-R2 die zwei klassischen Banden nachweisen ließen, stellte sich TRAIL-R2 bei Co-Präzipitation mit TRAIL-R1 auf einer Höhe von ca. 45 kDa dar (Abb. 11). Am ehesten hängt dies mit sterischen Behinderungen bei der Antikörper-Bindung zusammen. In einigen Versuchen zeigten sich weitere TRAIL-R2-Banden im Bereich von ca. 32 und 34 kDa. Obgleich zusätzliche Banden dieser Größenordnung in der Literatur beschrieben sind, ist ihre Relevanz unklar. Es könnte sich dabei um nicht-glykosylierte Formen handeln (Lemke et al., 2010). Dass die Signale tatsächlich TRAIL-R2 zuzuordnen sind und keine unspezifischen Banden darstellen, zeigt ihre erfolgreiche Suppression bei TRAIL-R2-Knockdown (Abb. 14 und 18B). Bei PancTu-I-Zellen

überwiegt in der Gesamtzelle mengenmäßig TRAIL-R2(S). Im Zytoplasma kommt TRAIL-R2(L) fast überhaupt nicht vor. Die zusätzliche TRAIL-R2-Bande bei 32 kDa tritt vor allem im Zellkern auf. Bei Knockdown von TRAIL-R1 und TRAIL-R4 steigt sie im Vergleich zu den anderen Banden am stärksten an (Abb. 14). Auch bei Panc89-Zellen scheint TRAIL-R2(S) in der Gesamtzelle vorherrschend zu sein. In Zytoplasma und Nukleus überwiegen mengenmäßig schneller wandernde Formen von ca. 30 und 34 kDa. Diese akkumulieren bei einer CRM1-Hemmung vermehrt im Zellkern (Abb. 13B). Dies könnte darauf hinweisen, dass die kleineren TRAIL-R2-Formen eine größere funktionelle Bedeutung im Zellinneren besitzen als die „klassischen“ Isoformen. Vice versa scheint TRAIL-R2(L) im Zellinneren eine geringe Rolle zuzukommen. TRAIL-R1 weist ebenfalls eine zusätzliche Bande bei ca. 34 kDa auf, die nukleär – relativ gesehen – am stärksten sichtbar ist (Abb. 3 und 18A). Möglicherweise stellen die schnell wandernden TRAIL-R-Isoformen lösliche Fragmente im Zytoplasma und Nukleoplasma dar. Dies würde erklären, warum diese Formen nicht immunpräzipitiert werden konnten, da das entsprechende Epitop fehlt. Über welchen Mechanismus membranständige TRAIL-Rezeptoren in eine lösliche Form gelangen könnten, ist offen. Einige Transmembranproteine wie z. B. Notch werden proteolytisch prozessiert, indem zunächst eine Ektodomäne abgespalten wird und im zweiten Schritt die Abspaltung einer intrazellulären Domäne (ICD) erfolgt. Dieses Fragment kann in den Zellkern wandern und dort die Transkription beeinflussen (Bray, 2006; Carpenter & Liao, 2009). Die Überführung von Transmembranproteinen in eine lösliche, zytosolische Form ist zudem aus dem Abbau ubiquitinerter ER-Proteinen im Rahmen der sog. ERAD (*ER-associated degradation*) bekannt. Dabei kommt es durch eine „Retrotranslokation“ zu einer Überführung der Proteine ins Zytosol, wo im Proteasom die Degradation erfolgt (Christianson & Ye, 2014). Es wurde beschrieben, dass TRAIL-R1 und -R2 ubiquitiniert und teils proteasomal abgebaut werden (Song et al., 2010). Nukleäre, lösliche TRAIL-Rezeptoren könnten einerseits aus dem Pool freier zytosolischer Rezeptoren stammen und durch Importin $\beta 1$ in den Kern gelangen (vgl. Kojima et al., 2011). Andererseits könnten sie von der inneren Kernmembran aus ins Nukleoplasma translozieren, so wie es beim EGF-Rezeptor mittels des Proteins Sec61 β erfolgt (Wang et al., 2010).

Seit Fertigstellung der in dieser Dissertation erläuterten Versuche sind in der Arbeitsgruppe von Prof. Anna Trauzold weitere Erkenntnisse zu dem Thema erlangt worden, die nicht unerwähnt bleiben sollen. So erfolgten erneute TRAIL-Stimulationen in engerer Zeitkinetik, um den zeitlichen Verlauf genauer zu betrachten. Bereits nach 30 Minuten kommt es zu einer deutlichen Rezeptor-Akkumulation im Zellkern. Die nukleäre Akkumulation der Biotinmarkierten TRAIL-Rezeptoren wurde in der vorliegenden Arbeit stets nach einer vierstündigen Inkubationszeit untersucht. Die Arbeitsgruppe von Prof. Trauzold führte Biotinylierungsversuche mit unterschiedlicher Inkubationszeit durch. Hierbei kam eine optimierte Methode der Isolierung markierter Proteine unter Verwendung magnetischer *Beads* zur Anwendung.

TRAIL-R1 und auch -R2 können bereits nach kurzer Zeit im Zellkern nachgewiesen werden – auch ohne TRAIL-Stimulation. Interessanterweise zeigen sich bereits nach „0 min“ – also unmittelbar nach Erstellung der Lysate – geringe Mengen markierter TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 im Zellkern, was auf einen sehr schnellen Transport von der Membran zum Zellkern schließen lässt. Im Zeitverlauf steigt die Menge der nukleären Rezeptoren an, mit einem klaren Anstieg zwischen 15 und 30 min. Die Stimulation mit TRAIL verstärkt die Translokation deutlich, wobei eine höhere Dosis (100 ng vs. 20 ng) einen stärkeren Effekt aufweist. Eine Stimulation mit den agonistischen Antikörpern Mapatumumab (für TRAIL-R1) bzw. Lexatumumab (für TRAIL-R2) statt mit TRAIL führt zur nukleären Translokation des jeweils stimulierten Rezeptors (Mert et al., 2019). Die 48-stündige Behandlung mit anti-TRAIL hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren gezeigt. In der Kenntnis, dass der Effekt von TRAIL auf die Rezeptor-Endozytose schon nach ca. einer Stunde am stärksten ist, wurde die Behandlungsdauer von anti-TRAIL durch die AG Trauzold von 48 h auf 1 h gesenkt. Die einstündige Hemmung des endogenen TRAILs führt zu einer verminderten intrazellulären Akkumulation der TRAIL-Todesrezeptoren. Dies zeigt, dass auto- oder parakrin wirkendes TRAIL die Endozytose der TRAIL-Rezeptoren begünstigen kann (Mert et al., 2019). Tumoren könnten sich diesen Mechanismus zunutze machen, indem tumorassoziierte Zellen oder die Tumorzellen selbst über TRAIL-Stimulation die Endozytose der TRAIL-Rezeptoren einleiten und damit die Apoptose-Induktion außer Kraft setzen (Yoshida et al., 2009; Bertsch et al., 2014). Tatsächlich wurde eine tumorfördernde Wirkung des endogenen TRAILs festgestellt, so auch bei KRAS-mutierten, TRAIL-resistenten PDAC-Zellen (Brittingham, 2011; von Karstedt et al., 2015).

In weiteren Versuchen konnten zudem Erkenntnisse über die Internalisierung der TRAIL-Rezeptoren gewonnen werden. Während die Hemmung Clathrin-unabhängiger Endozytosewege die nukleäre Translokation nur geringfügig vermindert, führt die Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose zu einer deutlichen Reduzierung der nukleären TRAIL-Rezeptoren 1 und 2. Dies zeigt, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose für die nukleäre Translokation hauptverantwortlich ist. Auch unter Hemmung der Apoptose kommt es nach Ligandenbindung zur nukleären Verschiebung der TRAIL-Todesrezeptoren. Demnach scheinen Apoptose-induktion und Translokation zwei voneinander unabhängige Mechanismen zu sein. Bemerkenswerterweise kann auch der Ligand TRAIL im Zellkern nachgewiesen werden. Er entspricht in seiner Molekülgröße der endogen sezernierten, löslichen Form und scheint von der Zelloberfläche zu stammen. Auch rekombinantes TRAIL findet sich eine Stunde nach Stimulation dosisabhängig im Zellkern. Je höher die Menge des rekombinanten TRAILs im Zellkern, desto niedriger ist die Menge des endogenen TRAILs. Dies weist auf sättigbare Transportmechanismen hin. Vermutlich gelangt der Ligand im Komplex mit seinen Rezeptoren zum Zellkern und die beiden TRAIL-Formen konkurrieren um die Bindungsstellen. Im

Zytoplasma und im Zellkern liegen die TRAIL-Rezeptoren co-lokalisiert mit dem Liganden vor. Im Zellkern sind die TRAIL-Todesrezeptoren sowohl in löslicher Fraktion als auch am Chromatin verortet. Letzteres könnte möglicherweise auf einen Einfluss von TRAIL-Rezeptoren auf die Genexpression hindeuten (Haselmann et al., 2014; Mert et al., 2019).

Mehrmalige Applikation subtoxischer rTRAIL-Dosen kann zur Entwicklung einer TRAIL-Resistenz führen. Dabei finden sich die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 vermindert an der Zelloberfläche (Yoshida et al., 2009). Die AG Trauzold konnte bestätigen, dass TRAIL die schnelle Translokation der Rezeptoren zum Zellkern initiiert. Bei persistierender TRAIL-Stimulation sinkt die Menge der nukleären TRAIL-Rezeptoren jedoch wieder (vgl. Abb. 3). Entweder ist die nukleäre Translokation zeitlich begrenzt oder es kommt im Verlauf zu einem vermehrten Export der TRAIL-Rezeptoren aus dem Kern. Eine Beteiligung von CRM1 am Kernexport der TRAIL-Rezeptoren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Passend dazu zeigte die AG Trauzold, dass eine Mutation im Bereich einer vermeintlichen NES von TRAIL-R2 zur Anhäufung des Rezeptors im Zellkern führt (Mert et al., 2019).

Über die Funktion intrazellulärer TRAIL-Rezeptoren ist bisher nur wenig bekannt. Eine Translokation nach intrazellulär könnte neben der verminderten Apoptose-Sensitivität auch zur Wahrnehmung anderweitiger Funktionen der Rezeptoren innerhalb der Zelle führen. Untersuchungen mit Zellen nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome (NSCLC) zeigen, dass die im Epithel basal liegenden und somit undifferenzierten Zellen eine höhere Expression von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 aufweisen als die suprabasalen, stärker differenzierten Zellen. TRAIL-R1 und -R2 befinden sich bei den Tumorzellen vor allem intrazellulär, während sie in normalem Lungenepithel an der apikalen Plasmamembran lokalisiert sind (Spierings et al., 2003). Neuronale Progenitorzellen weisen eine deutlich erhöhte TRAIL-R2-Expression auf, vorzugsweise in den Zellorganellen und im Zellkern. Auch bei intestinalen Stammzellen findet sich eine hohe Expression intrazellulären TRAIL-Rezeptors 2 (Niu et al., 2012). TRAIL-R2 – vor allem intranukleär – ist bei PDAC-Patienten mit einer schlechten Prognose assoziiert. Bisher wurde nur eine spezifische nukleäre Funktion der TRAIL-Rezeptoren beschrieben. So hemmt nTRAIL-R2 die Reifung von let7-mikroRNA und fördert damit die Tumorprogression (Haselmann et al., 2014). Die Assoziation mit Chromatin deutet möglicherweise auf die Existenz weiterer Funktionen im Zellkern hin (Mert et al., 2019).

Es gibt auch Beispiele, bei denen die intrazelluläre Expression von TRAIL-Rezeptoren mit einer positiven Prognose einhergeht (Bertsch et al., 2014). Eine hohe Menge zytoplasmatischen TRAIL-R1 führt beim Adenokarzinom des Pankreas zu einem längeren Überleben (Gundlach et al., 2018). Über die prognostische Bedeutung zytoplasmatischen TRAIL-R2s herrscht hingegen Unklarheit. Einerseits scheint eine hohe Menge beim PDAC das Überleben zu verbessern, andererseits korreliert zytoplasmatischer TRAIL-R2 positiv mit Lymphgefäßinvasion (Annewanter, 2014). Bei persistierendem ER-Stress vermittelt

zytoplasmatischer TRAIL-R2 ligandenunabhängig die Einleitung der Apoptose (Lu et al., 2014; Lam et al., 2020). Auch TRAIL-R1 scheint diese Funktion innezuhaben (Dufour et al., 2017). Bemerkenswerterweise sind zytoplasmatisch lokalisierte TRAIL-Todesrezeptoren nicht nur Bestandteile intrazellulärer Membranen z.B. des ER oder des Golgi-Apparates, sondern kommen auch in der löslichen zytosolischen Fraktion vor (Haselmann et al., 2014).

Neben den TRAIL-Rezeptoren finden sich weitere Proteine des extrinsischen Apoptoseweges im Zellkern, wie z.B. Caspase 8 und das Adapterprotein FADD (Benchoua et al., 2002; Gómez-Angelats & Cidlowski, 2003). FADD interagiert im Zellkern mit MBD4, einem Regulator der Apoptose (Screaton et al., 2003). Inwieweit ein Zusammenhang mit nukleären TRAIL-Rezeptoren besteht, bleibt offen. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die Zusammenhänge und die Funktionen der Rezeptoren in der Zelle zu verstehen.

Neben einer gesteigerten Endozytose gibt es weitere Erklärungsansätze, wie es zu einer subzellulären Umverteilung der TRAIL-Rezeptoren kommen könnte. Ein insuffizienter Transport zur Plasmamembran könnte zur verminderten TRAIL-Rezeptor-Expression an der Oberfläche führen. So führt die Transfektion mit TRAIL-R1 bei einigen TRAIL-resistenten Zellen nicht zum Anstieg des Rezeptors an der Zelloberfläche, was mit einer fehlerhaften Sortierungsmaschinerie erklärt werden kann (Jin et al., 2004; Zhang & Zhang, 2008). Das am ER-Import beteiligte Protein SRP wurde als Bestandteil des Transportes von TRAIL-R1 zur Plasmamembran identifiziert (Ren et al., 2004). Die Ligase MARCH-8 (*E3 ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH*) kann über Ubiquitinierung die TRAIL-R1-Präsenz an der Zelloberfläche und daraus folgend die TRAIL-Sensitivität vermindern (Van De Kooij et al., 2013). Analog kann das Adapterprotein c-Cbl nach der ligandenabhängigen Internalisierung der TRAIL-Todesrezeptoren über eine Ubiquitinierung die Degradation der Rezeptoren bewirken. Dies führt rasch zur Entwicklung einer (reversiblen) TRAIL-Resistenz (Song et al., 2010). Die bei TRAIL-R2 im Vergleich zu TRAIL-R1 deutlich verlängerte mRNA-Sequenz (4154 vs. 1764 Nukleotide), v. a. im Bereich der 3'-UTR, zeigt, dass TRAIL-R2 komplexeren posttranskriptionellen Regulationsmechanismen unterliegt als TRAIL-R1. Vor allem mikroRNA und RNA-bindende Proteine könnten hier eine wichtige Rolle spielen (Mert & Sanlioglu, 2016). Bei PDAC-Zellen wurde eine Selbstregulation im Sinne eines negativen Feedbacks beschrieben. Eine Stimulation des TRAIL-R2 über das RNA-bindende Protein HuR (*human antigen R*) führt zu einer verminderten Translation des Rezeptors. Passend dazu erhöht die Hemmung von HuR die Expression von TRAIL-R2 an der Plasmamembran sowie das Ansprechen auf TRAIL (Pineda et al., 2012). Das Ausmaß der O-Glykosylierung der TRAIL-Todesrezeptoren hat keinen Einfluss auf die Expression an der Zelloberfläche (Wagner et al., 2007). Das Proto-Onkogen H-Ras vermindert bei einigen Tumorentitäten die Expression der TRAIL-Rezeptoren an der Oberfläche und induziert eine TRAIL-Resistenz (Chen et al., 2014). Die unterliegenden Mechanismen und die Bedeutung für PDAC-Zellen sind noch unklar.

