

**Die Rolle des TRADD Adapterproteins in der
Signaltransduktion des zellulären TNF-Rezeptors 1
und des Latenten Membranproteins 1
des Epstein-Barr-Virus**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von
Frank Schneider
München, März 2005**

Dissertation eingereicht am 24.03.2005

Erstgutachter Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter Prof. Dr. Charles David

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2005

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht oder sind in Vorbereitung zur Veröffentlichung:

Schneider, F. and Kieser, A. (2004) A novel assay to quantify cell death after transient expression of apoptotic genes in B- and T-lymphocytes. *J Immunol Methods*, **292**, 165-174.

Schneider, F., Briseño, C., Kutz, H., Kaiser, C. and Kieser, A. (2005) The genetic knockout of TRADD in human B-cells defines its function in TNF-receptor 1 signal transduction (*Manuskript in Vorbereitung*)

*für meine Eltern
und Natalia*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	9
1.1. Die Familie der Todesdomänen-Proteine	9
1.2. Das Todesdomänen-Protein TRADD	11
1.3. Signaltransduktion durch Tumornekrosefaktor α (TNFα)	14
1.3.1. Das Zytokin TNF α	14
1.3.2. Struktureller Aufbau der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren 1 und 2.....	15
1.3.3. Signaltransduktion durch TNF-Rezeptor 1	17
1.4. Das Latente Membranprotein 1 (LMP1) des Epstein-Barr-Virus	25
1.4.1. LMP1 als Onkogen des Epstein-Barr-Virus	25
1.4.2. Struktureller Aufbau von LMP1	27
1.4.3. Signaltransduktion durch LMP1	29
1.5. Aufgabenstellung	34
2. MATERIAL	35
2.1. Antikörper	35
2.2. Plasmide	36
2.3. Oligonukleotide	40
2.4. Humane Zelllinien	42
2.5. Bakterien	43
2.6. Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien	43
3. METHODEN	46
3.1. Bakterienkultur	46
3.1.1. Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen	46
3.1.2. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	46
3.2. Zellkultur	47
3.2.1. Zellkulturbedingungen.....	47
3.2.1.1. Adhärent wachsende Zelllinien.....	47
3.2.1.2. Suspensionszelllinien	47

3.2.1.3. <i>Bestimmung der Zellzahl in Kultur</i>	48
3.2.2. Aufbewahrung von Zellen über längere Zeiträume	48
3.2.3. Elektroporation humaner Zelllinien.....	48
3.2.4. Transfektion von siRNA Oligonukleotiden in HeLa Zellen.....	49
3.2.5. Durchflusszytometrie (FACS-Analysen).....	50
3.3. DNA-Arbeitstechniken	51
3.3.1. Plasmid-Schnellaufreinigung.....	51
3.3.2. Präparative Plasmidaufreinigung	51
3.3.3. Sonstige DNA-Arbeitstechniken	51
3.4. RNA-Arbeitstechniken	52
3.4.1. Isolierung gesamtzellulärer RNA	52
3.4.2. Reverse Transkription zellulärer RNA	52
3.5. Protein-Arbeitstechniken	53
3.5.1. Immunoblot-Analyse	53
3.5.2. Immunkomplex-Kinaseversuch	54
3.5.2.1. <i>Immobilisierung von α-HA-Epitop Antikörpern an Protein G-Sepharose</i> <i>Kügelchen</i>	54
3.5.2.2. <i>Immunpräzipitation von HA- oder Flag- fusionierten Proteinen aus</i> <i>Zelllysaten</i>	55
3.5.3. Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>	56
3.5.4. GST-Kopräzipitationsversuche.....	57
3.5.5. Isolierung „ <i>lipid raft</i> “ assoziierter Proteine	57
3.5.6. Luziferase-Reportergen Versuche	58
3.6. Spezielle Techniken für das Gentergeting in humanen B-Zellen („somatischer <i>knockout</i>“)	59
3.6.1. Transfektion der <i>TRADD</i> -Gentergeting Vektoren in humane B-Zellen.....	59
3.6.2. Selektion	60
3.6.3. Isolierung genomischer DNA aus selektionierten Einzelzellklonen	61
3.6.4. Southern-Blot Analyse.....	61
3.6.5. Radioaktive Markierung von DNA.....	62
3.6.6. Cre-Rekombinase Reaktion in DG75 Zellen	63

4. ERGEBNISSE.....	64
4.1. Vorbereitende Arbeiten zur Auswahl einer geeigneten Zelllinie für das somatische Gentergeting des humanen <i>TRADD</i> Gens	64
4.1.1. FISH-Analyse zur Bestimmung des <i>TRADD</i> Genotyps in Kandidatenzelllinien	65
4.1.2. Untersuchung der Expression von TNF-Rezeptor 1 und 2 in den Kandidatenzelllinien	67
4.2. Entwicklung einer neuen Methode zur Analyse von Zelltod nach transienter Transfektion Apoptose induzierender Gene in B- und T- Zellen.....	69
4.2.1. Prinzip der Methode.....	69
4.2.2. Optimierung der Elektroporationsbedingungen.....	71
4.2.3. Analyse der zeitabhängigen Expression von GFP nach Elektroporation	73
4.2.4. Analyse von Zelltod nach transienter Expression von <i>TRADD</i>	73
4.2.5. <i>TRADD</i> -induzierte Apoptose ist abhängig von Caspasen	77
4.3. Somatisches Gentergeting des <i>TRADD</i> Gens in humanen B-Lymphozyten	80
4.3.1. Die <i>TRADD</i> -Gentergeting Strategie	80
4.3.2. Klonierung der <i>TRADD</i> -Gentergeting Vektoren p <i>TRADD</i> ko.1 und p <i>TRADD</i> ko.2.....	83
4.3.3. Herstellung <i>TRADD</i> -defizienter B-Zellen durch homologe Rekombination.....	86
4.3.4. Morphologie und Viabilität der hergestellten <i>TRADD</i> -defizienten DG75 Klone	90
4.4. Charakterisierung der Signaltransduktion von TNF-Rezeptor 1 und LMP1 in DG75 <i>TRADD</i>^{+/+} und DG75 <i>TRADD</i>^{-/-} Zellen	92
4.4.1. TNF-Rezeptor 1 und LMP1 aktivieren den klassischen NF- κ B Signalweg über <i>TRADD</i>	92
4.4.2. TNF-Rezeptor 1 und LMP1 aktivieren JNK1 unabhängig von <i>TRADD</i>	97
4.4.3. TNF-Rezeptor 1 induziert Apoptose über <i>TRADD</i>	100
4.5. Charakterisierung der Rolle von <i>TRADD</i> in der TNF-Rezeptor 1 Signaltransduktion mit Hilfe von <i>TRADD</i>-siRNA in HeLa Zellen.....	102
4.5.1. Optimierung der Transfektion von siRNA Oligonukleotiden in HeLa Zellen	103

4.5.2.	Die Rolle von TRADD in TNF-Rezeptor 1 Signalwegen in HeLa Zellen...	104
4.5.3.	Die Rolle von TRADD in der Apoptoseinduktion durch den endogenen TNF-Rezeptor 1 in HeLa Zellen.....	108
4.6.	Untersuchungen zur Rolle von TRADD im TNF-Rezeptor 1 Signalkomplex	112
4.6.1.	TRAF2 interagiert unabhängig von TRADD mit dem TNF-Rezeptor 1 Signalkomplex	112
4.6.2.	TRAF2 wird von TNF-Rezeptor 1 in Abwesenheit von TRADD in „lipid rafts“ rekrutiert	114
5.	<i>DISKUSSION</i>.....	117
5.1.	Die Herstellung einer TRADD-defizienten humanen B-Zelllinie.....	117
5.2.	Die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des TNF-Rezeptors 1... 	120
5.3.	Die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion von LMP1	125
5.4.	Vergleichende Betrachtung der Rolle von TRADD in der Signaltransduktion von TNF-Rezeptor 1 und LMP1	128
6.	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>.....	131
7.	<i>ABKÜRZUNGEN</i>.....	133
8.	<i>LITERATUR</i>.....	136
	<i>DANKSAGUNG</i>	156

1. Einleitung

1.1. Die Familie der Todesdomänen-Proteine

Die molekularen Funktionen des Adapterproteins TRADD („*TNF-receptor associated death domain protein*“) sind Gegenstand dieser Arbeit. TRADD gehört zur Familie der Todesdomänen-Proteine, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion extrinsischer und intrinsischer Signale in eukaryotischen Zellen spielt. Sie besitzen alle eine so genannte Todesdomäne (*death domain=DD*), welche ein Protein-Protein Interaktionsmodul bestehend aus einem Bündel von sechs kompakten α -Helices ist (Huang *et al.*, 1996). Diese Todesdomänen-Proteine können über ihre Todesdomänen direkt miteinander interagieren und dadurch Oligomere bilden (Übersichtsartikel: Reed, 2000). Zur Familie der Todesdomänen-Proteine gehören viele Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie und einige Adapterproteine. Die Todesrezeptoren TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) (siehe Abschnitt 1.3.2.), Fas (Apo1), DR3 (Apo2), DR4 (TRAILR1), DR5 (TRAILR2) und DR6 besitzen eine intrazelluläre, zytoplasmatische Todesdomäne, eine extrazelluläre N-terminale Ligandenbindungsdomäne (L), zwei bis vier extrazelluläre, cysteinreiche Domänen (EZ) und eine Transmembrandomäne (TM), mit der die Rezeptoren in der Plasmamembran verankert sind (siehe Abb. 1.1). Der p75 NGF-Rezeptor (*p75 nerve growth factor receptor*) besitzt eine modifizierte Todesdomäne (Typ II) und wird deshalb auch dieser Proteinfamilie zugerechnet (Liepinsh *et al.*, 1997).