Die medikamentöse Verlagerung der TRAIL-Todesrezeptoren an die Zelloberfläche stellt eine neue mögliche Therapieoption dar, um TRAIL-resistente Zellen zu sensitivieren. So führt die Hemmung von H-Ras zu einer gesteigerten Expression der TRAIL-Rezeptoren an der Membran und zu einer wiederhergestellten Sensitivität gegenüber TRAIL und agonistischen Antikörpern (Chen et al., 2014). In plazentaren Trophoblast-Zellen befindet sich TRAIL-R2 hauptsächlich in den Zellkernen und die Zellen sind TRAIL-resistent. TNF- α -Behandlung führt zur Relokalisierung an die Zelloberfläche und steigert die TRAIL-Empfindlichkeit (Bai et al., 2009). Analog re-sensitiviert die Behandlung mit TNF- α und IL-1 β Thyreozyten für TRAIL-induzierte Apoptose, wobei TRAIL-R2 ebenso vom Zellinneren an die Plasmamembran transloziert. Umgekehrt wirkt IFN- γ protektiv, indem es den Rezeptor von der Oberfläche entfernt (Bretz et al., 2002). Möglicherweise könnten Calcineurininhibitoren als therapeutische Kombinationspartner von TRAIL dienen, denn Calcineurin ist an der Dyn-1-abhängigen Endozytose der TRAIL-Rezeptoren beteiligt (Reis et al., 2017). Autophagosomen spielen bei der TRAIL-Resistenz von Brustkrebszellen eine Rolle. Resistente Zellen weisen eine große Menge basaler Autophagosomen auf, in denen sich TRAIL-R1 und -R2 finden, wobei die Expression an der Zelloberfläche vermindert ist. Hemmer der Autophagie lösen die Fehllokalisierung auf und sensitivieren für TRAIL-Therapie (Di et al., 2013). Quercetin und Bufalin erhöhen über die Anreicherung der Rezeptoren in *lipid rafts* die TRAIL-Sensitivität (Psahoulia et al., 2007; Yan et al., 2014).

Die Kombination von TRAIL-Behandlung mit Chemotherapie oder Radiotherapie hat synergistische Effekte und führt teilweise zur Re-Sensitivierung (Shankar & Srivastava, 2004). Ob dies neben erhöhter Expression der Rezeptoren auch durch eine Translokation an die Plasmamembran bedingt ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Bei dem Versuch, eine TRAIL-Resistenz medikamentös aufzuheben, muss immer die Gefahr der simultanen Sensitivierung normaler Zellen beachtet werden (De Miguel et al., 2016). Neben der TRAIL-Rezeptor-Expression an der Zelloberfläche müssen bei allen Überlegungen natürlich immer die übrigen möglichen Resistenzmechanismen berücksichtigt werden.

Die Kenntnisse der Lokalisation der TRAIL-Rezeptoren innerhalb der Tumorzellen könnten nicht nur direkten therapeutischen Zwecken dienen, sondern bei Patienten auch als Indikator für die Prognose dienen (Heilmann et al., 2019). Gegebenenfalls könnte die Verteilung in Zukunft als Biomarker für eine erfolgreiche TRAIL-Therapie fungieren.

In Bezug auf die intrazellulären TRAIL-Rezeptoren gibt es weiterhin viele offene Fragen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRAIL-Rezeptoren von der Plasmamembran zum Zellkern transportiert werden. Offen bleibt, durch welche Proteine dieser Transport vermittelt wird. Während Importin β 1 am Kernimport von TRAIL-R2 beteiligt zu sein scheint, gibt es bei TRAIL-R1 bisher keine Hinweise darauf (Kojima et al., 2011). Eine mögliche Beteiligung der Proteine COPI, Sec61 β oder der Rab-GTPasen am Kerntransport der TRAIL-Rezeptoren

sollte untersucht werden, denn diese Proteine sind bei anderen Rezeptoren an der nukleären Translokation beteiligt (Wang & Hung, 2012). Der EGF-Rezeptor wandert nach ligandenabhängiger Endozytose nicht nur zum Zellkern, sondern auch zu anderen Kompartimenten wie den Mitochondrien (Demory et al., 2009). Über die Lokalisation von TRAIL-Rezeptoren in anderen Zellkompartimenten ist bisher wenig bekannt, sodass hier weitere Untersuchungen nötig sind. Beim NSCLC fanden Leithner et al. signifikant erhöhte nukleäre TRAIL-R2-Werte bei Männern im Vergleich zu Frauen, sodass auch die Rolle des Geschlechtes zu eruieren bleibt (Leithner et al., 2009).

Das Hauptaugenmerk der Versuche zu vorliegender Arbeit lag auf den TRAIL-Todesrezeptoren 1 und 2, da diese die relevanteste intrazelluläre Expression aufweisen (Bertsch et al., 2014). Der Nachweis von intrazellulärem TRAIL-R4 im Western-Blot gestaltete sich mit den verfügbaren Antikörpern schwierig. Die erfolgreiche Herunterregulation von TRAIL-R4 wurde auf PCR-Ebene überprüft (Tawfik et al., 2019) und bildet sich auch in der Durchflusszytometrie ab. Interessanterweise ist TRAIL-R3 bei Colo357-Zellen intrazellulär nachweisbar, wird aber nicht an der Zelloberfläche exprimiert (Lemke et al., 2010). Die Funktion im Zellinneren ist ungeklärt. Da TRAIL-R3 keine intrazelluläre Domäne besitzt, ist die Ausübung komplexer regulatorischer Funktionen innerhalb der Zelle als unwahrscheinlich anzusehen.

Die Rolle des endogenen TRAILs muss weiter untersucht werden. Als Quelle kommen sowohl die Tumorzellen selbst als auch Zellen der Mikroumgebung in Frage, wie u. a. pankreatische Sternzellen. Diese myofibroblastären Stromazellen werden bei chronischer Pankreatitis oder beim Pankreaszellkarzinom aktiviert. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Genese einer Pankreasfibrose und fördern die Entstehung einer tumorfördernden Mikroumgebung. Es wird angenommen, dass sie über parakrine Signale zu einer gesteigerten Chemotherapie- und Apoptose-Resistenz führen. Von ihnen ist bekannt, dass sie TRAIL produzieren können (Hasel et al., 2003; Allam et al., 2017). Möglicherweise führen die Pankreassternzellen über die Sekretion subtoxischer TRAIL-Dosen bei den Tumorzellen zur Endozytose der TRAIL-Rezeptoren und induzieren damit eine TRAIL-Resistenz.

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms erklärt sich durch die frühe Metastasierung sowie durch ausgeprägte Resistenzen gegen Chemo- und Strahlentherapie. Auch nach initial erfolgreicher operativer Entfernung des Tumors kommt es häufig zu Rezidiven. In engem Zusammenhang mit den Pankreassternzellen stehen sogenannte Tumorstammzellen, die seit einigen Jahren im Interesse der Forschung stehen. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung aus. Tumorstammzellen scheinen für die schlechte Prognose des Pankreaszellkarzinoms eine entscheidende Rolle zu spielen, da sie eine konventionelle Radio- und Chemotherapie überstehen können und so ein Rezidiv bedingen können (Li et al., 2007; AWMF, 2013; Hermann & Jr, 2018). Da TRAIL-Rezeptoren in Zellen

mit Stammzellcharakter teils vermehrt intrazellulär exprimiert werden (eigene Untersuchungen der AG Trauzold; Niu et al., 2012), sollten die Tumorstammzellen im Hinblick auf Expression und Verteilung der TRAIL-Rezeptoren näher untersucht werden. Eine Translokation an die Zelloberfläche könnte eine neue Therapiestrategie darstellen, um diese Zellen empfänglich für eine TRAIL-Therapie zu machen.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass sich TRAIL-Rezeptoren bei PDAC-Zellen intrazellulär in kontinuierlichem Fluss befinden. Im Zellinneren kommt es zu Interaktionen zwischen den verschiedenen TRAIL-Rezeptoren. Die Ergebnisse weisen auf eine ligandenabhängige Internalisierung und konsekutiven Transport der TRAIL-Todesrezeptoren zum Zellkern hin. Mit CRM1 wurde ein Kernexportprotein für die TRAIL-Rezeptoren identifiziert. Die Versuche sollten mit anderen Zelllinien und Tumorentitäten wiederholt werden, um die Mechanismen der TRAIL-Rezeptoren-Verteilung zu generalisieren.

5 Zusammenfassung

Das Pankreasadenokarzinom ist nach wie vor eine Krebserkrankung mit infauster Prognose. Das Zytokin TRAIL steht seit einigen Jahren im Interesse der Tumorforschung, da es in der Lage ist, den programmierten Zelltod bei Krebszellen auszulösen und normale Körperzellen zu verschonen. Neben den beiden TRAIL-Todesrezeptoren TRAIL-R1 und -R2 gibt es mit TRAIL-R3 und -R4 zwei Rezeptoren mit antagonistischem Effekt. In klinischen Studien erbrachte eine TRAIL-Therapie bisher nicht den erhofften Benefit. Viele Krebszellen zeigten eine TRAIL-Resistenz, die u. a. durch die Hochregulation anti-apoptotischer Proteine zustande kommen kann. Als weiterer Resistenzmechanismus kommt die Verlagerung der TRAIL-Todesrezeptoren nach intrazellulär in Frage. Intrazelluläre TRAIL-Rezeptoren können sogar eine tumorfördernde Wirkung haben.

Über die Regulierung der subzellulären Rezeptor-Verteilung ist bisher wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktion der TRAIL-Rezeptoren in der Zelle, Einfluss des Liganden TRAIL auf die Verteilung der Rezeptoren, Herkunft nukleärer TRAIL-Rezeptoren und Export der Rezeptoren aus dem Zellkern untersucht.

Bei den untersuchten Zelllinien konnten TRAIL-R1 und -R2 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden. Im Zellinneren traten dabei vermehrt kleinere Formen auf, die Fragmente der ursprünglichen Rezeptoren darstellen könnten. Eine Stimulation mit TRAIL führte nach einer Stunde zu einem vermehrten Nachweis der TRAIL-Todesrezeptoren im Zellkern. Die dabei unveränderte Gesamtmenge der Rezeptoren in der Zelle weist auf eine Translokation zum Zellkern hin. Diese ligandenabhängige Verlagerung scheint nach einiger Zeit reversibel zu sein. Eine Hemmung des endogenen TRAILs konnte in den Versuchen zu dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Verteilung zeigen. Durch Biotin-Markierung konnte erstmals die Herkunft nukleärer TRAIL-Rezeptoren von der Zelloberfläche nachvollzogen werden, wodurch der Transport von der Plasmamembran zum Zellkern bewiesen werden konnte. TRAIL-Rezeptoren stellen somit einen weiteren Vertreter von Membranrezeptoren im Nukleus dar.

Es konnte gezeigt werden, dass TRAIL-R1 und -R2 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus miteinander interagieren. Die TRAIL-Rezeptoren beeinflussen sich gegenseitig. So führt die Herunterregulation von TRAIL-R1 und TRAIL-R4 zu erhöhter Präsenz von TRAIL-R2 im Zellkern und an der Plasmamembran. Es konnte zudem die Beteiligung von CRM1 am Kernexport der TRAIL-Rezeptoren gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die intrazelluläre Lokalisation der TRAIL-Rezeptoren eine größere Bedeutung einnehmen könnte als bisher angenommen. Die ligandenabhängige Verlagerung der TRAIL-Rezeptoren nach intrazellulär könnte einen Mechanismus von Tumorzellen zur Entwicklung einer TRAIL-Resistenz darstellen.

Der Einfluss autokrin von Tumorzellen selbst sowie parakrin aus der Tumor-Mikroumgebung sezernierten TRAILs könnte hier eine zentrale Rolle spielen. Neben der simplen Abwesenheit von der Plasmamembran scheinen TRAIL-Rezeptoren intrazellulär weitere Funktionen zu erfüllen, wie dies exemplarisch für TRAIL-R2 in der Regulation der let-7-miRNA-Reifung bekannt ist. Auch wenn mittlerweile einige Kenntnisse vorhanden sind, bleibt die intrazelluläre Verteilung und Funktion der TRAIL-Rezeptoren ein in vielen Aspekten unverstandenes Thema, das weiterer Untersuchungen bedarf.

Literatur

- Akazawa, Y., Mott, J. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Kahraman, A., Guicciardi, M. E., Meng, X. W., Kohno, S., Shah, V. H., Kaufmann, S. H., McNiven, M. A. & Gores, G. J. (2009). Death Receptor 5 Internalization Is Required for Lysosomal Permeabilization by TRAIL in Malignant Liver Cell Lines, *Gastroenterology*. AGA Institute American Gastroenterological Association, 136(7), 2365-2376.e7.
- Allam, A., Thomsen, A. R., Gothwal, M., Saha, D., Maurer, J. & Brunner, T. B. (2017). Pancreatic stellate cells in pancreatic cancer: In focus, *Pancreatology*. Elsevier India, a division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd, 17(4), 514–522.
- Almasan, A. & Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL: Apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14(3–4), 337–348.
- Annewanter, F. M. (2014). Expression von TRAIL-Rezeptoren und HMGA2 im duktalem Pankreasadenokarzinom, *Med. Diss.*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z. & Schwall, R. H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand, *J. Clin. Invest.*, 104(2), 155–162.
- Austin, C. D., Lawrence, D. A., Peden, A. A., Varfolomeev, E. E., Totpal, K., De Mazière, A. M., Klumperman, J., Arnott, D., Pham, V., Scheller, R. H. & Ashkenazi, A. (2006). Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(27), 10283–8.
- AWMF (2013). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, *Leitlinienprogr. Onkol.*, 1.0, 1–136.
- Aziji, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G. J., de Jong, S. & Krut, F. A. E. (2013). Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family, *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group, 20(7), 858–868.
- Bai, X., Williams, J. L. R., Greenwood, S. L., Baker, P. N., Aplin, J. D. & Crocker, I. P. (2009). A Placental Protective Role for Trophoblast-Derived TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), *Placenta*. Elsevier Ltd, 30(10), 855–860.
- Benchoua, A., Couriaud, C., Guégan, C., Tartier, L., Couvert, P., Friocourt, G., Chelly, J., Murcia, J. M. De & Onténiente, B. (2002). Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2, *J. Biol. Chem.*, 277(37), 34217–34222.
- Bertsch, U., Röder, C., Kalthoff, H. & Trauzold, A. (2014). Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2., *Cell Death Dis.*, 5, e1390.
- Von Boxberg, Y., Wutz, R. & Schwarz, U. (1990). Use of the biotin-avidin system for labelling, isolation and characterization of neural cell-surface proteins, *Eur. J. Biochem.*, 190(2), 249–256.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: A simple pathway becomes complex, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7(9), 678–689.
- Bretz, J. D., Mezosi, E., Giordano, T. J., Gauger, P. G., Thompson, N. W. & Baker, J. R. (2002). Inflammatory cytokine regulation of TRAIL-mediated apoptosis in thyroid epithelial cells, *Cell Death Differ.*, 9(3), 274–286.
- Brittingham, S. (2011). Downregulation of endogenous TRAIL and its effect on the human cancer cell line KELLY, *Med. Diss.*, Ludwig-Maximilians-Universität München.

-
- Carpenter, G. & Liao, H. J. (2009). Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus, *Exp. Cell Res.* Elsevier Inc., 315(9), 1556–1566.
- Chen, J.-J., Bozza, W. P., Di, X., Zhang, Y., Hallett, W. & Zhang, B. (2014). H-Ras regulation of TRAIL death receptor mediated apoptosis., *Oncotarget*, 5(13), 14–18.
- Christianson, J. C. & Ye, Y. (2014). Cleaning up in the endoplasmic reticulum: Ubiquitin in charge, *Nat. Struct. Mol. Biol.* Nature Publishing Group, 21(4), 325–335.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J. & Chan, F. K.-M. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(50), 18099–18104.
- la Cour, T., Kierner, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. & Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals, *Protein Eng. Des. Sel.*, 17(6), 527–536.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. a & Goodwin, R. G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet remains an incomplete death domain, *Immunity*, 7(6), 813–820.
- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G. & Smith, C. A. (1997). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family, *J. Exp. Med.*, 186(7), 1165–1170.
- Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G. & Parsons, S. J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 284(52), 36592–36604.
- Di, X., Zhang, G., Zhang, Y., Takeda, K. & Rosado, L. a R. (2013). Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5, *Oncotarget*, 4(9), 1349–1364.
- Dufour, F., Rattier, T., Constantinescu, A. A., Zischler, L., Morlé, A., Mabrouk, H. Ben, Humblin, E., Jacquemin, G., Szegezdi, E., Delacote, F., Marrakchi, N., Guichard, G., Pellat-Deceunynck, C., Vacher, P., Legembre, P., Garrido, C. & Micheau, O. (2017). TRAIL receptor gene editing unveils TRAIL-R1 as a master player of apoptosis induced by TRAIL and ER stress, *Oncotarget*, 8(6), 9974–9985.
- Elias, A., Siegelin, M. D., Steinmüller, A., Von Deimling, A., Lass, U., Korn, B. & Mueller, W. (2009). Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas, *Clin. Cancer Res.*, 15(17), 5457–5465.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C. & Young, P. R. (1998). Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL, *J. Biol. Chem.*, 273(23), 14363–14367.
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. & Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: Decisions between life and death, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39(7–8), 1462–1475.
- Ferguson, S. M. & De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13(2), 75–88.
- Gallmeier, E., Bader, D. C., Kriegel, L., Berezowska, S., Seeliger, H., Göke, B., Kirchner, T., Bruns, C. & De Toni, E. N. (2013). Loss of TRAIL-Receptors Is a Recurrent Feature in Pancreatic Cancer and Determines the Prognosis of Patients with No Nodal Metastasis after Surgery, *PLoS One*. Edited by E. Hirsch, 8(2), e56760.

-
- Ganten, T. M., Haas, T. L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M. R., Fas, S. C., Krueger, A., Weigand, M. A., Grosse-Wilde, A., Stremmel, W., Krammer, P. H. & Walczak, H. (2004). Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs, *Cell Death Differ.*, 11(S1), S86–S96.
- GEKID (2019). Krebs in Deutschland für 2015/ 2016, *Robert Koch-Institut*, 12. Ausgab, 52–55.
- Givan, A. L. (2011). Flow Cytometry: An Introduction, in *Teresa S. Hawley Robert G. Hawley (eds.)*, *Flow Cytom. Protoc. Methods Mol. Biol.*, 1–29.
- Gómez-Angelats, M. & Cidlowski, J. A. (2003). Molecular evidence for the nuclear localization of FADD, *Cell Death Differ.*, 10(7), 791–797.
- Gundlach, J. P., Hauser, C., Schlegel, F. M., Böger, C., Röder, C., Röcken, C., Becker, T., Egberts, J. H., Kalthoff, H. & Trauzold, A. (2018). Cytoplasmic TRAIL-R1 is a positive prognostic marker in PDAC, *BMC Cancer*. BMC Cancer, 18(1), 1–10.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. Elsevier Inc., 646–674.
- Hartwig, T., Montinaro, A., von Karstedt, S., Sevko, A., Surinova, S., Chakravarthy, A., Taraborrelli, L., Draber, P., Lafont, E., Arce Vargas, F., El-Bahrawy, M. A., Quezada, S. A. & Walczak, H. (2017). The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2, *Mol. Cell*. Elsevier Inc., 65(4), 730-742.e5.
- Hasel, C., Dürr, S., Rau, B., Sträter, J., Schmid, R. M., Walczak, H., Bachem, M. G. & Möller, P. (2003). In Chronic Pancreatitis, Widespread Emergence of TRAIL Receptors in Epithelia Coincides with Neoexpression of TRAIL by Pancreatic Stellate Cells of Early Fibrotic Areas, *Lab. Invest.*, 83(6), 825–836.
- Haselmann, V., Kurz, A., Bertsch, U., Hübner, S., Olempska-Müller, M., Fritsch, J., Häslar, R., Pickl, A., Fritsche, H., Annewanter, F., et al. (2014). Nuclear death receptor trail-r2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells, *Gastroenterology*. Elsevier, Inc, 146(1), 278–290.
- Heilmann, T., Vondung, F., Borzikowsky, C., Szymczak, S., Krüger, S., Alkatout, I., Wengers, A., Bauer, M., Klapper, W., Röcken, C., Maass, N., von Karstedt, S., Schem, C. & Trauzold, A. (2019). Heterogeneous intracellular TRAIL-receptor distribution predicts poor outcome in breast cancer patients, *J. Mol. Med.* Journal of Molecular Medicine, 97(8), 1155–1167.
- Hermann, P. C. & Jr, B. S. (2018). Pancreatic cancer stem cells : A state or an entity ?, *Semin. Cancer Biol.* Elsevier, 53, 223–231.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H. & Ungefroren, H. (2000). Bcl-X(L) protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis, *Oncogene*, 19(48), 5477–5486.
- Hoesel, B. & Schmid, J. a (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer., *Mol. Cancer*, 12(1), 86.
- Huang, S. & Sinicrope, F. A. (2008). BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells, *Cancer Res.*, 68(8), 2944–2951.
- Hymowitz, S. G., Connell, M. P. O., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., Vos, A. M. De, Kelley, R. F., Immunity, R. G. & Chem, a J. B. (2000). A Unique Zinc-Binding Site Revealed by a High-Resolution X-ray Structure of, *Biochemistry*, 39, 633–640.

-
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S. & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* Elsevier B.V., 1807(6), 735–745.
- Jin, Z., McDonald, E. R., Dicker, D. T. & El-Deiry, W. S. (2004). Deficient Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Death Receptor Transport to the Cell Surface in Human Colon Cancer Cells Selected for Resistance to TRAIL-induced Apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 279(34), 35829–35839.
- Kagawa, K., Nakano, A., Miki, H., Oda, A., Amou, H., Takeuchi, K., Nakamura, S., Harada, T., Fujii, S., Yata, K., Ozaki, S., Matsumoto, T. & Abe, M. (2012). Inhibition of tace activity enhances the susceptibility of myeloma cells to TRAIL, *PLoS One*, 7(2), 1–9.
- Kaminsky, V. O., Surova, O. V., Piskunova, T., Zborovskaya, I. B., Tchevkina, E. M., Andera, L. & Zhivotovsky, B. (2013). Upregulation of c-FLIP-short in response to TRAIL promotes survival of NSCLC cells, which could be suppressed by inhibition of Ca²⁺/calmodulin signaling., *Cell Death Dis.* Nature Publishing Group, 4(3), e522.
- von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., Montinaro, A., Hartwig, T., Lemke, J., Legler, K., Annewanter, F., Campbell, A. D., Taraborrelli, L., et al. (2015). Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-Driven cancer progression, invasion, and metastasis, *Cancer Cell*, 27(4), 561–573.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J. & Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5, *Immunity*, 12(6), 611–620.
- Kohlhaas, S. L., Craxton, A., Sun, X.-M., Pinkoski, M. J. & Cohen, G. M. (2007). Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis., *J. Biol. Chem.*, 282(17), 12831–12841.
- Kojima, Y., Nakayama, M., Nishina, T., Nakano, H., Koyanagi, M., Takeda, K., Okumura, K. & Yagita, H. (2011). Importin β 1 protein-mediated nuclear localization of Death Receptor 5 (DR5) limits DR5/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells, *J. Biol. Chem.*, 286(50), 43383–43393.
- Van De Kooij, B., Verbrugge, I., De Vries, E., Gijzen, M., Montserrat, V., Maas, C., Neefjes, J. & Borst, J. (2013). Ubiquitination by the membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) ligase controls steady-state cell surface expression of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor 1, *J. Biol. Chem.*, 288(9), 6617–6628.
- Kozik, P., Francis, R. W., Seaman, M. N. J. & Robinson, M. S. (2010). A Screen for Endocytic Motifs, *Traffic*, 11(6), 843–855.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. & Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(August), 9112–9117.
- Lam, M., Marsters, S., Ashkenazi, A. & Walter, P. (2020). Misfolded proteins bind and activate death receptor 5 to trigger apoptosis during unresolved endoplasmic reticulum stress, *Elife*, 9, 1–27.
- Legler, K., Hauser, C., Egberts, J.-H., Willms, A., Heneweer, C., Boretius, S., Röcken, C., Glüer, C.-C., Becker, T., Kluge, M., Hill, O., Gieffers, C., Fricke, H., Kalthoff, H., Lemke, J. & Trauzold, A. (2018). The novel TRAIL-receptor agonist APG350 exerts superior therapeutic activity in pancreatic cancer cells, *Cell Death Dis.* Springer US, 9(5), 445.

-
- Leithner, K., Stacher, E., Wurm, R., Ploner, F., Quehenberger, F., Wohlkoenig, C., Bálint, Z., Polachova, J., Olschewski, A., Samonigg, H., Popper, H. H. & Olschewski, H. (2009). Lung Cancer Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy, *Lung Cancer*, 65, 98–104.
- Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J. & Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy, *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group, 21(9), 1350–64.
- Lemke, J., Noack, A., Adam, D., Tchikov, V., Bertsch, U., Röder, C., Schütze, S., Wajant, H., Kalthoff, H. & Trauzold, A. (2010). TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5, *J. Mol. Med.*, 88(7), 729–740.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F. & Simeone, D. M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells, *Cancer Res.*, 67(3), 1030–1037.
- Lu, C., Figueroa, J. A., Liu, Z., Konala, V. & Aulakh, A. (2015). Nuclear Export as a Novel Therapeutic Target: The CRM1 Connection, *Curr. Cancer Drug Targets*, 575–592.
- Lu, M., Lawrence, D. A., Marsters, S., Acosta-alvear, D., Kimmig, P., South, W. & Francisco, S. (2014). Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis, *Science* (80-.), 345(6192), 98–101.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors., *Cell*, 94(4), 481–490.
- MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis, *Toxicol. Lett.*, 139(2–3), 89–97.
- Mérino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E. & Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2, *Mol. Cell. Biol.*, 26(19), 7046–7055.
- Mert, U., Adawy, A., Scharff, E., Teichmann, P., Willms, A., Haselmann, V., Colmorgen, C., Lemke, J., von Karstedt, S., Fritsch, J. & Trauzold, A. (2019). TRAIL Induces Nuclear Translocation and Chromatin Localization of TRAIL Death Receptors, *Cancers (Basel)*, 11(8), 1167.
- Mert, U. & Sanlioglu, A. D. (2016). Intracellular localization of DR5 and related regulatory pathways as a mechanism of resistance to TRAIL in cancer, *Cell. Mol. Life Sci.*
- De Miguel, D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H. & Martinez-Lostao, L. (2016). Onto better TRAILs for cancer treatment, *Cell Death Differ. Adv. online Publ.* Nature Publishing Group, 4(5), 1–15.
- Mohr, A., Yu, R. & Zwacka, R. M. (2015). TRAIL-receptor preferences in pancreatic cancer cells revisited: Both TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have a licence to kill, *BMC Cancer*, 15(1), 1–11.
- Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T. & Taxman, D. J. (2010). Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown, *Methods Mol Biol.* 2010, (2), 1–15.
- Neumann, S., Hasenauer, J., Pollak, N. & Scheurich, P. (2014). Dominant negative effects of tumor necrosis factor (tnf)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 4 on TRAIL receptor 1 signaling by Formation of heteromeric complexes, *J. Biol. Chem.*, 289(23), 16576–16587.
- Newsom-Davis, T., Prieske, S. & Walczak, H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy ?, *Apoptosis*, 14(4), 607–623.

-
- Niu, Y., Li, Y., Zang, J., Huang, H., Deng, Jiexin, Cui, Z., Yu, D. & Deng, Jinbo (2012). Death receptor 5 and neuroproliferation, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 32(2), 255–265.
- O’Leary, L., van der Sloot, a M., Reis, C. R., Deegan, S., Ryan, a E., Dhami, S. P. S., Murillo, L. S., Cool, R. H., de Sampaio, P. C., Thompson, K., Murphy, G., Quax, W. J., Serrano, L., Samali, A. & Szegezdi, E. (2015). Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: the role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity, *Oncogene*, (September 2014), 1–10.
- Pan, G. (1997). An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-Containing Receptor for TRAIL, *Science* (80-.), 277(5327), 815–818.
- Pan, G., O’Rourke, K., Chinnaiyan, a M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. & Dixit, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL., *Science*, 276(5309), 111–113.
- Pineda, D. M., Rittenhouse, D. W., Valley, C. C., Cozzitorto, J. A., Burkhart, R. A., Leiby, B., Winter, J. M., Weber, M. C., Londin, E. R., Rigoutsos, I., Yeo, C. J., Gorospe, M., Witkiewicz, A. K., Sachs, J. N. & Brody, J. R. (2012). HuR’s post-transcriptional regulation of death receptor 5 in pancreatic cancer cells, *Cancer Biol. Ther.*, 13(10), 946–955.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. & Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family, *J. Biol. Chem.*, 271(22), 12687–12690.
- Psahoulia, F. H., Drosopoulos, K. G., Doubravska, L., Andera, L. & Pintzas, A. (2007). Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts., *Mol. Cancer Ther.*, 6(September), 2591–2599.
- Ravi, R., Jain, A. J., Schulick, R. D., Pham, V., Prouser, T. S., Allen, H., Mayer, E. G., Yu, H., Pardoll, D. M., Ashkenazi, A. & Bedi, A. (2004). Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL, *Cancer Res.*, 64(24), 9105–9114.
- Reis, C. R., Chen, P.-H., Bendris, N. & Schmid, S. L. (2017). TRAIL-death receptor endocytosis and apoptosis are selectively regulated by dynamin-1 activation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114(3), 504–509.
- Ren, Y.-G., Wagner, K. W., Knee, D. A., Aza-Blanc, P., Nasoff, M. & Deveraux, Q. L. (2004). Differential Regulation of the TRAIL Death Receptors DR4 and DR5 by the Signal Recognition Particle, *Mol. Biol. Cell*, 15, 5064–5074.
- Ryan, D. P., Hong, T. S. & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic Adenocarcinoma, *N. Engl. J. Med.*, 371(11), 1039–1049.
- Salvesen, G. S. & Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: Blocking the road to death’s door, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(6), 401–410.
- Scaffidi, C. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *EMBO J.*, 17(6), 1675–1687.
- Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X., Cowper, A. E., Mcmichael, A. J. & Bell, J. I. (1997). TRICK2 , a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL, *Curr. Biol.*, 7(9), 693–696.
- Screaton, R. A., Kiessling, S., Sansom, O. J., Millar, C. B., Maddison, K., Bird, A., Clarke, A. R. & Frisch, S. M. (2003). Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: A potential link between genome surveillance and apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(9), 5211–5216.
- Shankar, S. & Srivastava, R. K. (2004). Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications, *Drug Resist. Updat.*, 7(2), 139–156.