Einige zytoplasmatische Adapterproteine, wie z.B. TRADD (siehe Abschnitt 1.2.), FADD (Mort1), RIP1, RAIDD, MADD, MyD88, IRAK-1 und IRAK-2 interagieren mit Rezeptoren der TNF-Rezeptor oder der Toll-like-Rezeptor Familie und besitzen ebenfalls Todesdomänen, mit denen sie entweder selbst an den Rezeptor binden und/oder weitere Todesdomänen-Proteine an den Rezeptor rekrutieren können (siehe Abb. 1.1). Einige dieser Todesdomänen-Proteine besitzen weitere funktionelle Domänen. RIP1, welches über TRADD an den TNF-R1 binden soll (Hsu *et al.*, 1996a), IRAK-1 und IRAK-2 haben zusätzlich eine Kinasedomäne, deren Funktionen teilweise noch unklar sind. FADD, das direkt über seine Todesdomäne an den Fas-Rezeptor oder indirekt über TRADD an TNF-R1 binden kann, besitzt eine so genannte DED-Domäne (*death-effector-domain*), mit der es die Caspasen-8/10 rekrutieren kann. Diese werden

daraufhin proteolytisch gespalten und aktiviert. FADD stellt das Bindeglied vieler Todesdomänen-Rezeptoren zu apoptotischen Signalwegen in der Zelle dar (Kischkel *et al.*, 2000; Sprick *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Todesdomänen-Proteine sind jedoch nicht grundsätzlich in die Aktivierung von Caspasen und der Induktion von Apoptose involviert.

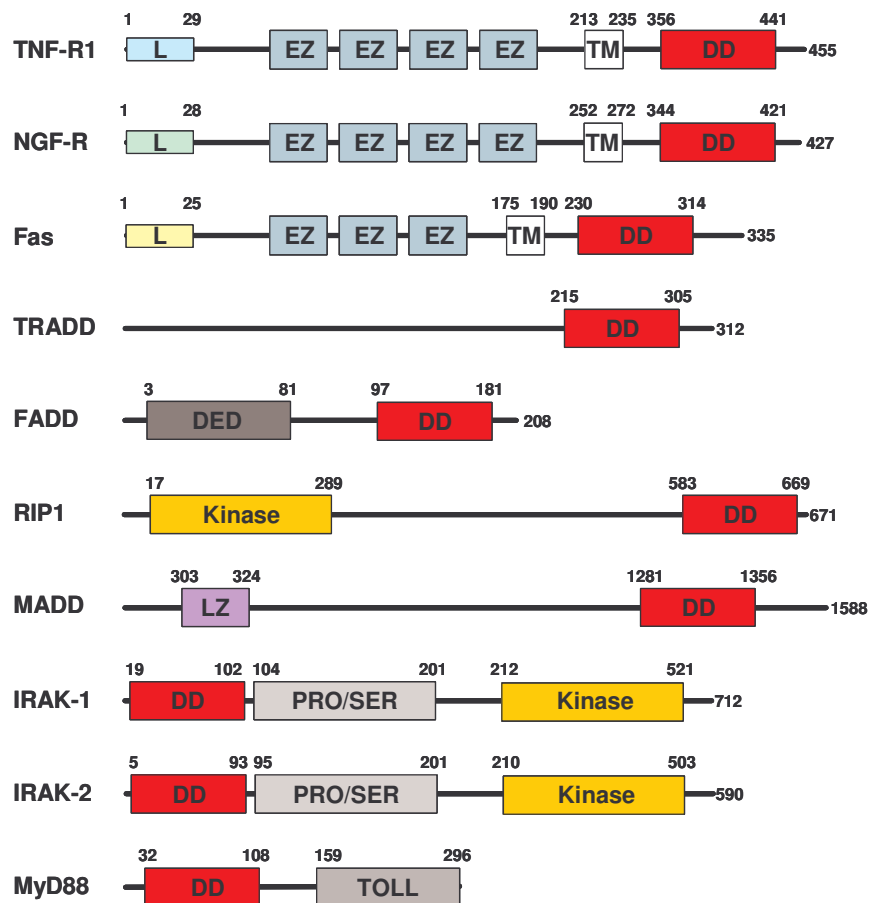


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einiger Mitglieder der humanen Todesdomänen-Proteinfamilie. Einige Mitglieder der Todesdomänen-Proteinfamilie werden mit der Anordnung ihrer Domänen schematisch dargestellt. Die gezeigten Zahlenwerte entsprechen den Aminosäuren im Protein. DD=Death Domain; DED=Death Effector Domain; EZ=Extrazelluläre Domäne; Kinase=Kinasedomäne; L=Ligandenbindedomäne; LZ=Leucine Zipper; PRO/SER=Prolin/Serine reiche Domäne; TM=Transmembrandomäne; TOLL=Toll-IL-1R Domäne. Abbildung modifiziert aus (Reed, 2000).

Einige Toll-like-Rezeptoren sind an der Erkennung von Pathogenen und der Immunantwort auf Pathogene beteiligt und rekrutieren direkt Todesdomänen-Proteine an ihre Signaldomänen (Übersichtsartikel: Akira und Takeda, 2004). Es sind

mittlerweile elf Mitglieder der Toll-like-Rezeptor Familie bekannt (Übersichtsartikel: O'Neill, 2004a; O'Neill, 2004b), die Todesdomänen-Proteine wie z.B. MyD88, IRAK-1 oder IRAK-2 (siehe Abb. 1.1) binden.

1.2. Das Todesdomänen-Protein TRADD

Das humane Adapterprotein TRADD ist ein 34,2 kDa schweres Protein, das aus 312 Aminosäuren aufgebaut ist und eine C-terminale Todesdomäne (As 215-305) besitzt. TRADD wurde 1995 im Rahmen eines „*yeast-two-hybrid-screens*“ nach direkten Interaktionspartnern des TNF-Rezeptors 1 kloniert (Hsu *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass TRADD spezifisch mit dem TNF-R1 interagiert und auch mit sich selbst assoziiert. Der genomische Locus von *TRADD* wurde im Chromosom 16 (16q22.1) lokalisiert (Christian Kaiser und Arnd Kieser nicht publizierte Daten, Scheuerpflug *et al.*, 2001). Der *TRADD* Locus umfasst eine Länge von ca. 5,7 kb, von dem eine 1460 bp lange mRNA transkribiert wird. TRADD wird in allen untersuchten humanen Geweben in geringen Mengen exprimiert (Hsu *et al.*, 1995). TRADD wird eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 (siehe Abschnitt 1.3.3.) und des viralen Latenten Membranproteins 1 (LMP1) des Epstein-Bar-Virus (EBV) zugeschrieben (siehe Abschnitt 1.4.3.). TRADD aktiviert nach Überexpression den NF-κB Signalweg und induziert Apoptose in HEK293 Zellen (Hsu *et al.*, 1995). Dieser Typ von Apoptose kann durch das Kuhpocken-Virusprotein crmA, welches ein Serpin ICE Inhibitor ist und damit Caspasen inhibiert (Ray *et al.*, 1992), geblockt werden.

Durch Mutationsanalysen von TRADD konnten wichtige Domänen des Proteins kartiert und bestimmten Funktionen zugeordnet werden (siehe Abb. 1.2). Die 111 carboxyterminalen Aminosäuren von TRADD enthalten die Todesdomäne (As 215-305). Sie sind notwendig und ausreichend für die Bindung an den TNF-R1, für die Induktion von Apoptose und für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Hsu *et al.*, 1995). Eine systematische Punktmutagenese der Todesdomäne ergab, dass die As 296-299 für die Aktivierung von NF-κB und Apoptose essentiell sind (Park und Baichwal, 1996). Trotz der Mutation der As 296-299 zu Alanin (TRADD_{296-299A}) wurde *in vitro* eine Selbstassoziation von TRADD und eine stark reduzierte Bindung an den TNF-R1 festgestellt. TRADD_{296-299A} funktioniert deshalb nach transientser Expression in HEK293 Zellen als eine dominant-negative Mutante, die nach TNFα Stimulierung an den TNF-R1 binden kann, aber in der Signalweiterleitung zur Aktivierung von NF-κB

bzw. Apoptose defizient ist (Park und Baichwal, 1996). Die Todesdomäne von TRADD hat eine hohe Homologie zu den Todesdomänen von FADD (Boldin *et al.*, 1995b; Chinnaiyan *et al.*, 1995) und RIP1 (Stanger *et al.*, 1995), die über Interaktionen der Todesdomänen an TRADD binden können (Hsu *et al.*, 1996a; Hsu *et al.*, 1996b). In der TRADD_{296-299A} Mutante konnte eine stark reduzierte Bindung zu RIP1 festgestellt werden, was die dominant-negative Wirkung teilweise erklären könnte. Der N-terminale Anteil von TRADD (As 1 bis 169) ist verantwortlich für die Bindung von Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierten Faktoren (TRAFs) und für die Bindung von TRADD an LMP1 (Inoue *et al.*, 2000; Kieser *et al.*, 1999; Wajant *et al.*, 1999; Wajant *et al.*, 2001). Es wurde über Protein-Interaktionsstudien gezeigt, dass TRAF1, TRAF2 und TRAF3 über TRADD an den TNF-R1 Komplex binden können (Hsu *et al.*, 1996b). Durch kristallografische Strukturaufklärung konnte eine Bindung zwischen dem N-Terminus von TRADD und TRAF2 aufgeklärt werden (Park *et al.*, 2000). Über die TRAF Moleküle wird die Aktivierung diverser Signalwege des TNF-R1 vermittelt (siehe Abschnitt 1.3.3.).