Sipos, B., Möser, S., Klöppel, G., Kalthoff, H., Török, V. & Löhr, M. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: Towards the establishment of an in vitro research platform, *Virchows Arch.*, 442(5), 444–452.

Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., Brink, M. R. M. Van Den & Yagita, H. (2003). Nature 's TRAIL — On a Path to Cancer Immunotherapy, *Immunity*, 18(3), 1–6.

Song, J. H., Tse, M. C. L., Bellail, A., Phuphanich, S., Khuri, F., Kneteman, N. M. & Hao, C. (2007). Lipid Rafts and Nonrafts Mediate Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand–Induced Apoptotic and Nonapoptotic Signals in Non–Small Cell Lung Carcinoma Cells, *Cancer Res.*, 67(14), 6946–6955.

Song, J. J., Szczepanski, M. J., Kim, S. Y., Kim, J. H., An, J. Y., Kwon, Y. T., Alcala, M. A., Bartlett, D. L. & Lee, Y. J. (2010). c-Cbl-mediated degradation of TRAIL receptors is responsible for the development of the early phase of TRAIL resistance, *Cell. Signal.*, 22(3), 553–563.

Spierings, D. C. J., de Vries, E. G. E., Timens, W., Groen, H. J. M., Boezen, H. M. & de Jong, S. (2003). Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors., *Clin. cancer Res.*, 9(9), 3397–405.

Spierings, D. C., Vries, E. G. De, Vellenga, E., Heuvel, F. A. Van Den, Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H. & Jong, S. De (2004). Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, 52(6), 821–831.

Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. & Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) Is an Essential Nuclear Export Factor, *Cell*, 90(6), 1041–1050.

Tawfik, D., Groth, C., Gundlach, J.-P., Peipp, M., Kabelitz, D., Becker, T., Oberg, H.-H., Trauzold, A. & Wesch, D. (2019). TRAIL-Receptor 4 Modulates $\gamma\delta$ T Cell-Cytotoxicity Toward Cancer Cells, *Front. Immunol.*, 10(August).

Todaro, M., Lombardo, Y., Francipane, M. G., Alea, M. P., Cammareri, P., Iovino, F., Stefano, A. B. Di, Bernardo, C. Di, Agrusa, A., Condorelli, G., Walczak, H. & Stassi, G. (2008). Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4, *Cell Death Differ.*, 15, 762–772.

Trauzold, A., Schmiedel, S., Röder, C., Tams, C., Christgen, M., Oestern, S., Arlt, A., Westphal, S., Kapischke, M., Ungefroren, H. & Kalthoff, H. (2003). Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells, *Br. J. Cancer*, 89(9), 1714–1721.

Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Röder, C., Kalthoff, H. & Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma., *Oncogene*, 25, 7434–7439.

Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schütze, S., Schäfer, H., Oestern, S., Röder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., Walczak, H. & Kalthoff, H. (2001). CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells, *Oncogene*, 20(31), 4258–4269.

Turner, J. G., Dawson, J., Cubitt, C. L., Baz, R. & Sullivan, D. M. (2014). Inhibition of CRM1-dependent nuclear export sensitizes malignant cells to cytotoxic and targeted agents, *Semin. Cancer Biol.* Elsevier Ltd, 27, 62–73.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer, *Lancet.* Elsevier Ltd, 378(9791), 607–620.

-
- Vogler, M., Walczak, H., Stadel, D., Haas, T. L., Genze, F., Jovanovic, M., Gschwend, E., Simmet, T., Debatin, K. & Fulda, S. (2008). Targeting XIAP Bypasses Bcl-2-Mediated Resistance to TRAIL and Cooperates with TRAIL to Suppress Pancreatic Cancer Growth In vitro and In vivo Targeting XIAP Bypasses Bcl-2 – Mediated Resistance to TRAIL and Cooperates with TRAIL to Suppress Pancreatic Ca, *Cancer Res.*, 68(19), 7956–65.
- Voigt, S., Philipp, S., Davarnia, P., Winoto-Morbach, S., Röder, C., Arenz, C., Trauzold, A., Kabelitz, D., Schütze, S., Kalthoff, H. & Adam, D. (2014). TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells., *BMC Cancer*, 14, 74.
- Wagner, K. W., Punnoose, E. A., Januario, T., Lawrence, D. A., Pitti, R. M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S. F., Totpal, K., Huw, L., Katta, V., Cavet, G., Hymowitz, S. G., Amler, L. & Ashkenazi, A. (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL, *Nat. Med.*, 13(9), 1070–1077.
- Wajant, H. (2004). TRAIL and NFκB Signaling—a Complex Relationship, *Vitam. Horm.*, 67, 101–132.
- Wajant, H., Gerspach, J. & Pfizenmaier, K. (2005). Tumor therapeutics by design: Targeting and activation of death receptors, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16(1), 55–76.
- Walczak, H., Degli-esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G. & Rauch, C. T. (1997). TRAIL-R2 : a novel apoptosis-mediating receptor for, *EMBO J.*, 16(17), 5386–5397.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, a, Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C. & Lynch, D. H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo., *Nat. Med.*, 5(2), 157–163.
- Walsh, M. C. & Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond, *Front. Immunol.*, 5(October), 1–11.
- Wang, S.-C. & Hung, M.-C. (2009). Nuclear Translocation of the Epidermal Growth Factor Receptor Family Membrane Tyrosine Kinase Receptors, *Clin. Cancer Res.*, 15(21), 6484–6489.
- Wang, Y. & Hung, M. (2012). Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family, *Cell Biosci.*, 2(1), 13.
- Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Huo, L., Du, Y., Lee, H. J., Lee, H. H., Wang, H., Hsu, J. M. & Hung, M. C. (2010). The translocon Sec61β localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus, *J. Biol. Chem.*, 285(49), 38720–38729.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. & Goodwin, R. G. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis, *Immunity*, 3(6), 673–682.
- Yan, S., Qu, X., Xu, L., Che, X., Ma, Y., Zhang, L., Teng, Y., Zou, H. & Liu, Y. (2014). Bufalin enhances TRAIL-induced apoptosis by redistributing death receptors in lipid rafts in breast cancer cells., *Anticancer. Drugs*, 25(6), 683–689.
- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A. & DePinho, R. A. (2016). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Genes Dev.*, 30(4), 355–385.
- Yoshida, T., Zhang, Y., Rivera Rosado, L. A. & Zhang, B. (2009). Repeated Treatment with Subtoxic Doses of TRAIL Induces Resistance to Apoptosis through Its Death Receptors in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, *Mol. Cancer Res.*, 7(11), 1835–1844.

Yu, R., Albarenque, S. M., Cool, R. H., Quax, W. J., Mohr, A. & Zwacka, R. M. (2014). DR4 specific TRAIL variants are more efficacious than wild-type TRAIL in pancreatic cancer, *Cancer Biol. Ther.*, 15(12), 1658–1666.

Zhang, X. D., Franco, A. V, Nguyen, T., Gray, C. P. & Hersey, P. (2000). Differential Localization and Regulation of Death and Decoy Receptors for TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in Human Melanoma Cells, *J. Immunol.*, 164(8), 3961–3970.

Zhang, Y., Yoshida, T. & Zhang, B. (2009). TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells, *Cancer Biol. Ther.*, 8(10), 917–922.

Zhang, Y. & Zhang, B. (2008). TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5., *Mol. Cancer Res.*, 6(12), 1861–71.

Anhang

Ermittlung potenzieller NES

Zur Ermittlung potenzieller NES (*nuclear export signals*) wurde das Computerprogramm *NetNES 1.1 Server* der Technischen Universität Dänemark verwendet. Anhand der Aminosäuresequenz der untersuchten Proteine wird ein „NES Score“ ermittelt. Bei Überschreiten eines Schwellenwertes (engl. *Threshold*) wird die Beteiligung an einem NES angenommen, gekennzeichnet durch ein „Yes“ in der Spalte „*Predicted*“ in der Liste (vgl. la Cour et al., 2004). Programm abzurufen unter: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>

Abgerufen am 20.06.2020.

TRAIL-R1

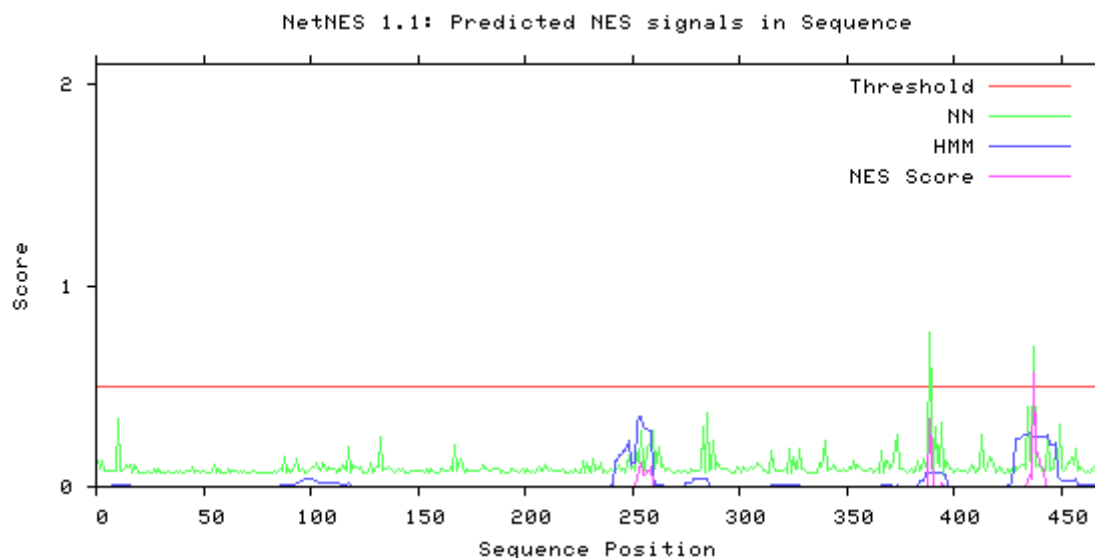


Abbildung 21: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R1

Die Abszisse zeigt die Sequenzposition von TRAIL-R1. Auf der Ordinate ist der *Score* abgebildet. Übersteigt der *NES Score* den Schwellenwert (*Threshold*), wird die Beteiligung an einem NES angenommen. NN = *neural network*, HMM = *hidden Markov model*

#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
#-----				
Sequence-1-M	0.128	0.000	0.000	-
Sequence-2-A	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-3-P	0.128	0.000	0.000	-
Sequence-4-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-5-P	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-6-A	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-7-R	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-8-V	0.081	0.007	0.000	-
Sequence-9-H	0.084	0.007	0.000	-
Sequence-10-L	0.335	0.007	0.000	-
Sequence-11-G	0.078	0.007	0.000	-
Sequence-12-A	0.079	0.007	0.000	-
Sequence-13-F	0.085	0.007	0.000	-
Sequence-14-L	0.107	0.007	0.000	-
Sequence-15-A	0.096	0.007	0.000	-

Sequence-16-V	0.106	0.007	0.000	-
Sequence-17-T	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-18-P	0.106	0.000	0.000	-
Sequence-19-N	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-20-P	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-21-G	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-22-S	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-23-A	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-24-A	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-25-S	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-26-G	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-27-T	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-28-E	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-29-A	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-30-A	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-31-A	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-32-A	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-33-T	0.065	0.000	0.000	-
Sequence-34-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-35-S	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-36-K	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-37-V	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-38-W	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-39-G	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-40-S	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-41-S	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-42-A	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-43-G	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-44-R	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-45-I	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-46-E	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-47-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-48-R	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-49-G	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-50-G	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-51-G	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-52-R	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-53-G	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-54-A	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-55-L	0.107	0.000	0.000	-
Sequence-56-P	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-57-T	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-58-S	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-59-M	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-60-G	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-61-Q	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-62-H	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-63-G	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-64-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-65-S	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-66-A	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-67-R	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-68-A	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-69-R	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-70-A	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-71-G	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-72-R	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-73-A	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-74-P	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-75-G	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-76-P	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-77-R	0.065	0.000	0.000	-

Sequence-78-P	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-79-A	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-80-R	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-81-E	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-82-A	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-83-S	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-84-P	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-85-R	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-86-L	0.087	0.006	0.000	-
Sequence-87-R	0.076	0.006	0.000	-
Sequence-88-V	0.150	0.007	0.000	-
Sequence-89-H	0.073	0.007	0.000	-
Sequence-90-K	0.092	0.009	0.000	-
Sequence-91-T	0.072	0.010	0.000	-
Sequence-92-F	0.100	0.014	0.000	-
Sequence-93-K	0.135	0.015	0.000	-
Sequence-94-F	0.079	0.020	0.000	-
Sequence-95-V	0.079	0.032	0.000	-
Sequence-96-V	0.086	0.034	0.000	-
Sequence-97-V	0.074	0.039	0.000	-
Sequence-98-G	0.070	0.037	0.000	-
Sequence-99-V	0.081	0.038	0.000	-
Sequence-100-L	0.088	0.040	0.000	-
Sequence-101-L	0.098	0.043	0.000	-
Sequence-102-Q	0.098	0.029	0.000	-
Sequence-103-V	0.121	0.032	0.000	-
Sequence-104-V	0.094	0.022	0.000	-
Sequence-105-P	0.082	0.020	0.000	-
Sequence-106-S	0.116	0.020	0.000	-
Sequence-107-S	0.075	0.020	0.000	-
Sequence-108-A	0.097	0.020	0.000	-
Sequence-109-A	0.089	0.020	0.000	-
Sequence-110-T	0.085	0.020	0.000	-
Sequence-111-I	0.090	0.020	0.000	-
Sequence-112-K	0.067	0.020	0.000	-
Sequence-113-L	0.093	0.020	0.000	-
Sequence-114-H	0.076	0.014	0.000	-
Sequence-115-D	0.106	0.014	0.000	-
Sequence-116-Q	0.085	0.014	0.000	-
Sequence-117-S	0.079	0.014	0.000	-
Sequence-118-I	0.203	0.016	0.000	-
Sequence-119-G	0.074	0.002	0.000	-
Sequence-120-T	0.111	0.003	0.000	-
Sequence-121-Q	0.099	0.003	0.000	-
Sequence-122-Q	0.090	0.003	0.000	-
Sequence-123-W	0.104	0.003	0.000	-
Sequence-124-E	0.065	0.003	0.000	-
Sequence-125-H	0.071	0.003	0.000	-
Sequence-126-S	0.072	0.003	0.000	-
Sequence-127-P	0.083	0.003	0.000	-
Sequence-128-L	0.119	0.003	0.000	-
Sequence-129-G	0.065	0.001	0.000	-
Sequence-130-E	0.088	0.001	0.000	-
Sequence-131-L	0.097	0.001	0.000	-
Sequence-132-C	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-133-P	0.248	0.000	0.000	-
Sequence-134-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-135-G	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-136-S	0.098	0.000	0.000	-
Sequence-137-H	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-138-R	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-139-S	0.067	0.000	0.000	-

Sequence-140-E	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-141-H	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-142-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-143-G	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-144-A	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-145-C	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-146-N	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-147-R	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-148-C	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-149-T	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-150-E	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-151-G	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-152-V	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-153-G	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-154-Y	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-155-T	0.065	0.000	0.000	-
Sequence-156-N	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-157-A	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-158-S	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-159-N	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-160-N	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-161-L	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-162-F	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-163-A	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-164-C	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-165-L	0.100	0.000	0.000	-
Sequence-166-P	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-167-C	0.205	0.000	0.000	-
Sequence-168-T	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-169-A	0.108	0.000	0.000	-
Sequence-170-C	0.139	0.000	0.000	-
Sequence-171-K	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-172-S	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-173-D	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-174-E	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-175-E	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-176-E	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-177-R	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-178-S	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-179-P	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-180-C	0.108	0.000	0.000	-
Sequence-181-T	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-182-T	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-183-T	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-184-R	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-185-N	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-186-T	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-187-A	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-188-C	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-189-Q	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-190-C	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-191-K	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-192-P	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-193-G	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-194-T	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-195-F	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-196-R	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-197-N	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-198-D	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-199-N	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-200-S	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-201-A	0.092	0.000	0.000	-

Sequence-202-E	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-203-M	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-204-C	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-205-R	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-206-K	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-207-C	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-208-S	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-209-R	0.111	0.000	0.000	-
Sequence-210-G	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-211-C	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-212-P	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-213-R	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-214-G	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-215-M	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-216-V	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-217-K	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-218-V	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-219-K	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-220-D	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-221-C	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-222-T	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-223-P	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-224-W	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-225-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-226-D	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-227-I	0.133	0.000	0.000	-
Sequence-228-E	0.065	0.000	0.000	-
Sequence-229-C	0.123	0.000	0.000	-
Sequence-230-V	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-231-H	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-232-K	0.141	0.000	0.000	-
Sequence-233-E	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-234-S	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-235-G	0.118	0.000	0.000	-
Sequence-236-N	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-237-G	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-238-H	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-239-N	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-240-I	0.085	0.007	0.000	-
Sequence-241-W	0.081	0.007	0.000	-
Sequence-242-V	0.079	0.128	0.000	-
Sequence-243-I	0.087	0.133	0.000	-
Sequence-244-L	0.111	0.155	0.000	-
Sequence-245-V	0.080	0.160	0.000	-
Sequence-246-V	0.088	0.175	0.000	-
Sequence-247-T	0.067	0.177	0.000	-
Sequence-248-L	0.161	0.228	0.000	-
Sequence-249-V	0.087	0.109	0.000	-
Sequence-250-V	0.101	0.124	0.000	-
Sequence-251-P	0.077	0.116	0.000	-
Sequence-252-L	0.168	0.321	0.053	-
Sequence-253-L	0.122	0.351	0.094	-
Sequence-254-L	0.281	0.353	0.120	-
Sequence-255-V	0.100	0.295	0.064	-
Sequence-256-A	0.084	0.293	0.059	-
Sequence-257-V	0.200	0.293	0.084	-
Sequence-258-L	0.206	0.282	0.081	-
Sequence-259-I	0.214	0.279	0.096	-
Sequence-260-V	0.280	0.064	0.000	-
Sequence-261-C	0.090	0.007	0.000	-
Sequence-262-C	0.199	0.007	0.000	-
Sequence-263-C	0.098	0.007	0.000	-

Sequence-264-I	0.112	0.007	0.000	-
Sequence-265-G	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-266-S	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-267-G	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-268-C	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-269-G	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-270-G	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-271-D	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-272-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-273-K	0.071	0.001	0.000	-
Sequence-274-C	0.075	0.001	0.000	-
Sequence-275-M	0.075	0.017	0.000	-
Sequence-276-D	0.071	0.017	0.000	-
Sequence-277-R	0.088	0.017	0.000	-
Sequence-278-V	0.077	0.036	0.000	-
Sequence-279-C	0.082	0.036	0.000	-
Sequence-280-F	0.079	0.036	0.000	-
Sequence-281-W	0.079	0.036	0.000	-
Sequence-282-R	0.099	0.036	0.000	-
Sequence-283-L	0.295	0.037	0.000	-
Sequence-284-G	0.074	0.037	0.000	-
Sequence-285-L	0.372	0.037	0.000	-
Sequence-286-L	0.080	0.003	0.000	-
Sequence-287-R	0.104	0.001	0.000	-
Sequence-288-G	0.233	0.001	0.000	-
Sequence-289-P	0.086	0.001	0.000	-
Sequence-290-G	0.122	0.001	0.000	-
Sequence-291-A	0.090	0.001	0.000	-
Sequence-292-E	0.086	0.001	0.000	-
Sequence-293-D	0.091	0.001	0.000	-
Sequence-294-N	0.085	0.001	0.000	-
Sequence-295-A	0.080	0.001	0.000	-
Sequence-296-H	0.072	0.001	0.000	-
Sequence-297-N	0.068	0.001	0.000	-
Sequence-298-E	0.073	0.001	0.000	-
Sequence-299-I	0.101	0.001	0.000	-
Sequence-300-L	0.087	0.001	0.000	-
Sequence-301-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-302-N	0.100	0.000	0.000	-
Sequence-303-A	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-304-D	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-305-S	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-306-L	0.087	0.001	0.000	-
Sequence-307-S	0.095	0.001	0.000	-
Sequence-308-T	0.115	0.001	0.000	-
Sequence-309-F	0.114	0.001	0.000	-
Sequence-310-V	0.098	0.001	0.000	-
Sequence-311-S	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-312-E	0.083	0.001	0.000	-
Sequence-313-Q	0.071	0.001	0.000	-
Sequence-314-Q	0.073	0.001	0.000	-
Sequence-315-M	0.179	0.012	0.000	-
Sequence-316-E	0.095	0.012	0.000	-
Sequence-317-S	0.078	0.012	0.000	-
Sequence-318-Q	0.080	0.012	0.000	-
Sequence-319-E	0.079	0.012	0.000	-
Sequence-320-P	0.080	0.012	0.000	-
Sequence-321-A	0.085	0.012	0.000	-
Sequence-322-D	0.070	0.012	0.000	-
Sequence-323-L	0.190	0.012	0.000	-
Sequence-324-T	0.072	0.012	0.000	-
Sequence-325-G	0.153	0.012	0.000	-

Sequence-326-V	0.089	0.012	0.000	-
Sequence-327-T	0.088	0.011	0.000	-
Sequence-328-V	0.193	0.011	0.000	-
Sequence-329-Q	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-330-S	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-331-P	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-332-G	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-333-E	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-334-A	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-335-Q	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-336-C	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-337-L	0.117	0.000	0.000	-
Sequence-338-L	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-339-G	0.159	0.000	0.000	-
Sequence-340-P	0.233	0.000	0.000	-
Sequence-341-A	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-342-E	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-343-A	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-344-E	0.106	0.000	0.000	-
Sequence-345-G	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-346-S	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-347-Q	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-348-R	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-349-R	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-350-R	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-351-L	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-352-L	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-353-V	0.132	0.000	0.000	-
Sequence-354-P	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-355-A	0.109	0.000	0.000	-
Sequence-356-N	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-357-G	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-358-A	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-359-D	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-360-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-361-T	0.085	0.001	0.000	-
Sequence-362-E	0.070	0.001	0.000	-
Sequence-363-T	0.077	0.001	0.000	-
Sequence-364-L	0.091	0.004	0.000	-
Sequence-365-M	0.073	0.005	0.000	-
Sequence-366-L	0.177	0.007	0.000	-
Sequence-367-F	0.069	0.007	0.000	-
Sequence-368-F	0.129	0.007	0.000	-
Sequence-369-D	0.133	0.006	0.000	-
Sequence-370-K	0.089	0.006	0.000	-
Sequence-371-F	0.107	0.006	0.000	-
Sequence-372-A	0.131	0.004	0.000	-
Sequence-373-N	0.223	0.004	0.000	-
Sequence-374-I	0.257	0.005	0.000	-
Sequence-375-V	0.087	0.001	0.000	-
Sequence-376-P	0.086	0.001	0.000	-
Sequence-377-F	0.084	0.002	0.000	-
Sequence-378-D	0.074	0.002	0.000	-
Sequence-379-S	0.076	0.002	0.000	-
Sequence-380-W	0.085	0.002	0.000	-
Sequence-381-D	0.070	0.002	0.000	-
Sequence-382-Q	0.082	0.002	0.000	-
Sequence-383-L	0.133	0.012	0.000	-
Sequence-384-M	0.079	0.029	0.000	-
Sequence-385-R	0.099	0.029	0.000	-
Sequence-386-Q	0.144	0.029	0.000	-
Sequence-387-L	0.102	0.067	0.000	-

Sequence-388-D	0.091	0.067	0.000	-
Sequence-389-L	0.763	0.070	0.341	-
Sequence-390-T	0.072	0.068	0.000	-
Sequence-391-K	0.300	0.068	0.000	-
Sequence-392-N	0.115	0.068	0.000	-
Sequence-393-E	0.096	0.068	0.000	-
Sequence-394-I	0.319	0.068	0.016	-
Sequence-395-D	0.073	0.056	0.000	-
Sequence-396-V	0.129	0.056	0.000	-
Sequence-397-V	0.107	0.004	0.000	-
Sequence-398-R	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-399-A	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-400-G	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-401-T	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-402-A	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-403-G	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-404-P	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-405-G	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-406-D	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-407-A	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-408-L	0.105	0.000	0.000	-
Sequence-409-Y	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-410-A	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-411-M	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-412-L	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-413-M	0.257	0.000	0.000	-
Sequence-414-K	0.104	0.000	0.000	-
Sequence-415-W	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-416-V	0.105	0.000	0.000	-
Sequence-417-N	0.151	0.000	0.000	-
Sequence-418-K	0.110	0.000	0.000	-
Sequence-419-T	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-420-G	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-421-R	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-422-N	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-423-A	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-424-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-425-I	0.085	0.005	0.000	-
Sequence-426-H	0.068	0.005	0.000	-
Sequence-427-T	0.082	0.026	0.000	-
Sequence-428-L	0.119	0.111	0.000	-
Sequence-429-L	0.082	0.240	0.000	-
Sequence-430-D	0.091	0.239	0.000	-
Sequence-431-A	0.096	0.239	0.000	-
Sequence-432-L	0.113	0.260	0.000	-
Sequence-433-E	0.093	0.260	0.000	-
Sequence-434-R	0.396	0.260	0.034	-
Sequence-435-M	0.132	0.272	0.056	-
Sequence-436-E	0.106	0.250	0.037	-
Sequence-437-E	0.693	0.250	0.571	Yes
Sequence-438-R	0.099	0.250	0.168	-
Sequence-439-H	0.105	0.250	0.170	-
Sequence-440-A	0.098	0.250	0.111	-
Sequence-441-R	0.075	0.250	0.099	-
Sequence-442-E	0.070	0.250	0.092	-
Sequence-443-K	0.079	0.251	0.000	-
Sequence-444-I	0.258	0.263	0.000	-
Sequence-445-Q	0.078	0.209	0.000	-
Sequence-446-D	0.094	0.209	0.000	-
Sequence-447-L	0.209	0.221	0.000	-
Sequence-448-L	0.082	0.050	0.000	-
Sequence-449-V	0.309	0.042	0.000	-

Sequence-450-D	0.086	0.028	0.000	-
Sequence-451-S	0.083	0.028	0.000	-
Sequence-452-G	0.097	0.028	0.000	-
Sequence-453-K	0.116	0.028	0.000	-
Sequence-454-F	0.120	0.028	0.000	-
Sequence-455-I	0.146	0.033	0.000	-
Sequence-456-Y	0.106	0.033	0.000	-
Sequence-457-L	0.192	0.035	0.000	-
Sequence-458-E	0.076	0.007	0.000	-
Sequence-459-D	0.097	0.007	0.000	-
Sequence-460-G	0.079	0.007	0.000	-
Sequence-461-T	0.073	0.007	0.000	-
Sequence-462-G	0.083	0.007	0.000	-
Sequence-463-S	0.073	0.007	0.000	-
Sequence-464-A	0.087	0.007	0.000	-
Sequence-465-V	0.098	0.007	0.000	-
Sequence-466-S	0.075	0.007	0.000	-
Sequence-467-L	0.103	0.007	0.000	-
Sequence-468-E	0.071	0.000	0.000	-
//				

TRAIL-R2 (lange Isoform)

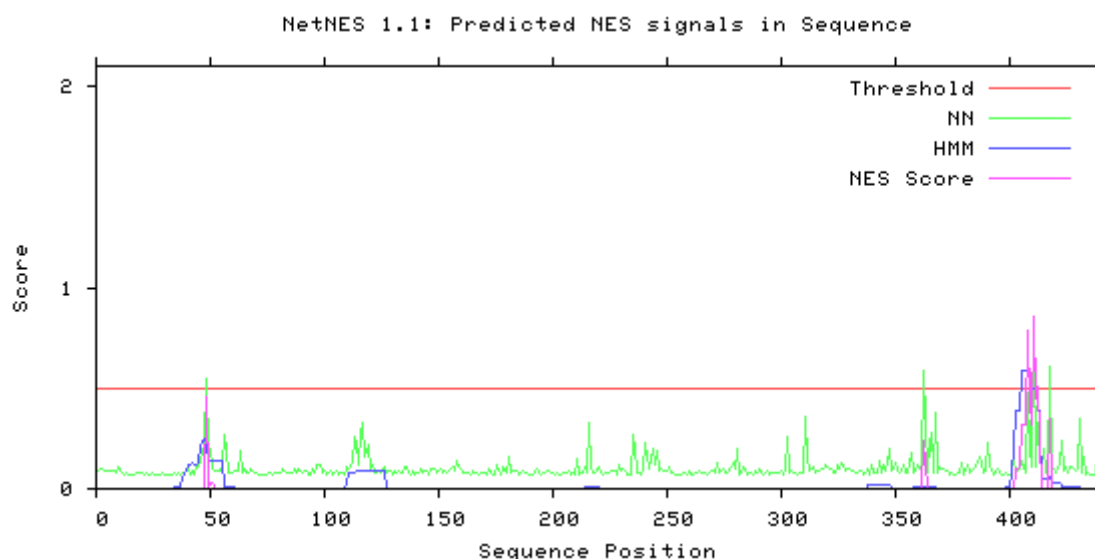


Abbildung 22: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R2 (lange Isoform)

Die Abszisse zeigt die Sequenzposition der langen Isoform von TRAIL-R2. Auf der Ordinate ist der Score abgebildet. Übersteigt der NES Score den Schwellenwert (*Threshold*), wird die Beteiligung an einem NES angenommen. NN = *neural network*, HMM = *hidden Markov model*

#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
#-----				
Sequence-1-M	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-2-E	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-3-Q	0.103	0.000	0.000	-
Sequence-4-R	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-5-G	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-6-Q	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-7-N	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-8-A	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-9-P	0.084	0.000	0.000	-