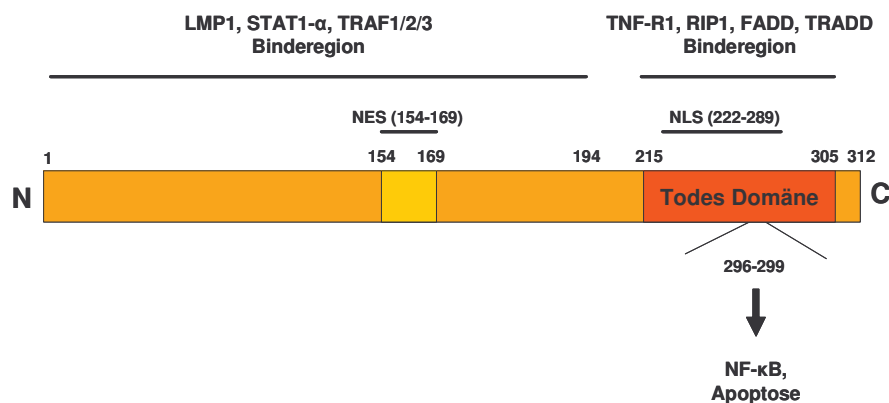


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des TRADD Proteins. Das TRADD Protein besteht aus 312 As und hat ein Molekulargewicht von 34,2 kDa. Es besitzt eine Todesdomäne (As 215 bis 305), eine nukleäre Exportsequenz (NES; As 154 bis 169) und eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die im Bereich der As 222 bis 289 kartiert wurde. Das TRADD Protein kann mit verschiedenen anderen Proteinen und mit sich selbst direkt interagieren. Für die Bindung an den TNF-R1, TRADD, FADD und RIP1 wurde die Region zwischen den As 215 und 305, die der Todesdomäne entspricht, identifiziert. Für die Bindung von TRAFs und STAT1- α ist der Bereich zwischen As 1 bis 169 essentiell. TRADD kann über seinen N-Terminus (As 1-194) an LMP1 binden (Kieser *et al.*, 1999).

TRADD kann außerdem an Keratin 14 und 18 (K14/18) binden (Inada *et al.*, 2001). K18 ist eine Hauptkomponente der Intermediärfilamente des Zytoskeletts (Oshima *et al.*, 1996) und gehört zu einer großen Familie von Keratinproteinen (Moll *et al.*, 1982). TRADD kann *in vivo* an K14/18 binden und wird von dort durch Stimulierung der Zellen mit hohen TNF α Mengen entlassen. Durch Überexpression des N-terminalen Anteils von K18 konnte die durch TNF α induzierte Apoptose geblockt werden. Dies führte zu der Hypothese, dass die Interaktion zwischen TRADD und K18 zur Regulierung TRADD-abhängiger Signalwege beiträgt (Inada *et al.*, 2001).

TRADD spielt aber nicht nur beim Aufbau des TNF-R1 Komplexes eine entscheidende Rolle, sondern ist auch an Prozessen im Zellkern beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass TRADD eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) im Bereich der Kernhelices der Todesdomäne (As 222 bis 289) und eine nukleäre Exportsequenz (NES) im Bereich der As 154 bis 163, besitzt (Morgan *et al.*, 2002). TRADD kann in den Zellkern translozieren und ist dort in nukleären Strukturen, den PML (Promyeloisches Leukämieprotein) Nuklearkörperchen, zu finden. Der Export von TRADD lässt sich durch Leptomycin B (LMB) blockieren, was einen CRM1-abhängigen Export von TRADD aus dem Zellkern vermuten lässt (Henderson und Eleftheriou, 2000). Zusammen mit PML kann TRADD im Zellkern über seine Todesdomäne eine p53-abhängige Apoptose induzieren, die sich durch Bcl-xL inhibieren lässt und deswegen wahrscheinlich über einen mitochondrialen Signalweg verläuft. Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs ist jedoch noch unklar.

Eine weitere nukleäre Funktion von TRADD ist die Interaktion mit STAT1- α und die dadurch verursachte Beeinflussung der Interferon- γ Signaltransduktion (Wesemann *et al.*, 2004). TRADD transloziert nach IFN- γ Stimulierung von Makrophagen unabhängig von STAT1- α in den Zellkern und interagiert erst dort mit STAT1- α . In Zellen, in denen die TRADD Expression durch spezifische siRNAs herunterreguliert wurde, kommt es zu einer stärkeren und verlängerten Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1- α nach IFN- γ Stimulierung. TRADD scheint hierbei als Negativregulator eine Rolle zu spielen.

1.3. Signaltransduktion durch Tumornekrosefaktor α (TNF α)

1.3.1. Das Zytokin TNF α

Der Name „Tumornekrosefaktor“ ist historisch begründet, da die Aktivität von TNF α schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts mit der Therapie von Krebs in Verbindung gebracht wurde. Diese Verbindung geht zurück auf Beobachtungen von *Brunes* aus dem Jahr 1868, der feststellte, dass bei einigen seiner Krebspatienten die Tumormasse nach einer akuten bakteriellen Infektion spontan zurückging. 1894 beobachtete *Colley*, dass zellfreie Bakterienextrakte, die später *Colley's Toxin* genannt wurden, zur Schrumpfung von Tumoren führten. Um 1944 isolierten *Shear* und Kollegen einen Faktor aus gramnegativen Bakterien, den sie Endotoxin oder Lipopolysaccharid (LPS) nannten, der nach Injektion in Tumormäusen zu einer hämorrhagischen Nekrose dieser Tumoren führte (Übersichtsartikel: Aggarwal, 2003; Ashkenazi, 2002). 1962 transferierten *W.O Malley* und Kollegen Serum von LPS behandelten Mäusen in Tumormäuse, was zu einer Regression der Tumoren führte (*O'Malley et al.*, 1963). *E. Carswell* und Kollegen konnten diese Beobachtung 1975 bestätigen und gaben dem Faktor, der durch die LPS Behandlung induziert wurde, zum ersten Mal den Namen „Tumornekrosefaktor“ (*Carswell et al.*, 1975). 1984 konnte schließlich die cDNA für TNF α und für das verwandte Lymphotoxin- α (LT- α) kloniert werden (*Browning et al.*, 1993; *Gray et al.*, 1984; *Pennica et al.*, 1984). TNF α wird hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten, aber auch von T- und B-Zellen sowie von Fibroblasten produziert. Es wird als ein 26 kDa schweres, integrales Membranprotein exprimiert, von dem durch die Metalloprotease TACE (*TNF alpha converting enzyme*) enzymatisch eine 17 kDa schwere Untereinheit abgeschnitten und als homotrimeres, lösliches TNF α von 51 kDa freigesetzt wird (*Black et al.*, 1997; *Kriegler et al.*, 1988; *Tang et al.*, 1996). Homotrimeres, lösliches TNF α hat die Tendenz, bei Konzentrationen unter dem nanomolaren Bereich in Monomere zu zerfallen und dabei seine biologische Aktivität zu verlieren.

In den letzten 15 Jahren wurde es immer deutlicher, dass TNF α eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Immunsystems spielt, vor allem bei der Aktivierung des Immunsystems durch bakterielle oder virale Infektionen. TNF α ist aber auch an der

Ausprägung einiger schwerwiegender Krankheiten beim Menschen beteiligt. Es werden große Mengen von löslichem TNF α als Reaktion auf LPS oder andere bakterielle Komponenten ausgeschüttet, die dann in diesen hohen Konzentrationen zu einem septischen Schock führen können (Mannel und Echtenacher, 2000). Dagegen führt die Exposition mit geringeren Konzentrationen von TNF α über längere Zeiträume zu der so genannten Schwundkrankheit (*wasting disease*), auch Cachexia genannt, die des Öfteren bei Krebspatienten auftritt und in Tiermodellen aufgeklärt werden konnte (Beutler *et al.*, 1985).

TNF α zeigt ein enormes Spektrum an biologischen Aktivitäten und die meisten Zelltypen zeigen zumindest eine gewisse Reaktivität auf TNF α Stimulierung. TNF α gilt als der wichtigste proinflammatorische Faktor des Immunsystems, der aber auch ein optionales, situationsabhängiges Potential zur Induktion von Apoptose hat. Bei einigen der schwerwiegendsten Autoimmunkrankheiten des Menschen spielt TNF α eine wichtige Rolle. Rheumatoide Arthritis, Kolitis, systemischer Lupus erythematosus, Typ II Diabetes, Morbus Crohn, allergisches Asthma, Arteriosklerose und neurodegenerative Krankheiten, wie z.B. Alzheimer und Multiple Sklerose sind mit einer Deregulation des TNF α Stoffwechsels assoziiert (Übersichtsartikel: Aggarwal, 2003). In der heutigen klinischen Praxis werden schon einige Therapien angewendet, die auf TNF α neutralisierenden Agenzien basieren (Blam *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 1999). Heutzutage kann das Zytokin TNF α als rekombinantes, in Bakterien oder Hefezellen exprimiertes Protein gekauft werden, was zu einer enormen Erhöhung der Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet führte. Allein für den Suchbegriff „TNF“ findet man in PubMed ca. 50000 Artikel, welches die Wichtigkeit und das hohe Interesse an diesem Forschungsgebiet widerspiegelt.

1.3.2. Struktureller Aufbau der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren 1 und 2

Das pleiotrope Zytokin TNF α kann an zwei unterschiedliche Oberflächenrezeptoren, den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2), binden und über diese beiden Rezeptoren Signalkaskaden in der Zelle auslösen. Der TNF-R1 wird in den meisten Zelltypen konstitutiv exprimiert. Dagegen ist die Expression des TNF-R2 stärker reguliert und vor allem in Zellen des Immunsystems von Bedeutung. Die Gene der beiden TNF-Rezeptoren wurden Anfang der 90iger Jahre von mehreren Gruppen

parallel identifiziert und kloniert (Baker *et al.*, 1991; Fuchs *et al.*, 1992; Loetscher *et al.*, 1990; Milatovich *et al.*, 1991; Nophar *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990). Während der TNF-R1 durch lösliches und membranständiges TNF α stimuliert werden kann, wird der TNF-R2 in effizienter Weise nur durch membranständiges TNF α induziert (Grell *et al.*, 1995; Grell *et al.*, 1998). Strukturell gibt es wenige Homologien zwischen beiden Rezeptoren. Beide Rezeptoren haben eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (L), vier cysteinreiche, extrazelluläre Domänen mit einer Homologie von 28 %, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne, die keinerlei Gemeinsamkeiten aufweisen (siehe Abb. 1.3). Über die cysteinreichen, extrazellulären Domänen der beiden TNF-Rezeptoren, die auch PLAD (*preligand binding assembly domains*) genannt werden, kommt es zu einer Homotrimerisierung einzelner Rezeptormoleküle, unabhängig von einer Ligandenbindung (Chan *et al.*, 2000). Trotzdem bleiben die trimerisierten Rezeptoren inaktiv, da erst durch die Bindung von TNF α eine Konformationsänderung der Rezeptoren verursacht wird. Dies führt beim TNF-R1 zur Freisetzung des Moleküls SODD (*silencer of death domain*) (Jiang *et al.*, 1999) und der Rekrutierung von Signalmolekülen an die intrazellulären Domänen. Während der 55 kDa schwere TNF-R1 eine C-terminale, intrazelluläre Todesdomäne (As 356 bis 441) besitzt und deswegen zu der Familie der Todesdomänenrezeptoren gerechnet wird (Hsu *et al.*, 1995; Tartaglia *et al.*, 1993), fehlt diese dem 75 kDa schweren TNF-R2. Der TNF-R2 besitzt dagegen eine intrazelluläre TRAF Bindedomäne (As 346 bis 423) mit einem PxQxT-Motif, über das TRAFs direkt an den Rezeptor binden können. TNF-R2 kann ebenso wie TNF α durch das Enzym TACE in seinem extrazellulären Anteil (bei As 192) geschnitten werden (Solomon *et al.*, 1999), wodurch die Aktivität des Rezeptors reguliert werden kann. Auch die Aktivität des TNF-R1 kann durch extrazelluläre Degradation (bei As 171 und 173) des Rezeptors reguliert werden, wobei in diesem Fall das schneidende Enzym noch nicht bekannt ist. Degradationsresistente Mutanten des TNF-R1 sind mit dem dominant-rezessiv vererbaren, autoinflammatorischen TRAP-Syndrom (*TNF-R1 associated periodic syndrome*) assoziiert (Galon *et al.*, 2000; McDermott *et al.*, 1999). In Abb. 1.3 sind die TNF-Rezeptoren 1 und 2 schematisch dargestellt.

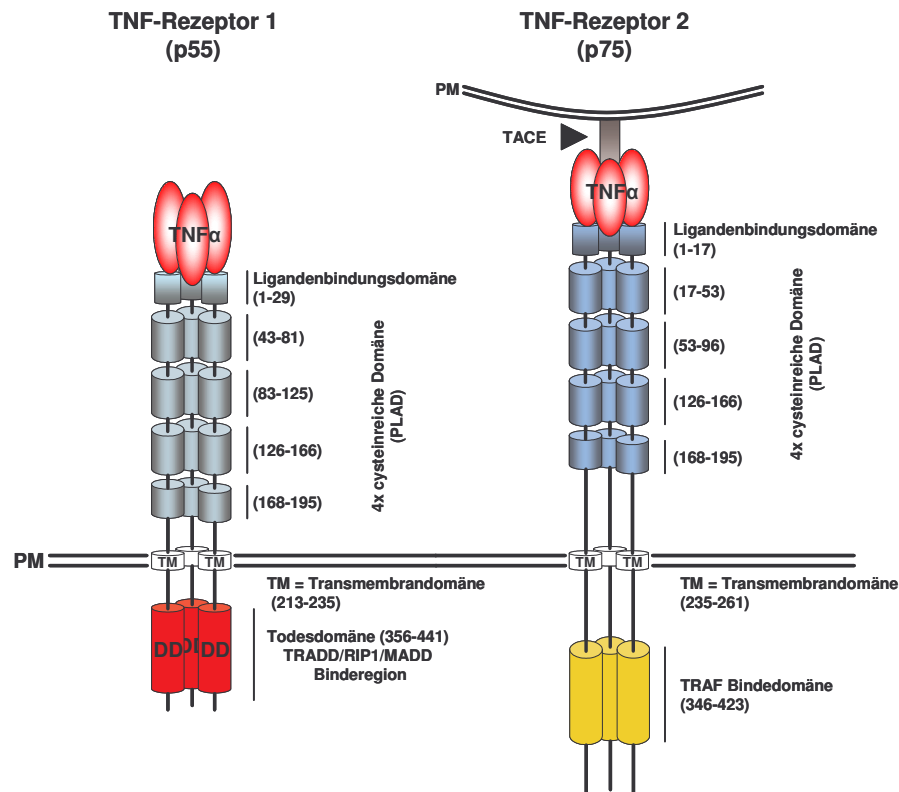


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der TNF-Rezeptoren 1 und 2. Das trimere Zytokin TNF α bindet den trimerisierten TNF-R1 über seine Ligandenbindedomäne (L). TNF-R1 hat vier cysteinereiche extrazelluläre Domänen (EZ), gefolgt von einer Transmembrandomäne (TM) und einer zytoplasmatischen Todesdomäne (DD). Der trimerisierte TNF-R2, der hauptsächlich von membranständigem TNF α aktiviert wird, hat ebenfalls vier cysteinereiche, extrazelluläre Domänen (EZ), eine Transmembrandomäne (TM) und eine zytoplasmatische TRAF Bindedomäne. PLAD=*preligand assembly domains*; TACE=*TNF alpha converting enzyme*.

1.3.3. Signaltransduktion durch TNF-Rezeptor 1

TNF α induziert nach Bindung an den TNF-R1 oder TNF-R2 eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen, die vor allem zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 (Aktivatorprotein 1) und NF- κ B (Nukleärer Faktor- κ B), sowie von Apoptose führen.

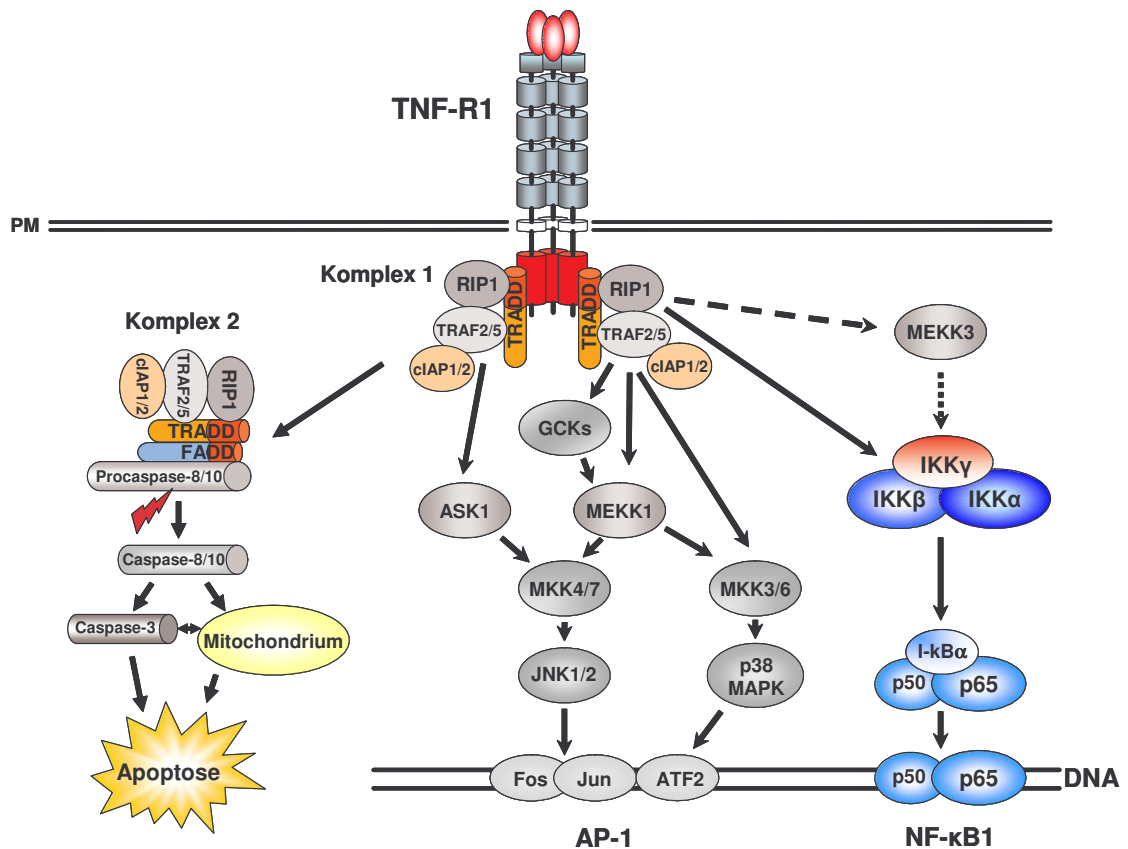


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der wichtigsten TNF-R1-induzierten Signalwege. Erklärungen siehe Text.

Durch die Bindung von TNF α an seine Rezeptoren werden eine Reihe von Signalmolekülen rekrutiert, die zum Aufbau eines Rezeptorsignalkomplexes beitragen. Nach Bindung von löslichem oder membranständigem TNF α an den TNF-R1 wird das inhibierende Molekül SODD (siehe oben) entlassen, und es kommt zur Rekrutierung von TRADD über seine Todesdomänen an die Todesdomäne des TNF-R1 (Hsu *et al.*, 1995). Es wird postuliert, dass TRADD das zentrale Adapterprotein zum Aufbau eines membranständigen TNF-R1 Signalkomplexes (Komplex 1) ist und als Plattform zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle, wie z.B. TRAF1/2/3, RIP1 und cIAP1/2, dient. Dieses Postulat beruht vor allem auf indirekten Beweisen, die zur Aufstellung eines solchen Modells führten. Beispielsweise wurde gezeigt, dass RIP1 direkt mit dem TNF-R1 binden kann (Hsu *et al.*, 1996a; Stanger *et al.*, 1995). Da diese Bindung jedoch schwächer als an TRADD oder an TRAF1/2/3 ist, wurde behauptet, dass RIP1 über TRADD an den TNF-R1 bindet (Hsu *et al.*, 1996a; Hsu *et al.*, 1996b; Hsu *et al.*, 1995). Neuere Studien in RIP1-defizienten Zellen ergaben allerdings, dass in Abwesenheit von

RIP1 wesentlich mehr TRADD und TRAF2 an den TNF-R1 binden können (Devin *et al.*, 2000). Dies könnte für eine kompetitive Bindung von TRADD und RIP1 an den TNF-R1 sprechen. In „*yeast-two-hybrid-screens*“ bei denen die direkte Bindung von TRAF1/2/3 an Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie untersucht wurde, konnte keine direkte Bindung von TRAF1/2/3 mit dem TNF-R1 nachgewiesen werden (Rothe *et al.*, 1995). In Koimmunpräzipitationsexperimenten war nur bei Koexpression von TRADD eine Bindung von TRAF1/2 an den präzipitierten TNF-R1 detektierbar (Hsu *et al.*, 1996b). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass TRAF1/2/3 über TRADD an den TNF-R1 binden.