Sequence-10-A	0.108	0.000	0.000	-
Sequence-11-A	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-12-S	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-13-G	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-14-A	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-15-R	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-16-K	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-17-R	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-18-H	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-19-G	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-20-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-21-G	0.065	0.000	0.000	-
Sequence-22-P	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-23-R	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-24-E	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-25-A	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-26-R	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-27-G	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-28-A	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-29-R	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-30-P	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-31-G	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-32-P	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-33-R	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-34-V	0.075	0.009	0.000	-
Sequence-35-P	0.071	0.009	0.000	-
Sequence-36-K	0.077	0.013	0.000	-
Sequence-37-T	0.068	0.014	0.000	-
Sequence-38-L	0.078	0.062	0.000	-
Sequence-39-V	0.083	0.070	0.000	-
Sequence-40-L	0.100	0.122	0.000	-
Sequence-41-V	0.072	0.122	0.000	-
Sequence-42-V	0.089	0.125	0.000	-
Sequence-43-A	0.073	0.115	0.000	-
Sequence-44-A	0.118	0.115	0.000	-
Sequence-45-V	0.107	0.126	0.000	-
Sequence-46-L	0.139	0.217	0.000	-
Sequence-47-L	0.229	0.246	0.000	-
Sequence-48-L	0.547	0.206	0.459	-
Sequence-49-V	0.151	0.143	0.012	-
Sequence-50-S	0.203	0.139	0.026	-
Sequence-51-A	0.104	0.139	0.025	-
Sequence-52-E	0.088	0.139	0.015	-
Sequence-53-S	0.088	0.139	0.000	-
Sequence-54-A	0.093	0.139	0.000	-
Sequence-55-L	0.126	0.139	0.000	-
Sequence-56-I	0.271	0.013	0.000	-
Sequence-57-T	0.188	0.011	0.000	-
Sequence-58-Q	0.076	0.011	0.000	-
Sequence-59-Q	0.075	0.011	0.000	-
Sequence-60-D	0.082	0.011	0.000	-
Sequence-61-L	0.087	0.011	0.000	-
Sequence-62-A	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-63-P	0.186	0.000	0.000	-
Sequence-64-Q	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-65-Q	0.104	0.000	0.000	-
Sequence-66-R	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-67-A	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-68-A	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-69-P	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-70-Q	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-71-Q	0.074	0.000	0.000	-

Sequence-72-K	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-73-R	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-74-S	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-75-S	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-76-P	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-77-S	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-78-E	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-79-G	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-80-L	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-81-C	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-82-P	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-83-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-84-G	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-85-H	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-86-H	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-87-I	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-88-S	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-89-E	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-90-D	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-91-G	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-92-R	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-93-D	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-94-C	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-95-I	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-96-S	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-97-C	0.115	0.000	0.000	-
Sequence-98-K	0.116	0.000	0.000	-
Sequence-99-Y	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-100-G	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-101-Q	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-102-D	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-103-Y	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-104-S	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-105-T	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-106-H	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-107-W	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-108-N	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-109-D	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-110-L	0.106	0.032	0.000	-
Sequence-111-L	0.099	0.076	0.000	-
Sequence-112-F	0.128	0.085	0.000	-
Sequence-113-C	0.259	0.085	0.000	-
Sequence-114-L	0.231	0.086	0.000	-
Sequence-115-R	0.121	0.086	0.000	-
Sequence-116-C	0.291	0.086	0.000	-
Sequence-117-T	0.324	0.086	0.000	-
Sequence-118-R	0.160	0.086	0.000	-
Sequence-119-C	0.217	0.086	0.000	-
Sequence-120-D	0.092	0.086	0.000	-
Sequence-121-S	0.117	0.086	0.000	-
Sequence-122-G	0.075	0.086	0.000	-
Sequence-123-E	0.080	0.086	0.000	-
Sequence-124-V	0.092	0.086	0.000	-
Sequence-125-E	0.075	0.086	0.000	-
Sequence-126-L	0.109	0.086	0.000	-
Sequence-127-S	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-128-P	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-129-C	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-130-T	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-131-T	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-132-T	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-133-R	0.093	0.000	0.000	-

Sequence-134-N	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-135-T	0.106	0.000	0.000	-
Sequence-136-V	0.107	0.000	0.000	-
Sequence-137-C	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-138-Q	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-139-C	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-140-E	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-141-E	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-142-G	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-143-T	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-144-F	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-145-R	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-146-E	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-147-E	0.103	0.000	0.000	-
Sequence-148-D	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-149-S	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-150-P	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-151-E	0.104	0.000	0.000	-
Sequence-152-M	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-153-C	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-154-R	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-155-K	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-156-C	0.105	0.000	0.000	-
Sequence-157-R	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-158-T	0.143	0.000	0.000	-
Sequence-159-G	0.106	0.000	0.000	-
Sequence-160-C	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-161-P	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-162-R	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-163-G	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-164-M	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-165-V	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-166-K	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-167-V	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-168-G	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-169-D	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-170-C	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-171-T	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-172-P	0.100	0.000	0.000	-
Sequence-173-W	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-174-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-175-D	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-176-I	0.116	0.000	0.000	-
Sequence-177-E	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-178-C	0.110	0.000	0.000	-
Sequence-179-V	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-180-H	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-181-K	0.158	0.000	0.000	-
Sequence-182-E	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-183-S	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-184-G	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-185-T	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-186-K	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-187-H	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-188-S	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-189-G	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-190-E	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-191-V	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-192-P	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-193-A	0.101	0.000	0.000	-
Sequence-194-V	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-195-E	0.070	0.000	0.000	-

Sequence-196-E	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-197-T	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-198-V	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-199-T	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-200-S	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-201-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-202-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-203-G	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-204-T	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-205-P	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-206-A	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-207-S	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-208-P	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-209-C	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-210-S	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-211-L	0.145	0.002	0.000	-
Sequence-212-S	0.071	0.002	0.000	-
Sequence-213-G	0.079	0.002	0.000	-
Sequence-214-I	0.108	0.007	0.000	-
Sequence-215-I	0.079	0.007	0.000	-
Sequence-216-I	0.333	0.007	0.000	-
Sequence-217-G	0.099	0.007	0.000	-
Sequence-218-V	0.080	0.008	0.000	-
Sequence-219-T	0.082	0.008	0.000	-
Sequence-220-V	0.113	0.008	0.000	-
Sequence-221-A	0.078	0.002	0.000	-
Sequence-222-A	0.072	0.002	0.000	-
Sequence-223-V	0.081	0.002	0.000	-
Sequence-224-V	0.075	0.003	0.000	-
Sequence-225-L	0.083	0.004	0.000	-
Sequence-226-I	0.088	0.004	0.000	-
Sequence-227-V	0.092	0.004	0.000	-
Sequence-228-A	0.069	0.003	0.000	-
Sequence-229-V	0.124	0.004	0.000	-
Sequence-230-F	0.090	0.003	0.000	-
Sequence-231-V	0.102	0.003	0.000	-
Sequence-232-C	0.093	0.002	0.000	-
Sequence-233-K	0.072	0.002	0.000	-
Sequence-234-S	0.072	0.002	0.000	-
Sequence-235-L	0.265	0.002	0.000	-
Sequence-236-L	0.199	0.002	0.000	-
Sequence-237-W	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-238-K	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-239-K	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-240-V	0.105	0.000	0.000	-
Sequence-241-L	0.225	0.000	0.000	-
Sequence-242-P	0.101	0.000	0.000	-
Sequence-243-Y	0.150	0.000	0.000	-
Sequence-244-L	0.198	0.000	0.000	-
Sequence-245-K	0.115	0.000	0.000	-
Sequence-246-G	0.189	0.000	0.000	-
Sequence-247-I	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-248-C	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-249-S	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-250-G	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-251-G	0.111	0.000	0.000	-
Sequence-252-G	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-253-G	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-254-D	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-255-P	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-256-E	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-257-R	0.077	0.000	0.000	-

Sequence-258-V	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-259-D	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-260-R	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-261-S	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-262-S	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-263-Q	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-264-R	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-265-P	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-266-G	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-267-A	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-268-E	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-269-D	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-270-N	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-271-V	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-272-L	0.127	0.000	0.000	-
Sequence-273-N	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-274-E	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-275-I	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-276-V	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-277-S	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-278-I	0.114	0.000	0.000	-
Sequence-279-L	0.129	0.001	0.000	-
Sequence-280-Q	0.098	0.000	0.000	-
Sequence-281-P	0.197	0.000	0.000	-
Sequence-282-T	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-283-Q	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-284-V	0.112	0.001	0.000	-
Sequence-285-P	0.067	0.001	0.000	-
Sequence-286-E	0.077	0.001	0.000	-
Sequence-287-Q	0.084	0.001	0.000	-
Sequence-288-E	0.068	0.001	0.000	-
Sequence-289-M	0.086	0.001	0.000	-
Sequence-290-E	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-291-V	0.096	0.001	0.000	-
Sequence-292-Q	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-293-E	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-294-P	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-295-A	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-296-E	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-297-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-298-T	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-299-G	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-300-V	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-301-N	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-302-M	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-303-L	0.263	0.001	0.000	-
Sequence-304-S	0.077	0.001	0.000	-
Sequence-305-P	0.088	0.001	0.000	-
Sequence-306-G	0.076	0.001	0.000	-
Sequence-307-E	0.071	0.001	0.000	-
Sequence-308-S	0.082	0.001	0.000	-
Sequence-309-E	0.075	0.001	0.000	-
Sequence-310-H	0.077	0.001	0.000	-
Sequence-311-L	0.359	0.001	0.000	-
Sequence-312-L	0.148	0.001	0.000	-
Sequence-313-E	0.089	0.001	0.000	-
Sequence-314-P	0.111	0.001	0.000	-
Sequence-315-A	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-316-E	0.093	0.001	0.000	-
Sequence-317-A	0.094	0.001	0.000	-
Sequence-318-E	0.098	0.001	0.000	-
Sequence-319-R	0.096	0.001	0.000	-

Sequence-320-S	0.120	0.001	0.000	-
Sequence-321-Q	0.099	0.001	0.000	-
Sequence-322-R	0.097	0.001	0.000	-
Sequence-323-R	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-324-R	0.078	0.001	0.000	-
Sequence-325-L	0.120	0.001	0.000	-
Sequence-326-L	0.100	0.001	0.000	-
Sequence-327-V	0.132	0.001	0.000	-
Sequence-328-P	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-329-A	0.098	0.000	0.000	-
Sequence-330-N	0.100	0.000	0.000	-
Sequence-331-E	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-332-G	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-333-D	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-334-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-335-T	0.085	0.001	0.000	-
Sequence-336-E	0.072	0.001	0.000	-
Sequence-337-T	0.077	0.002	0.000	-
Sequence-338-L	0.096	0.024	0.000	-
Sequence-339-R	0.069	0.024	0.000	-
Sequence-340-Q	0.121	0.024	0.000	-
Sequence-341-C	0.080	0.024	0.000	-
Sequence-342-F	0.080	0.024	0.000	-
Sequence-343-D	0.138	0.024	0.000	-
Sequence-344-D	0.082	0.024	0.000	-
Sequence-345-F	0.122	0.024	0.000	-
Sequence-346-A	0.086	0.024	0.000	-
Sequence-347-D	0.144	0.024	0.000	-
Sequence-348-L	0.203	0.024	0.000	-
Sequence-349-V	0.086	0.002	0.000	-
Sequence-350-P	0.126	0.002	0.000	-
Sequence-351-F	0.089	0.002	0.000	-
Sequence-352-D	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-353-S	0.089	0.001	0.000	-
Sequence-354-W	0.122	0.001	0.000	-
Sequence-355-E	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-356-P	0.084	0.001	0.000	-
Sequence-357-L	0.176	0.003	0.000	-
Sequence-358-M	0.076	0.007	0.000	-
Sequence-359-R	0.104	0.007	0.000	-
Sequence-360-K	0.119	0.007	0.000	-
Sequence-361-L	0.099	0.008	0.000	-
Sequence-362-G	0.097	0.008	0.000	-
Sequence-363-L	0.588	0.008	0.236	-
Sequence-364-M	0.084	0.007	0.000	-
Sequence-365-D	0.238	0.007	0.000	-
Sequence-366-N	0.281	0.007	0.000	-
Sequence-367-E	0.083	0.007	0.000	-
Sequence-368-I	0.377	0.007	0.000	-
Sequence-369-K	0.076	0.002	0.000	-
Sequence-370-V	0.109	0.003	0.000	-
Sequence-371-A	0.096	0.001	0.000	-
Sequence-372-K	0.088	0.001	0.000	-
Sequence-373-A	0.085	0.001	0.000	-
Sequence-374-E	0.067	0.001	0.000	-
Sequence-375-A	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-376-A	0.073	0.001	0.000	-
Sequence-377-G	0.071	0.001	0.000	-
Sequence-378-H	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-379-R	0.127	0.001	0.000	-
Sequence-380-D	0.070	0.001	0.000	-
Sequence-381-T	0.103	0.001	0.000	-

Sequence-382-L	0.121	0.001	0.000	-
Sequence-383-Y	0.083	0.001	0.000	-
Sequence-384-T	0.086	0.001	0.000	-
Sequence-385-M	0.104	0.001	0.000	-
Sequence-386-L	0.142	0.001	0.000	-
Sequence-387-I	0.160	0.001	0.000	-
Sequence-388-K	0.118	0.000	0.000	-
Sequence-389-W	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-390-V	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-391-N	0.228	0.000	0.000	-
Sequence-392-K	0.109	0.000	0.000	-
Sequence-393-T	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-394-G	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-395-R	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-396-D	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-397-A	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-398-S	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-399-V	0.077	0.008	0.000	-
Sequence-400-H	0.070	0.008	0.000	-
Sequence-401-T	0.087	0.093	0.000	-
Sequence-402-L	0.152	0.207	0.000	-
Sequence-403-L	0.078	0.393	0.100	-
Sequence-404-D	0.095	0.393	0.104	-
Sequence-405-A	0.097	0.393	0.108	-
Sequence-406-L	0.137	0.589	0.318	-
Sequence-407-E	0.084	0.589	0.318	-
Sequence-408-T	0.475	0.589	0.782	Yes
Sequence-409-L	0.204	0.596	0.414	-
Sequence-410-G	0.105	0.501	0.321	-
Sequence-411-E	0.706	0.501	0.857	Yes
Sequence-412-R	0.106	0.501	0.451	-
Sequence-413-L	0.324	0.511	0.509	Yes
Sequence-414-A	0.091	0.053	0.000	-
Sequence-415-K	0.197	0.054	0.000	-
Sequence-416-Q	0.075	0.054	0.000	-
Sequence-417-K	0.082	0.054	0.000	-
Sequence-418-I	0.608	0.057	0.345	-
Sequence-419-E	0.086	0.032	0.000	-
Sequence-420-D	0.096	0.032	0.000	-
Sequence-421-H	0.081	0.032	0.000	-
Sequence-422-L	0.133	0.034	0.000	-
Sequence-423-L	0.234	0.012	0.000	-
Sequence-424-S	0.086	0.010	0.000	-
Sequence-425-S	0.109	0.010	0.000	-
Sequence-426-G	0.081	0.010	0.000	-
Sequence-427-K	0.114	0.010	0.000	-
Sequence-428-F	0.108	0.010	0.000	-
Sequence-429-M	0.088	0.010	0.000	-
Sequence-430-Y	0.105	0.010	0.000	-
Sequence-431-L	0.344	0.010	0.000	-
Sequence-432-E	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-433-G	0.156	0.000	0.000	-
Sequence-434-N	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-435-A	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-436-D	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-437-S	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-438-A	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-439-M	0.179	0.000	0.000	-
Sequence-440-S	0.071	0.000	0.000	-
//				