Es konnte gezeigt werden, dass dieser membranständige Komplex 1 innerhalb von Minuten in cholesterin- und sphingolipidreiche Plasmamembran-Mikrodomänen (*lipid rafts*) transloziert (Legler *et al.*, 2003). Diese Plasmamembran-Mikrodomänen sind wichtige Plattformen vieler Rezeptoren, um von dort aktiv Signale in die Zelle zu senden (Übersichtsartikel: Pierce, 2002; Simons und Toomre, 2000). Nach längerer Zeit (> 2 h) kommt es zum Aufbau eines zweiten, zytoplasmatischen TNF-R1 Signalkomplexes (Komplex 2), der für die Induktion von Apoptose verantwortlich ist (siehe unten).

TNF-R1 induziert unter anderem die schnelle Aktivierung von NF- κ B (siehe Abb. 1.4). Dafür ist die Translokation des Komplexes 1 in „*lipid rafts*“ essentiell (Legler *et al.*, 2003). Unter NF- κ B versteht man eine Gruppe von heterodimeren Transkriptionsfaktoren, die aus Mitgliedern der NF- κ B/Rel Familie zusammengesetzt sind (Übersichtsartikel: Bonizzi und Karin, 2004; Karin und Lin, 2002). Ursprünglich wurde NF- κ B als B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor, der an die κ B Bindestelle im Enhancer des Ig- κ Gens bindet, identifiziert. Kurze Zeit danach wurde allerdings festgestellt, dass NF- κ B in allen Zellen des Körpers von großer Bedeutung ist. NF- κ B Proteine regulieren die Transkription einer großen Anzahl von Genen, die an inflammatorischen Prozessen und an der Regulation des Immunsystems beteiligt sind. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass über die Aktivierung von NF- κ B die Transkription vieler antiapoptotischer Gene (z.B. cIAPs, c-FLIP, Bcl-2) hochreguliert wird, was von besonderer Bedeutung in der durch TNF-R1 induzierten Apoptose ist (siehe unten).

Bis vor zwei Jahren war nur der klassische (kanonische) Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B bekannt, den der TNF-R1 über TRADD, TRAF2/5 und RIP1 induzieren kann (Devin *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 1996a; Hsu *et al.*, 1996b; Hsu *et al.*, 1995; Kelliher *et al.*, 1998; Tada *et al.*, 2001). In TRAF2 und in RIP1 defizienten Zellen wurde gezeigt, dass der IKK-Komplex (I- κ B Kinasen α , β , γ) über TRAF2 an den TNF-R1 rekrutiert und über RIP1 aktiviert wird (Devin *et al.*, 2000; DiDonato *et al.*, 1997; Rothwarf *et al.*, 1998; Zandi *et al.*, 1997). Es ist vorstellbar, dass RIP1 indirekt über MEKK3 den IKK-Komplex aktiviert, da MEKK3 defiziente Zellen nach TNF α Stimulierung eine stark reduzierte NF- κ B Aktivierung zeigen (Yang *et al.*, 2001).

Durch Aktivierung des IKK-Komplexes kommt es zur Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitorproteins I- κ B α , welches darauf durch einen SKP1-Cullin-Fbox E3 Ubiquitinligase-Komplex erkannt (Hatakeyama *et al.*, 1999), durch FWD1 polyubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut wird. Alle drei Komponenten des IKK-Komplexes wurden in Mäusen deletiert, wobei deutlich wurde, dass der durch TNF-R1 induzierte NF- κ B Signalweg hauptsächlich abhängig von IKK γ (NEMO) über IKK β verläuft (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1999; Rudolph *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 1999). Während IKK γ nur eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird, ist IKK β die I- κ B α phosphorylierende Kinase. IKK α spielt bei der TNF α induzierten Aktivierung von NF- κ B nur eine untergeordnete Rolle (Hu *et al.*, 1999). Im nicht induzierten Zustand hält das I- κ B α Protein den inaktiven NF- κ B Komplex (meist p50/p65) im Zytoplasma zurück. I- κ B α bindet an den dimeren NF- κ B Komplex und maskiert damit die nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) in p50/p65. Wird I- κ B α degradiert, kommt es zur Translokation des aktiven NF- κ B Komplexes in den Zellkern, der Anheftung an κ B Promotorsequenzen und der Transkription NF- κ B regulierter Gene. Während die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs durch TNF α Stimulierung am TNF-R1 relativ gut verstanden ist, sind Rückkopplungsmechanismen, die zur Regulation der NF- κ B Antwort beitragen, noch weitgehend unklar (Higuchi und Aggarwal, 1994; Mosselmanns *et al.*, 1988; Schneider-Brachert *et al.*, 2004; Schutze *et al.*, 1999).

TNF-R1 induziert nach TNF α Stimulierung die Proteinkinasen JNK/SAPK1 und 2, p38 MAPK und ERK, die alle zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören. JNK wird durch duale Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten (Tyr185/Thr183) aktiviert, was eine Translokation der Kinasen in den Zellkern zur

Folge hat. Dort kann JNK durch Phosphorylierung seiner Substrate zur Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von Bestandteilen des AP-1 (*activator protein-1*) Komplexes beitragen (Übersichtsartikel: Chang und Karin, 2001). AP-1 ist ein dimerer Komplex, der vor allem aus Leucin-Zipper Proteinen (bZIP) der Jun-Familie (c-Jun, JunB, JunD) und Fos-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) besteht (Übersichtsartikel: Karin *et al.*, 1997; Shaulian und Karin, 2002). AP-1 ist maßgeblich an der Regulation von Zellproliferation, Transformation und Zelltod beteiligt. In TRAF2-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass die TNF-R1 induzierte Aktivierung des JNK Signalwegs über einen TRAF2-abhängigen Signalweg verläuft (Natoli *et al.*, 1997; Reinhard *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). Nachdem postuliert wurde, dass TRAF2 über TRADD an den TNF-R1 bindet, wurde angenommen, dass TRADD für den TNF-R1/JNK Signalweg essentiell ist. Allerdings wird nach TRADD Überexpression, was zur Aktivierung von NF- κ B und zur Induktion von Apoptose führt (siehe oben), der JNK Signalweg nicht aktiviert (Liu *et al.*, 1996).

Unterhalb von TRAF2 teilen sich mehrere Signalwege zur Aktivierung der c-jun N-terminalen Kinasen auf. Es konnte im TNF-R1 Kontext gezeigt werden, dass MKK7 die essentielle, JNK phosphorylierende Kinase ist, während MKK4 (SEK1) notwendig ist, um eine optimale Aktivierung von JNK zu erreichen (Tournier *et al.*, 2001). Allerdings wird MKK4 nicht durch TNF α Stimulierung phosphoryliert, was zu der Vorstellung führte, die basale Aktivität von MKK4 sei ausreichend, um eine optimale JNK Aktivierung zu erreichen (Moriguchi *et al.*, 1997). Während die Rolle von TRAF2/5 und MKK7 in der TNF-R1 induzierten JNK Aktivierung durch Gen „*knockout*“ Studien eindeutig aufgeklärt werden konnte, ist die Natur und Funktion der zwischen TRAF2 und MKK7 liegenden MAP3K bis heute noch nicht zufrieden stellend geklärt. Basierend auf einer möglichen Interaktion von MEKK1 und ASK1 mit TRAF2/5 wird diesen beiden Kinasen eine Rolle in der JNK Aktivierung zugeschrieben (Hoeflich *et al.*, 1999; Nishitoh *et al.*, 1998; Tobiume *et al.*, 2001; Yujiri *et al.*, 2000). „*Knockout*“ Studien dieser beiden Kinasen zeigten allerdings keine essentielle Rolle von MEKK1 und ASK1 in diesem Signalweg auf, was durch redundante Funktionen begründet sein kann. ASK1 scheint vor allem in der langanhaltenden JNK Aktivierung unter apoptotischen Bedingung eine Rolle zu spielen (siehe unten). Ein weiterer, von TRAF2/5-abhängiger TNF-R1 Signalweg zur Aktivierung von ASK1 verläuft über die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), die mitochondrialen Ursprungs

sind (Chandel *et al.*, 2001; Gotoh und Cooper, 1998). Dieser Signalweg, der offensichtlich nach TNF α Stimulierung aktiviert wird, ist bis heute jedoch sehr wenig verstanden. Es gibt auch Hinweise, dass Mitglieder der Keimzentren-Kinasenfamilie (GCKs = *germinal center kinases*) in der Aktivierung des JNK Signalwegs involviert sind. Die Gruppe der Typ I GCKs scheint eine Verbindung von TRAF2 zu MEKK1 herzustellen (Diener *et al.*, 1997; Yuasa *et al.*, 1998). Die TNF α -abhängige Aktivierung von GCKs verstärkt die Oligomerisierung von MEKK1, einem Prozess, der für sich alleine zur JNK Aktivierung führen kann (Chadee *et al.*, 2002).

TNF α führt nach Bindung an den TNF-R1 nicht nur zu einer robusten Aktivierung des JNK Signalwegs, sondern auch zur Aktivierung der p38 MAPK. Viele Aspekte der JNK Aktivierung treffen auch bei der Aktivierung von p38 MAPK zu, wie z.B. eine verlängerte Aktivierung unter apoptotischen Bedingungen (Ichijo *et al.*, 1997). So sind auch TRAF2, ASK1 und MEKK1 starke Aktivatoren von p38 MAPK (Carpentier *et al.*, 1998). Durch eine RIP1 Deletionsmutante, in der die „intermediäre Domäne“ von RIP1 fehlt, wurde gezeigt, dass RIP1 essentiell für den TRAF2 induzierten p38 MAPK Signalweg ist (Yuasa *et al.*, 1998). In MKK3 defizienten embryonalen Mausfibroblasten ist der TNF α induzierte p38MAPK Signalweg stark beeinträchtigt (Wysk *et al.*, 1999).