TRAIL-R3

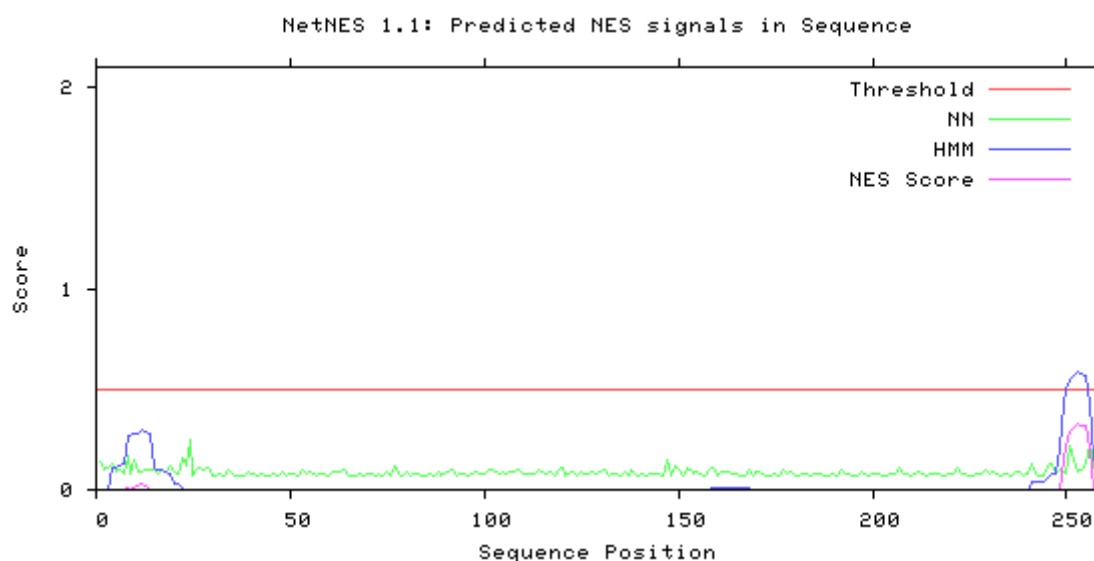


Abbildung 23: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R3

Die Abszisse zeigt die Sequenzposition von TRAIL-R3. Auf der Ordinate ist der Score abgebildet. Übersteigt der NES Score den Schwellenwert (*Threshold*), wird die Beteiligung an einem NES angenommen. NN = *neural network*, HMM = *hidden Markov model*

#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
#-----	-----	-----	-----	-----
Sequence-1-M	0.144	0.000	0.000	-
Sequence-2-A	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-3-R	0.114	0.000	0.000	-
Sequence-4-I	0.126	0.109	0.000	-
Sequence-5-P	0.089	0.109	0.000	-
Sequence-6-K	0.102	0.122	0.000	-
Sequence-7-T	0.081	0.126	0.000	-
Sequence-8-L	0.168	0.271	0.007	-
Sequence-9-K	0.082	0.272	0.001	-
Sequence-10-F	0.153	0.274	0.009	-
Sequence-11-V	0.090	0.281	0.017	-
Sequence-12-V	0.089	0.300	0.033	-
Sequence-13-V	0.101	0.286	0.023	-
Sequence-14-I	0.102	0.279	0.002	-
Sequence-15-V	0.102	0.107	0.000	-
Sequence-16-A	0.076	0.096	0.000	-
Sequence-17-V	0.103	0.096	0.000	-
Sequence-18-L	0.093	0.090	0.000	-
Sequence-19-L	0.122	0.084	0.000	-
Sequence-20-P	0.087	0.025	0.000	-
Sequence-21-V	0.082	0.025	0.000	-
Sequence-22-L	0.159	0.013	0.000	-
Sequence-23-A	0.116	0.001	0.000	-
Sequence-24-Y	0.248	0.001	0.000	-
Sequence-25-S	0.073	0.001	0.000	-
Sequence-26-A	0.100	0.001	0.000	-
Sequence-27-T	0.111	0.001	0.000	-
Sequence-28-T	0.101	0.001	0.000	-
Sequence-29-A	0.113	0.001	0.000	-
Sequence-30-R	0.073	0.001	0.000	-
Sequence-31-Q	0.070	0.001	0.000	-
Sequence-32-E	0.080	0.001	0.000	-

Sequence-33-E	0.065	0.001	0.000	-
Sequence-34-V	0.101	0.001	0.000	-
Sequence-35-P	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-36-Q	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-37-Q	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-38-T	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-39-V	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-40-A	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-41-P	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-42-Q	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-43-Q	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-44-Q	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-45-R	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-46-H	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-47-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-48-F	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-49-K	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-50-G	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-51-E	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-52-E	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-53-C	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-54-P	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-55-A	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-56-G	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-57-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-58-H	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-59-R	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-60-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-61-E	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-62-H	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-63-T	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-64-G	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-65-A	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-66-C	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-67-N	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-68-P	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-69-C	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-70-T	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-71-E	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-72-G	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-73-V	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-74-D	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-75-Y	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-76-T	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-77-N	0.120	0.000	0.000	-
Sequence-78-A	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-79-S	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-80-N	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-81-N	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-82-E	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-83-P	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-84-S	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-85-C	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-86-F	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-87-P	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-88-C	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-89-T	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-90-V	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-91-C	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-92-K	0.104	0.000	0.000	-
Sequence-93-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-94-D	0.077	0.000	0.000	-

Sequence-95-Q	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-96-K	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-97-H	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-98-K	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-99-S	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-100-S	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-101-C	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-102-T	0.102	0.000	0.000	-
Sequence-103-M	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-104-T	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-105-R	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-106-D	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-107-T	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-108-V	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-109-C	0.098	0.000	0.000	-
Sequence-110-Q	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-111-C	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-112-K	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-113-E	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-114-G	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-115-T	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-116-F	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-117-R	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-118-N	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-119-E	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-120-N	0.105	0.000	0.000	-
Sequence-121-S	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-122-P	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-123-E	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-124-M	0.069	0.004	0.000	-
Sequence-125-C	0.091	0.004	0.000	-
Sequence-126-R	0.081	0.004	0.000	-
Sequence-127-K	0.075	0.004	0.000	-
Sequence-128-C	0.093	0.004	0.000	-
Sequence-129-S	0.078	0.004	0.000	-
Sequence-130-R	0.091	0.004	0.000	-
Sequence-131-C	0.101	0.004	0.000	-
Sequence-132-P	0.074	0.004	0.000	-
Sequence-133-S	0.080	0.004	0.000	-
Sequence-134-G	0.076	0.004	0.000	-
Sequence-135-E	0.073	0.004	0.000	-
Sequence-136-V	0.089	0.004	0.000	-
Sequence-137-Q	0.071	0.004	0.000	-
Sequence-138-V	0.098	0.004	0.000	-
Sequence-139-S	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-140-N	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-141-C	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-142-T	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-143-S	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-144-W	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-145-D	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-146-D	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-147-I	0.150	0.000	0.000	-
Sequence-148-Q	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-149-C	0.123	0.000	0.000	-
Sequence-150-V	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-151-E	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-152-E	0.113	0.000	0.000	-
Sequence-153-F	0.101	0.000	0.000	-
Sequence-154-G	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-155-A	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-156-N	0.075	0.000	0.000	-

Sequence-157-A	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-158-T	0.099	0.001	0.000	-
Sequence-159-V	0.108	0.012	0.000	-
Sequence-160-E	0.069	0.012	0.000	-
Sequence-161-T	0.085	0.014	0.000	-
Sequence-162-P	0.085	0.014	0.000	-
Sequence-163-A	0.085	0.014	0.000	-
Sequence-164-A	0.084	0.014	0.000	-
Sequence-165-E	0.076	0.014	0.000	-
Sequence-166-E	0.073	0.014	0.000	-
Sequence-167-T	0.072	0.014	0.000	-
Sequence-168-M	0.096	0.014	0.000	-
Sequence-169-N	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-170-T	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-171-S	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-172-P	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-173-G	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-174-T	0.070	0.003	0.000	-
Sequence-175-P	0.077	0.003	0.000	-
Sequence-176-A	0.072	0.003	0.000	-
Sequence-177-P	0.095	0.003	0.000	-
Sequence-178-A	0.076	0.003	0.000	-
Sequence-179-A	0.086	0.003	0.000	-
Sequence-180-E	0.072	0.003	0.000	-
Sequence-181-E	0.070	0.003	0.000	-
Sequence-182-T	0.084	0.003	0.000	-
Sequence-183-M	0.075	0.003	0.000	-
Sequence-184-N	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-185-T	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-186-S	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-187-P	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-188-G	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-189-T	0.071	0.002	0.000	-
Sequence-190-P	0.079	0.002	0.000	-
Sequence-191-A	0.073	0.002	0.000	-
Sequence-192-P	0.095	0.002	0.000	-
Sequence-193-A	0.078	0.002	0.000	-
Sequence-194-A	0.083	0.002	0.000	-
Sequence-195-E	0.072	0.002	0.000	-
Sequence-196-E	0.070	0.002	0.000	-
Sequence-197-T	0.087	0.002	0.000	-
Sequence-198-M	0.075	0.003	0.000	-
Sequence-199-T	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-200-T	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-201-S	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-202-P	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-203-G	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-204-T	0.071	0.002	0.000	-
Sequence-205-P	0.077	0.002	0.000	-
Sequence-206-A	0.076	0.002	0.000	-
Sequence-207-P	0.108	0.002	0.000	-
Sequence-208-A	0.078	0.002	0.000	-
Sequence-209-A	0.082	0.002	0.000	-
Sequence-210-E	0.074	0.002	0.000	-
Sequence-211-E	0.076	0.002	0.000	-
Sequence-212-T	0.089	0.002	0.000	-
Sequence-213-M	0.076	0.002	0.000	-
Sequence-214-T	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-215-T	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-216-S	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-217-P	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-218-G	0.070	0.000	0.000	-

Sequence-219-T	0.071	0.001	0.000	-
Sequence-220-P	0.080	0.001	0.000	-
Sequence-221-A	0.076	0.001	0.000	-
Sequence-222-P	0.111	0.001	0.000	-
Sequence-223-A	0.076	0.001	0.000	-
Sequence-224-A	0.082	0.001	0.000	-
Sequence-225-E	0.070	0.001	0.000	-
Sequence-226-E	0.074	0.001	0.000	-
Sequence-227-T	0.080	0.001	0.000	-
Sequence-228-M	0.077	0.001	0.000	-
Sequence-229-I	0.104	0.000	0.000	-
Sequence-230-T	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-231-S	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-232-P	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-233-G	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-234-T	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-235-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-236-A	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-237-S	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-238-S	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-239-H	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-240-Y	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-241-L	0.130	0.040	0.000	-
Sequence-242-S	0.075	0.040	0.000	-
Sequence-243-C	0.074	0.040	0.000	-
Sequence-244-T	0.073	0.042	0.000	-
Sequence-245-I	0.120	0.061	0.000	-
Sequence-246-V	0.128	0.077	0.000	-
Sequence-247-G	0.076	0.077	0.000	-
Sequence-248-I	0.104	0.205	0.000	-
Sequence-249-I	0.091	0.428	0.146	-
Sequence-250-V	0.084	0.498	0.218	-
Sequence-251-L	0.218	0.552	0.292	-
Sequence-252-I	0.145	0.569	0.312	-
Sequence-253-V	0.093	0.584	0.331	-
Sequence-254-L	0.095	0.577	0.322	-
Sequence-255-L	0.125	0.569	0.321	-
Sequence-256-I	0.224	0.426	0.206	-
Sequence-257-V	0.108	0.146	0.000	-
Sequence-258-F	0.087	0.131	0.000	-
Sequence-259-V	0.150	0.000	0.000	-
//				

TRAIL-R4

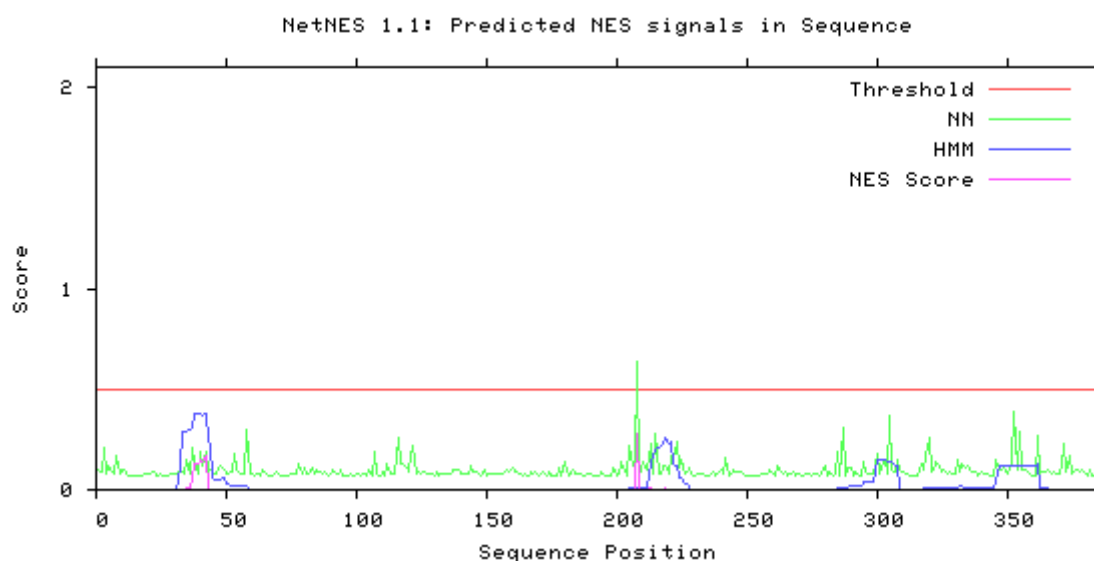


Abbildung 24: Ermittlung potenzieller NES bei TRAIL-R4

Die Abszisse zeigt die Sequenzposition von TRAIL-R4. Auf der Ordinate ist der Score abgebildet. Übersteigt der NES Score den Schwellenwert (*Threshold*), wird die Beteiligung an einem NES angenommen. NN = *neural network*, HMM = *hidden Markov model*

#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
#-----	-----	-----	-----	-----
Sequence-1-M	0.102	0.000	0.000	-
Sequence-2-G	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-3-L	0.209	0.000	0.000	-
Sequence-4-W	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-5-G	0.118	0.000	0.000	-
Sequence-6-Q	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-7-S	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-8-V	0.173	0.000	0.000	-
Sequence-9-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-10-T	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-11-A	0.102	0.000	0.000	-
Sequence-12-S	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-13-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-14-A	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-15-R	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-16-A	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-17-G	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-18-R	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-19-Y	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-20-P	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-21-G	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-22-A	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-23-R	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-24-T	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-25-A	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-26-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-27-G	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-28-T	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-29-R	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-30-P	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-31-W	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-32-L	0.100	0.120	0.000	-

Sequence-33-L	0.089	0.291	0.000	-
Sequence-34-D	0.078	0.291	0.000	-
Sequence-35-P	0.151	0.291	0.005	-
Sequence-36-K	0.079	0.299	0.014	-
Sequence-37-I	0.205	0.319	0.059	-
Sequence-38-L	0.143	0.378	0.127	-
Sequence-39-K	0.082	0.379	0.126	-
Sequence-40-F	0.191	0.380	0.150	-
Sequence-41-V	0.119	0.373	0.137	-
Sequence-42-V	0.194	0.379	0.166	-
Sequence-43-F	0.088	0.241	0.005	-
Sequence-44-I	0.102	0.228	0.000	-
Sequence-45-V	0.089	0.056	0.000	-
Sequence-46-A	0.078	0.049	0.000	-
Sequence-47-V	0.110	0.055	0.000	-
Sequence-48-L	0.116	0.053	0.000	-
Sequence-49-L	0.101	0.056	0.000	-
Sequence-50-P	0.083	0.027	0.000	-
Sequence-51-V	0.077	0.028	0.000	-
Sequence-52-R	0.085	0.024	0.000	-
Sequence-53-V	0.178	0.024	0.000	-
Sequence-54-D	0.096	0.015	0.000	-
Sequence-55-S	0.087	0.015	0.000	-
Sequence-56-A	0.082	0.015	0.000	-
Sequence-57-T	0.081	0.015	0.000	-
Sequence-58-I	0.302	0.015	0.000	-
Sequence-59-P	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-60-R	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-61-Q	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-62-D	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-63-E	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-64-V	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-65-P	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-66-Q	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-67-Q	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-68-T	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-69-V	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-70-A	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-71-P	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-72-Q	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-73-Q	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-74-Q	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-75-R	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-76-R	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-77-S	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-78-L	0.128	0.000	0.000	-
Sequence-79-K	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-80-E	0.110	0.000	0.000	-
Sequence-81-E	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-82-E	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-83-C	0.108	0.000	0.000	-
Sequence-84-P	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-85-A	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-86-G	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-87-S	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-88-H	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-89-R	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-90-S	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-91-E	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-92-Y	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-93-T	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-94-G	0.099	0.000	0.000	-

Sequence-95-A	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-96-C	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-97-N	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-98-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-99-C	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-100-T	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-101-E	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-102-G	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-103-V	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-104-D	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-105-Y	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-106-T	0.068	0.000	0.000	-
Sequence-107-I	0.190	0.000	0.000	-
Sequence-108-A	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-109-S	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-110-N	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-111-N	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-112-L	0.127	0.000	0.000	-
Sequence-113-P	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-114-S	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-115-C	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-116-L	0.262	0.000	0.000	-
Sequence-117-L	0.126	0.000	0.000	-
Sequence-118-C	0.127	0.000	0.000	-
Sequence-119-T	0.105	0.000	0.000	-
Sequence-120-V	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-121-C	0.176	0.000	0.000	-
Sequence-122-K	0.220	0.000	0.000	-
Sequence-123-S	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-124-G	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-125-Q	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-126-T	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-127-N	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-128-K	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-129-S	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-130-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-131-C	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-132-T	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-133-T	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-134-T	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-135-R	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-136-D	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-137-T	0.097	0.000	0.000	-
Sequence-138-V	0.104	0.000	0.000	-
Sequence-139-C	0.100	0.000	0.000	-
Sequence-140-Q	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-141-C	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-142-E	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-143-K	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-144-G	0.115	0.000	0.000	-
Sequence-145-S	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-146-F	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-147-Q	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-148-D	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-149-K	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-150-N	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-151-S	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-152-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-153-E	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-154-M	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-155-C	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-156-R	0.077	0.000	0.000	-

Sequence-157-T	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-158-C	0.100	0.000	0.000	-
Sequence-159-R	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-160-T	0.108	0.000	0.000	-
Sequence-161-G	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-162-C	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-163-P	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-164-R	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-165-G	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-166-M	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-167-V	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-168-K	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-169-V	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-170-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-171-N	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-172-C	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-173-T	0.066	0.000	0.000	-
Sequence-174-P	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-175-R	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-176-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-177-D	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-178-I	0.114	0.000	0.000	-
Sequence-179-K	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-180-C	0.141	0.000	0.000	-
Sequence-181-K	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-182-N	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-183-E	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-184-S	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-185-A	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-186-A	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-187-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-188-S	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-189-T	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-190-G	0.082	0.000	0.000	-
Sequence-191-K	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-192-T	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-193-P	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-194-A	0.088	0.000	0.000	-
Sequence-195-A	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-196-E	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-197-E	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-198-T	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-199-V	0.110	0.001	0.000	-
Sequence-200-T	0.069	0.001	0.000	-
Sequence-201-T	0.084	0.001	0.000	-
Sequence-202-I	0.137	0.001	0.000	-
Sequence-203-L	0.092	0.004	0.000	-
Sequence-204-G	0.073	0.004	0.000	-
Sequence-205-M	0.214	0.005	0.000	-
Sequence-206-L	0.115	0.011	0.000	-
Sequence-207-A	0.120	0.011	0.000	-
Sequence-208-S	0.637	0.011	0.274	-
Sequence-209-P	0.070	0.011	0.000	-
Sequence-210-Y	0.139	0.011	0.000	-
Sequence-211-H	0.107	0.011	0.000	-
Sequence-212-Y	0.100	0.011	0.000	-
Sequence-213-L	0.228	0.141	0.010	-
Sequence-214-I	0.077	0.175	0.000	-
Sequence-215-I	0.277	0.200	0.000	-
Sequence-216-I	0.081	0.207	0.000	-
Sequence-217-V	0.084	0.223	0.000	-
Sequence-218-V	0.124	0.226	0.000	-

Sequence-219-L	0.124	0.260	0.013	-
Sequence-220-V	0.083	0.230	0.000	-
Sequence-221-I	0.172	0.236	0.000	-
Sequence-222-I	0.150	0.133	0.000	-
Sequence-223-L	0.239	0.124	0.000	-
Sequence-224-A	0.113	0.061	0.000	-
Sequence-225-V	0.152	0.061	0.000	-
Sequence-226-V	0.076	0.031	0.000	-
Sequence-227-V	0.094	0.029	0.000	-
Sequence-228-V	0.106	0.008	0.000	-
Sequence-229-G	0.077	0.002	0.000	-
Sequence-230-F	0.073	0.002	0.000	-
Sequence-231-S	0.078	0.001	0.000	-
Sequence-232-C	0.080	0.001	0.000	-
Sequence-233-R	0.079	0.001	0.000	-
Sequence-234-K	0.070	0.001	0.000	-
Sequence-235-K	0.070	0.001	0.000	-
Sequence-236-F	0.072	0.001	0.000	-
Sequence-237-I	0.089	0.001	0.000	-
Sequence-238-S	0.074	0.001	0.000	-
Sequence-239-Y	0.083	0.001	0.000	-
Sequence-240-L	0.102	0.001	0.000	-
Sequence-241-K	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-242-G	0.164	0.000	0.000	-
Sequence-243-I	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-244-C	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-245-S	0.103	0.000	0.000	-
Sequence-246-G	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-247-G	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-248-G	0.089	0.000	0.000	-
Sequence-249-G	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-250-G	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-251-P	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-252-E	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-253-R	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-254-V	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-255-H	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-256-R	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-257-V	0.075	0.000	0.000	-
Sequence-258-L	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-259-F	0.103	0.000	0.000	-
Sequence-260-R	0.080	0.000	0.000	-
Sequence-261-R	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-262-R	0.115	0.000	0.000	-
Sequence-263-S	0.094	0.000	0.000	-
Sequence-264-C	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-265-P	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-266-S	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-267-R	0.076	0.000	0.000	-
Sequence-268-V	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-269-P	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-270-G	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-271-A	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-272-E	0.067	0.000	0.000	-
Sequence-273-D	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-274-N	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-275-A	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-276-R	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-277-N	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-278-E	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-279-T	0.092	0.000	0.000	-
Sequence-280-L	0.118	0.000	0.000	-

Sequence-281-S	0.069	0.000	0.000	-
Sequence-282-N	0.093	0.000	0.000	-
Sequence-283-R	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-284-Y	0.090	0.000	0.000	-
Sequence-285-L	0.186	0.007	0.000	-
Sequence-286-Q	0.069	0.007	0.000	-
Sequence-287-P	0.312	0.007	0.000	-
Sequence-288-T	0.070	0.008	0.000	-
Sequence-289-Q	0.110	0.008	0.000	-
Sequence-290-V	0.110	0.016	0.000	-
Sequence-291-S	0.068	0.016	0.000	-
Sequence-292-E	0.086	0.016	0.000	-
Sequence-293-Q	0.072	0.016	0.000	-
Sequence-294-E	0.066	0.016	0.000	-
Sequence-295-I	0.144	0.043	0.000	-
Sequence-296-Q	0.086	0.042	0.000	-
Sequence-297-G	0.081	0.042	0.000	-
Sequence-298-Q	0.081	0.042	0.000	-
Sequence-299-E	0.075	0.042	0.000	-
Sequence-300-L	0.179	0.148	0.000	-
Sequence-301-A	0.082	0.148	0.000	-
Sequence-302-E	0.119	0.148	0.000	-
Sequence-303-L	0.145	0.148	0.000	-
Sequence-304-T	0.079	0.136	0.000	-
Sequence-305-G	0.366	0.136	0.000	-
Sequence-306-V	0.096	0.136	0.000	-
Sequence-307-T	0.085	0.116	0.000	-
Sequence-308-V	0.151	0.116	0.000	-
Sequence-309-E	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-310-S	0.091	0.000	0.000	-
Sequence-311-P	0.079	0.000	0.000	-
Sequence-312-E	0.081	0.000	0.000	-
Sequence-313-E	0.071	0.000	0.000	-
Sequence-314-P	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-315-Q	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-316-R	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-317-L	0.128	0.003	0.000	-
Sequence-318-L	0.099	0.007	0.000	-
Sequence-319-E	0.178	0.007	0.000	-
Sequence-320-Q	0.254	0.007	0.000	-
Sequence-321-A	0.090	0.007	0.000	-
Sequence-322-E	0.102	0.007	0.000	-
Sequence-323-A	0.140	0.007	0.000	-
Sequence-324-E	0.120	0.007	0.000	-
Sequence-325-G	0.092	0.007	0.000	-
Sequence-326-C	0.103	0.007	0.000	-
Sequence-327-Q	0.081	0.007	0.000	-
Sequence-328-R	0.085	0.007	0.000	-
Sequence-329-R	0.077	0.007	0.000	-
Sequence-330-R	0.079	0.007	0.000	-
Sequence-331-L	0.150	0.011	0.000	-
Sequence-332-L	0.093	0.016	0.000	-
Sequence-333-V	0.130	0.017	0.000	-
Sequence-334-P	0.105	0.011	0.000	-
Sequence-335-V	0.121	0.011	0.000	-
Sequence-336-N	0.100	0.011	0.000	-
Sequence-337-D	0.087	0.011	0.000	-
Sequence-338-A	0.088	0.011	0.000	-
Sequence-339-D	0.074	0.011	0.000	-
Sequence-340-S	0.089	0.011	0.000	-
Sequence-341-A	0.081	0.011	0.000	-
Sequence-342-D	0.078	0.011	0.000	-

Sequence-343-I	0.083	0.014	0.000	-
Sequence-344-S	0.069	0.013	0.000	-
Sequence-345-T	0.074	0.014	0.000	-
Sequence-346-L	0.150	0.049	0.000	-
Sequence-347-L	0.104	0.121	0.000	-
Sequence-348-D	0.100	0.120	0.000	-
Sequence-349-A	0.110	0.120	0.000	-
Sequence-350-S	0.084	0.120	0.000	-
Sequence-351-A	0.108	0.120	0.000	-
Sequence-352-T	0.151	0.120	0.000	-
Sequence-353-L	0.392	0.124	0.000	-
Sequence-354-E	0.095	0.123	0.000	-
Sequence-355-E	0.284	0.123	0.000	-
Sequence-356-G	0.096	0.123	0.000	-
Sequence-357-H	0.098	0.123	0.000	-
Sequence-358-A	0.086	0.123	0.000	-
Sequence-359-K	0.083	0.123	0.000	-
Sequence-360-E	0.070	0.123	0.000	-
Sequence-361-T	0.073	0.123	0.000	-
Sequence-362-I	0.264	0.124	0.000	-
Sequence-363-Q	0.082	0.015	0.000	-
Sequence-364-D	0.093	0.015	0.000	-
Sequence-365-Q	0.094	0.015	0.000	-
Sequence-366-L	0.099	0.015	0.000	-
Sequence-367-V	0.081	0.001	0.000	-
Sequence-368-G	0.087	0.001	0.000	-
Sequence-369-S	0.079	0.001	0.000	-
Sequence-370-E	0.083	0.001	0.000	-
Sequence-371-K	0.127	0.001	0.000	-
Sequence-372-L	0.230	0.001	0.000	-
Sequence-373-F	0.086	0.000	0.000	-
Sequence-374-Y	0.174	0.000	0.000	-
Sequence-375-E	0.077	0.000	0.000	-
Sequence-376-E	0.085	0.000	0.000	-
Sequence-377-D	0.095	0.000	0.000	-
Sequence-378-E	0.087	0.000	0.000	-
Sequence-379-A	0.103	0.000	0.000	-
Sequence-380-G	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-381-S	0.073	0.000	0.000	-
Sequence-382-A	0.096	0.000	0.000	-
Sequence-383-T	0.074	0.000	0.000	-
Sequence-384-S	0.070	0.000	0.000	-
Sequence-385-C	0.099	0.000	0.000	-
Sequence-386-L	0.095	0.000	0.000	-
//				

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof Dr. rer. nat. Anna Trauzold bedanken für die Überlassung des interessanten Themas, für die konstruktive Kritik und für die fachliche als auch persönliche Unterstützung.

Mein Dank geht an alle Mitglieder der AG für Molekulare Onkologie, die mich oftmals durch wertvolle Ratschläge im Rahmen meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Herzlich danken möchte ich Herrn Gökhan Alp für die Einweisung in die praktische Laborarbeit, die stets geduldige Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Röder danke ich sehr für die kompetente Unterstützung bei inhaltlichen und technischen Fragen. Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. rer. nat. Doaa Tawfik El-Sheikh, die mir im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Herzlicher Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. Ole Helm für die Einführung in die Methodik der Durchflusszytometrie.

An meinen Kommilitonen Steven Singh richtet sich mein freundschaftlicher Dank für die humorvolle gemeinsame Zeit im Labor und die Kollegialität.

Mein sehr persönlicher Dank gilt meiner Partnerin Marieke Domdey für die liebevolle Motivierung zur Vollendung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere bei meinen Eltern, Großeltern und meinem Paten Heinz bedanken, die mich seit jeher ideell, persönlich und finanziell gefördert haben und ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Veröffentlichungen

Teichmann, P., Scharff, E., Haselmann, V., Adawy, A., Fritsch, J. & Trauzold, A. (Januar 2018). Molecular mechanisms of nuclear transport of TRAIL-R2 in pancreatic tumor cells. *Postervorstellung im Rahmen der 38. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V. in Ulm*

Mert, U., Adawy, A., Scharff, E., Teichmann, P., Willms, A., Haselmann, V., Colmorgen, C., Lemke, J., von Karstedt, S., Fritsch, J. & Trauzold, A. (2019). TRAIL Induces Nuclear Translocation and Chromatin Localization of TRAIL Death Receptors, *Cancers (Basel)*., 11(8), 1167.