Die Aktivierung des ERK1/2 und des PI-3K Signalwegs kann von beiden TNF-Rezeptoren induziert werden, soll aber an dieser Stelle nicht genauer beschrieben werden, da sie in der TNF-R1 bzw. TNF-R2 Signaltransduktion nur eine untergeordnete Rolle spielen. Für genauere Informationen wird auf die Übersichtsartikel von P.W. Dempsey oder H. Wajant verwiesen (Dempsey *et al.*, 2003; Wajant *et al.*, 2003).

Der TNF-R1 kann, wie andere Todesrezeptoren, über seine Todesdomäne in verschiedenen Zelllinien den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Im Gegensatz zu Todesrezeptoren, wie z.B. Fas, TRAIL-R1 oder TRAIL-R2, spielt der TNF-R1 induzierte Zelltod *in vivo* eine untergeordnete Rolle gegenüber der Funktion in inflammatorischen Prozessen (Übersichtsartikel: Dempsey *et al.*, 2003; Wajant *et al.*, 2003). Die schnelle Aktivierung von NF- κ B und die damit verbundene Regulation antiapoptotischer Faktoren dominiert in der Regel über dem TNF-R1 induzierten apoptotischen Signalweg (Van Antwerp *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1998). Die TNF-R1 induzierte Apoptose verläuft überwiegend über einen von TRADD, FADD und

Caspase-8/10-abhängigen Signalweg (Hsu *et al.*, 1996b; Hsu *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass FADD und Caspase-8/10 nicht direkt an den membranständigen TNF-R1 Signalkomplex (Komplex 1), der den Rezeptor selbst, TRADD, RIP1, TRAF2/5 und cIAPs enthält, rekrutiert werden (Harper *et al.*, 2003; Micheau und Tschoop, 2003). Es bildet sich ein zytoplasmatischer Komplex 2 aus, indem Teile des Komplexes 1 vom Rezeptor dissoziieren. Im Zytoplasma werden über TRADD das Todesdomänenprotein FADD und die Procaspasen-8/10 rekrutiert (siehe Abb. 1.4). Im Komplex 2 sind enthalten: TRADD, FADD, TRAF2, RIP1, Procaspase-8 und cIAPs. Sind nicht genügend Apoptoseinhibitoren, wie z.B. FLIP_L oder cIAPs, die durch die schnelle Aktivierung von NF- κ B hochreguliert werden, in der Zelle vorhanden, kommt es zur Aktivierung der Caspasen-8/10. In der Folge wird eine Caspasenkaskade induziert, bei der am Ende Caspase-3 aktiviert wird, und die Zelle in Apoptose geht (Micheau und Tschoop, 2003).

In Zellen, in denen zusätzlich der TNF-R2 aktiviert wird, kann es zu einer Amplifikation des apoptotischen Potentials vom TNF-R1 kommen (Chan und Lenardo, 2000; Weiss *et al.*, 1997; Weiss *et al.*, 1998). Es wurden zwei Mechanismen dieser Amplifikation vorgeschlagen. Zum einen kann durch Rekrutierung großer Mengen TRAF2 an den TNF-R2 das zytoplasmatisch verfügbare TRAF2 für die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege am TNF-R1 entzogen werden. Ein weiterer Mechanismus, durch den TRAF2 dem TNF-R1 entzogen wird, ist die Degradation von TRAF2. TRAF2 kann durch cIAP1, das eine E3 Ubiquitinaseaktivität besitzt, polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt werden (Fotin-Mleczek *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). Durch den Entzug von TRAF2 aus dem TNF-R1-Signalkomplex kommt es zum Zusammenbruch des NF- κ B Signalwegs (siehe oben), der verantwortlich für die Regulation von antiapoptotischen Proteinen ist. Dadurch verlagert sich das Gleichgewicht hin zur Aktivierung der Caspasen-8/10 und der damit verbundenen Induktion von Apoptose.

Neben der Induktion von Apoptose durch die direkte Aktivierung einer Caspasenkaskade kommt es auch, abhängig vom Zelltyp, zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs. Dabei kann durch Caspase-8 das Bcl-2 verwandte, proapoptotische Protein Bid zu einem Spaltprodukt (tBid) prozessiert werden, welches

dann über einen Bax-Bak-abhängigen Mechanismus zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und der Aktivierung des Apoptosoms führt (Luo *et al.*, 1998).

Zudem wird seit längerem ein JNK-abhängiger Weg zur TNF α induzierten Apoptose sehr kontrovers diskutiert. Es gibt ältere Berichte, die zeigen, dass die Aktivierung des JNK Signalwegs durch den TNF-R1 keinen Einfluss auf die Induktion von Apoptose hat (Liu *et al.*, 1996). In jüngerer Zeit konnte dennoch eine Verbindung des JNK Signalwegs mit der TNF α induzierten Apoptose aufgezeigt werden (Deng *et al.*, 2003). Laut dieser Arbeit kommt es durch die Aktivierung von JNK zur Prozessierung von Bid zu dem Spaltprodukt jBid. jBid transloziert dann zu den Mitochondrien, an denen es die partielle Freisetzung von Smac/Diablo verursacht, welches dann die Bindung zwischen TRAF2 und cIAP1 zerstört und somit deren inhibitorischen Effekt auf Caspase-8/10 aufhebt. Bei diesem Mechanismus wird kein Cytochrom c freigesetzt (Deng *et al.*, 2003). Die JNK-abhängige Apoptose ist im Vergleich zur schnellen Aktivierung des Caspasen-abhängigen apoptotischen Signalwegs ein langsamer verlaufender Prozess, der bei lang anhaltender JNK Aktivierung von Bedeutung ist (Varfolomeev und Ashkenazi, 2004).

Neben den oben beschriebenen Signalwegen des TNF-R1, die als TRADD abhängig beschrieben wurden (Übersichtsartikel: Wajant *et al.*, 2003), konnten eine Anzahl von Proteinen identifiziert werden, die nicht über die Todesdomäne an den TNF-R1 binden. Das Protein FAN (*factor associated with neutral sphingomyelinase activation*) bindet an den membranproximalen Anteil der TNF-R1-Signaldomäne oberhalb der Todesdomäne. Über FAN kann die neutrale Sphingomyelinase (nSMase) aktiviert werden (Adam-Klages *et al.*, 1996; Kreder *et al.*, 1999). Über diesen Signalweg kommt es zur Bildung von Ceramiden, die einen Beitrag zur Caspase-3 Aktivierung leisten können. Die biologische Funktion dieses Signalwegs ist jedoch noch immer unklar (Bourteele *et al.*, 1998). TRAP2 (p97), eine Komponente des 26S Proteasoms, bindet an die As 234 bis 308 des TNF-R1 und könnte an der TNF α vermittelten Regulation proteasomaler Prozesse beteiligt sein (Boldin *et al.*, 1995a; Dunbar *et al.*, 1997; Tsurumi *et al.*, 1996). Über einen „*yeast-two-hybrid-screen*“ wurde das Protein MADD (Rab3-GAP), dessen Todesdomäne eine geringe Homologie zur Todesdomäne des TNF-R1 besitzt, als direkt an die Todesdomäne des TNF-R1 bindendes Protein identifiziert (Brown und Howe, 1998; Schievella *et al.*, 1997). Da zahlreiche

Spleißvarianten dieses Proteins in verschiedenen Geweben differentiell exprimiert werden, wird dieses Gen auch DENN (*differentially expressed in normal and neoplastic cells*) genannt (Chow und Lee, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass MADD bei Überexpression den ERK und JNK Signalweg aktiviert. Jedoch konnte bis heute keine konkrete Funktion von MADD in der TNF-R1 Signaltransduktion gezeigt werden.

1.4. Das Latente Membranprotein 1 (LMP1) des Epstein-Barr-Virus

1.4.1. LMP1 als Onkogen des Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist eines der „erfolgreichsten“ humanen γ -Herpesviren, das über 90 % der Weltbevölkerung latent infiziert hat. EBV besitzt ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA Genom von 172 kb Länge. EBV ist eines der wenigen bekannten humanen DNA-Tumoviren. Es ist essentiell an der Immortalisierung von B-Lymphozyten beteiligt.

In den meisten Fällen erfolgt die Primärinfektion in den Kinderjahren, in denen sie symptomfrei verläuft. Kommt der Mensch erst im Erwachsenenalter mit dem Virus in Kontakt, kann es in ca. 50 % der Fälle zu einer schwerwiegenden infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) kommen. EBV ist ätiologisch eng mit einigen malignen Erkrankungen des Menschen assoziiert (Übersichtsartikel: Niedobitek *et al.*, 2001). Dazu zählen das Burkitt-Lymphom (BL), das vor allem endemisch in Äquatorialafrika und Papua-Neuguinea als eine häufige Krebserkrankung im Kindesalter auftritt (Burkitt *et al.*, 1965). In der westlichen Welt kommt das BL nur sporadisch vor. Während offensichtlich alle endemischen Fälle des BL das EBV Genom tragen, sind nur ca. 30 % der sporadischen BL Fälle EBV positiv (Hummel *et al.*, 1995; zur Hausen *et al.*, 1970). Alle Burkitt-Lymphome weisen charakteristische chromosomale Translokationen, t(8;14), t(8;2) oder t(8;22) auf, bei der das *c-myc* Gen unter die transkriptionelle Kontrolle verschiedener Immunglobulin-Gene gerät (Klein, 1979). Dies führt zu einer Überexpression des Onkogens *c-myc*. Weitere EBV assoziierte Erkrankungen sind das Hodgkins-Lymphom, B-Zell-lymphoproliferative Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten, T-Zell Non-Hodgkins-Lymphome, Magenkarzinome oder das Nasopharynx-Karzinom (Übersichtsartikel: Niedobitek *et al.*, 2001).

Auch *in vitro* können primäre B-Zellen mit EBV infiziert werden, aus denen sich dann immortalisierte lymphoblastoide Zelllinien, sogenannte LCLs (*lymphoblastoid cell lines*) entwickeln lassen (Übersichtsartikel: Bornkamm und Hammerschmidt, 2001). In diesen latent mit EBV infizierten LCLs wird nur ein geringer Teil der Virusgene exprimiert (Young *et al.*, 2000). Die in LCLs exprimierten Gene kodieren für die EBV nukleären Antigene EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C und EBNA-LP sowie für die drei latenten Membranproteine LMP1, LMP2A und LMP2B. Zusätzlich konnte die Expression kleiner, nicht-adenylierter RNAs, EBER1 und EBER2, nachgewiesen werden. Als essentiell für die Immortalisierung der primären B-Zellen durch EBV wurden EBNA1, EBNA2, EBNA3A und EBNA3C und LMP1 identifiziert.

LMP1 ist das primäre Onkogen von EBV. Die konstitutive Expression von LMP1 ist für die Proliferation EBV-immortalisierter B-Lymphozyten essentiell (Kaye *et al.*, 1999; Kilger *et al.*, 1998). LMP1 hat aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit und der damit verbundenen Aktivierung einer Vielzahl von zellulären Signalwegen (siehe Abschnitt 1.4.2. und 1.4.3.) transformierende Eigenschaften. In vielen B-Zellen, die aus Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen isoliert wurden, konnte die Expression von LMP1 nachgewiesen werden (Nicholls *et al.*, 2004). Die Expression von LMP1 in Nagerfibroblasten führt zur Ausbildung charakteristischer Merkmale transformierter Zellen, wie dem Verlust der Kontaktinhibition, Wachstum unter geringen Serumkonzentrationen und spindelförmiger Zellmorphologie (Baichwal und Sugden, 1988; Wang *et al.*, 1985). Transgene Mäuse, die LMP1 ektopisch in ihren B-Zellen exprimieren, entwickeln B-Zelllymphome (Kulwicht *et al.*, 1998). Dies bestätigt das onkogene Potential von LMP1 in einem *in vivo* Modellsystem. Allerdings ist LMP1 alleine nicht in der Lage menschliche Zellen zu transformieren.

Die onkogenen Effekte von LMP1 sind auf Induktion antiapoptotischer, antiseneszenter und mitogener Signale in der Zelle zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass LMP1 die Expression antiapoptotischer Gene wie Bcl-2, A20, Mcl-1 und Bfl-1 induziert (D'Souza *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 1991; Laherty *et al.*, 1992; Rowe *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996b) und die Expression proapoptotischer Gene wie Bax unterdrückt (Grimm *et al.*, 2004). LMP1 induziert außerdem die Expression mitogener Faktoren, wie die Zytokine IL-6, IL-8 und IL-10 (Eliopoulos *et al.*, 1997; Nakagomi *et al.*, 1994; Vockerodt *et al.*, 2001) oder mitogener Transkriptionsfaktoren wie *c-myc* und

Mitglieder der Jun/AP-1 Familie (Dirmeier *et al.*, 2005). Zusätzlich kann LMP1 die durch Seneszenz verursachte Expression von p16INK4a unterdrücken (Yang *et al.*, 2000) und die Expression von Telomerase induzieren (Yang *et al.*, 2004).

In ruhenden B-Zellen vermittelt LMP1 den Übergang von der G₀/G₁-Phase in den Zellzyklus (Kilger *et al.*, 1998; Peng und Lundgren, 1992). Untersuchungen in epithelialen Zelllinien zeigten, dass die Expression von LMP1 zu einer morphologischen Transformation und zum Block der Zelldifferenzierung führt (Dawson *et al.*, 1990; Fahraeus *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass in Epithelzellen durch LMP1 die Expression des epidermalen Wachstums-Faktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor; EGFR*) (Miller *et al.*, 1997) und der Matrix Metalloprotease MMP-9 (Takeshita *et al.*, 1999; Yoshizaki *et al.*, 1998; Yoshizaki *et al.*, 1999) induziert wird. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass LMP1 ein multifunktionelles und potentes Onkogen darstellt. Die Aufklärung LMP1 induzierter Signalwege trägt zum Verständnis EBV-assoziiierter Tumorerkrankungen bei und ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Doktorarbeit.

1.4.2. Struktureller Aufbau von LMP1

LMP1 ist ein Transmembranprotein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 63 kDa, bestehend aus einem zytoplasmatischen, hydrophilen N-Terminus (As 1 bis 24), sechs hydrophoben Transmembrandomänen (As 25 bis 186) und einem ebenfalls zytoplasmatischen C-Terminus (As 187 bis 386), der für die Induktion von Signaltransduktion verantwortlich ist (Eliopoulos und Young, 2001; Liebowitz *et al.*, 1986) (siehe Abb. 1.5).

Der N-Terminus von LMP1 ist für die korrekte Insertion in die Plasmamembran und für Interaktionen mit dem Zytoskelett notwendig (Coffin *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 1994; Liebowitz *et al.*, 1987). Da LMP1 physiologisch bei zu hoher Expression zytotoxische bzw. zytostatische Wirkungen auf die Zelle hat (Floettmann *et al.*, 1996; Hammerschmidt *et al.*, 1989), muss LMP1 reguliert abgebaut werden. Der N-Terminus von LMP1 wird ubiquitiniert und somit kann LMP1 mit einer Halbwertszeit zwischen 1,5 bis 7 Stunden dem Abbau durch das Proteasom zugeführt werden (Aviel *et al.*, 2000; Baichwal und Sugden, 1987; Mann und Thorley-Lawson, 1987; Martin und

Sugden, 1991). Der N-Terminus und die Transmembrandomänen sind für die zytotoxische Wirkung von LMP1 verantwortlich, wobei aber der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist (Kaykas und Sugden, 2000).

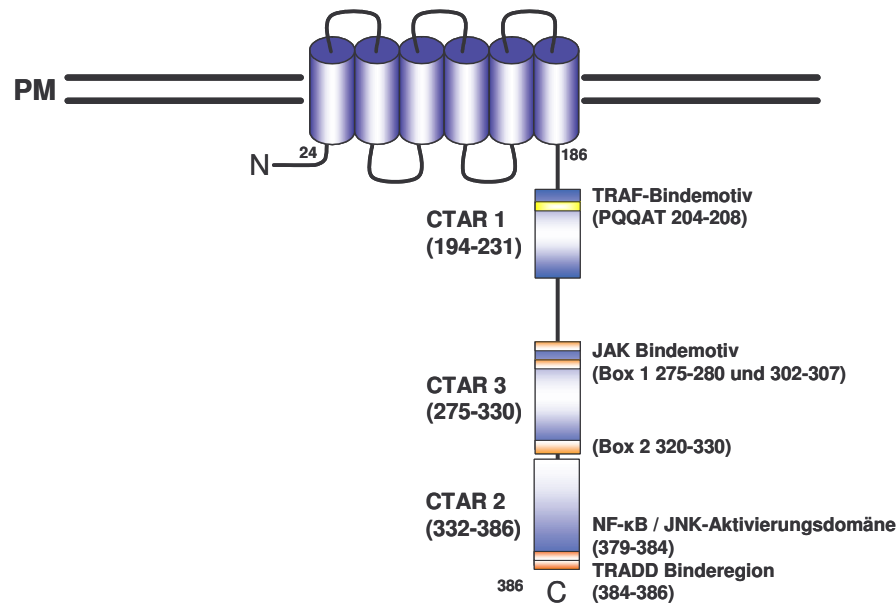


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von LMP1. Das LMP1 Molekül besteht aus einem kurzen N-Terminus (24 As), sechs Transmembrandomänen (161 As) und einem C-Terminus (200 As). Der C-Terminus umfasst drei C-terminale Aktivierungsregionen (CTAR1, 2, 3), über die Signalmoleküle an LMP1 binden und Signale in die Zelle weiterleiten können. Die genannten Zahlen geben die Aminosäurepositionen im Molekül an. C=C-Terminus; N=N-Terminus; PM=Plasmamembran.

Die Transmembrandomänen von LMP1 verursachen eine spontane Zusammenlagerung (Autoaggregation) der LMP1 Moleküle in der Zellmembran. Diese Oligomerisierung ist notwendige und hinreichende Voraussetzung für die Induktion von Signaltransduktion durch die Signaldomäne von LMP1. LMP1 benötigt keinen Liganden, es ist ein konstitutiv aktives, rezeptorähnliches Molekül (Floettmann und Rowe, 1997; Gires *et al.*, 1997; Liebowitz *et al.*, 1986). Erst kürzlich konnte ein Zusammenhang zwischen den LMP1 Transmembrandomänen aus dem EBV-Stamm B95.8, der üblicherweise als „wildtyp“ EBV-Stamm bezeichnet wird und dem zytotoxischen Potential von LMP1 hergestellt werden (Nitta *et al.*, 2004; Nitta *et al.*, 2003). Nitta und Kollegen konnten zeigen, dass die Zytotoxizität, verursacht durch die Überexpression von B95.8-LMP1, durch Mutation zweier Aminosäuren in der Transmembrandomäne, wie sie in LMP1

Varianten aus Nasopharynx-Karzinomen (CAO-LMP1) vorkommt (Hu *et al.*, 1991), verloren geht.

Der C-Terminus von LMP1 umfasst zwei funktionale Domänen, die sogenannten C-terminalen Aktivierungsregionen 1 und 2 (CTAR1 und CTAR2) (siehe Abb. 1.5). Diese beiden Regionen konnten durch Mutationsanalysen funktional kartiert (Huen *et al.*, 1995; Izumi *et al.*, 1997) und später der Induktion verschiedener Signalwege zugeordnet werden (siehe Abschnitt 1.4.3.). Ein Virus, das nur die ersten 231 As des LMP1 Moleküls exprimiert, ist in der Lage eine initiale Immortalisierung von B-Zellen zu erreichen, wobei die Aminosäuren 194 bis 231 (CTAR1) hierfür essentiell sind. Für ein Auswachsen der immortalisierten B-Zellklone über einen längeren Zeitraum ist die CTAR2 Domäne (As 332 bis 386) von LMP1 notwendig (Izumi *et al.*, 1997; Kaye *et al.*, 1999; Kaye *et al.*, 1995). Diese Tatsache ist wahrscheinlich durch die differentielle Aktivierung von Signalwegen durch die beiden CTAR-Domänen zu erklären. Es konnte noch eine weitere Region im C-Terminus identifiziert werden, die als CTAR3 bezeichnet wird. Diese Region besteht aus drei Janus Kinase (JAK) Bindemotiven (2x Box 1 und 1x Box 2), die in Analogie zu CTAR1 und 2 als CTAR3 (As 275 bis 330) zusammengefasst wurden (Gires *et al.*, 1999). In dieser Region kann JAK3 an LMP1 binden, durch Autophosphorylierung aktiviert werden und daraufhin den STAT (*signal transducers and activators of transcription*) Signalweg induzieren. Eine biologische Funktion des JAK3/STAT Signalwegs im Kontext von LMP1 konnte jedoch bis heute nicht gezeigt werden (Izumi *et al.*, 1999a). Durch intensive molekularbiologische Forschung konnten diverse Bindungspartner des C-terminalen Anteils von LMP1 gefunden und eine Reihe LMP1 induzierter Signalwege aufgeklärt werden, deren genauere Betrachtung in Abschnitt 1.4.3. erfolgt.

1.4.3. Signaltransduktion durch LMP1

In den letzten 15 Jahren konnten große Fortschritte in der Aufklärung LMP1 induzierter Signalwege gemacht werden. Mittlerweile ist klar, dass LMP1 in der Lage ist, eine Vielzahl von zellulären Signalwegen zu aktivieren, die für das transformierende und onkogene Potential von LMP1 verantwortlich sind. Aufgrund der LMP1 bindenden Signalmoleküle und der von LMP1 aktivierten Signalwege ist eine offensichtliche Parallele zu Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie, vor allem zu CD40 und zum TNF-

R1, zu erkennen. Im Folgenden soll der aktuelle Wissensstand über die wichtigsten Signalwege von LMP1 und den beteiligten Komponenten an der Signaltransduktion von LMP1 beschrieben werden.

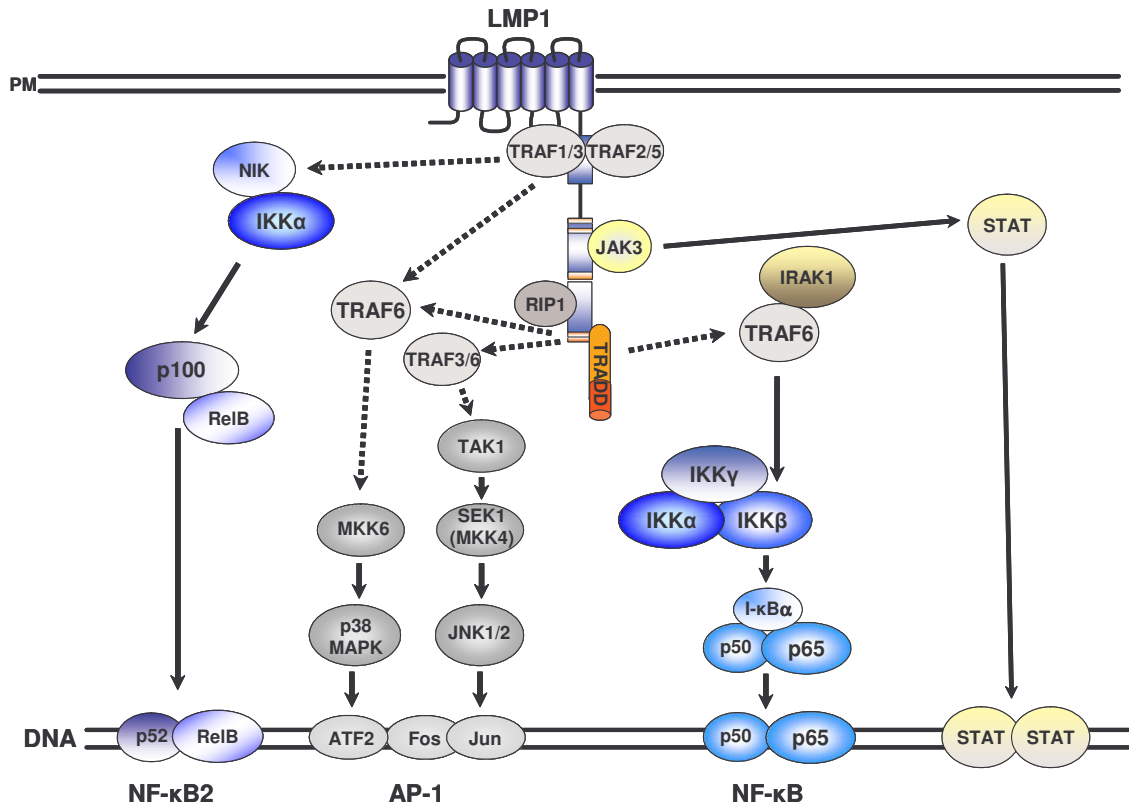


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der wichtigsten LMP1 induzierten Signalwege. Erklärungen siehe Text. Gestrichelte Pfeile: Signalmediatoren noch nicht bekannt.

Der erste Schritt bei der Aufklärung molekularer Mechanismen der LMP1 Signaltransduktion war die Beobachtung, dass LMP1 den Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert (Hammarckjold und Simurda, 1992). Eine Analyse von interagierenden Proteinen mit LMP1 hat gezeigt, dass Mitglieder der TRAF Familie (*tumor-necrosis-factor-receptor associated factors*) mit dem C-Terminus von LMP1 assoziieren können (Mosialos *et al.*, 1995). Die TRAF-Moleküle (derzeit TRAF 1 bis 7) wurden ursprünglich als Komponenten der Signaltransduktion von Mitgliedern der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Familie wie z.B. TNF-R1, TNF-R2, CD40 und CD30 und der Interleukin-Rezeptor 1 (IL-1) Familie beschrieben (siehe Abschnitte 1.2. und 1.3.) (Übersichtsartikel: Bishop, 2004; Wajant *et al.*, 2001). Die Bindung von TRAF1,

2, 3 und 5 an CD40 wird durch eine Konsensussequenz, das PxQxT-Motiv (As 250 bis 254), vermittelt (Aizawa *et al.*, 1997; Boucher *et al.*, 1997; Pullen *et al.*, 1999). Die Aminosäuren zwischen P, Q und T, ausgedrückt durch x, können beliebig sein. TRAF6 bindet an CD40 nicht über das PxQxT-Motif, sondern über das Motiv QxPxExxE/F (As 231 bis 238) (Ishida *et al.*, 1996; Pullen *et al.*, 1999). LMP1 besitzt in seiner CTAR1 ein mit CD40 vergleichbares PxQxT-Motiv (As 204-208). Es konnte die direkte Bindung von TRAF1, 2, 3, und 5 über dieses Sequenzmotif an LMP1 nachgewiesen werden (Brodeur *et al.*, 1997; Devergne *et al.*, 1996; Mosialos *et al.*, 1995; Sandberg *et al.*, 1997). Bis vor Kurzem glaubte man, dass TRAF2 bei der Aktivierung von NF- κ B durch CTAR1 eine essentielle Rolle spielt (Devergne *et al.*, 1996; Kaye *et al.*, 1996). Neuere Studien in TRAF2 bzw. TRAF3 defizienten Zellen zeigten aber, dass TRAF3 und nicht TRAF2 essentiell für die Aktivierung des nicht-kanonischen (alternativen) NF- κ B Signalwegs durch CTAR1 ist (Luftig *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004). CTAR1 aktiviert den alternativen NF- κ B Signalweg ausschließlich über TRAF3, NIK (*NF- κ B inducing kinase*) und IKK α , unabhängig von IKK β und IKK γ (Eliopoulos *et al.*, 2003; Luftig *et al.*, 2004). Dabei kommt es zur proteolytischen Prozessierung des Vorläufermoleküls p100 zu p52 (NF- κ B2) (Bonizzi und Karin, 2004). Dieses kann mit RelB einen heterodimeren Komplex bilden, in den Zellkern translozieren und dort die Transkription p52/RelB-abhängiger Gene aktivieren (siehe Abb. 1.6).

Ein PxQxT-Motif fehlt in der CTAR2 Domäne von LMP1. Die Bindung von TRAFs an die CTAR2 wurde wie bei dem TNF-R1 (siehe Abschnitt 1.3.3.) indirekt über das TRADD Moleküle postuliert, jedoch experimentell nie direkt nachgewiesen (Brodeur *et al.*, 1997; Devergne *et al.*, 1996; Izumi und Kieff, 1997). TRADD bindet über seinen N-Terminus an LMP1 (siehe Abb. 1.6) und nicht wie an den TNF-R1 über seine Todesdomäne (siehe Abb. 1.4) (Kieser *et al.*, 1999). Eine TRADD Mutante, der die Todesdomäne fehlt, kann effizient den CTAR2/NF- κ B Signalweg blockieren (Kieser *et al.*, 1999). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass TRADD in der Induktion des CTAR2/NF- κ B Signalwegs involviert ist. Ein wirklicher Beweis hierfür fehlt aber bis heute und soll im Rahmen dieser Doktorarbeit erbracht werden. Durch Untersuchungen des CTAR2/NF- κ B Signalwegs u.a. in Zelllinien, die für verschiedene Signalmoleküle defizient sind, konnten unterhalb von TRADD die Moleküle TRAF6, IRAK1, TAK1 und IKK β als essentielle Bestandteile des kanonischen CTAR2/NF- κ B Signalwegs

identifiziert werden (Luftig *et al.*, 2003; Schultheiss *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2004) (siehe Abb. 1.6.).

Ein zweiter wichtiger durch LMP1 induzierter Signalweg, der ausschließlich von einer sogenannten JNK-Aktivierungsregion (JAR, As 379 bis 384) innerhalb von CTAR2 aktiviert wird, ist der c-jun N-terminale Kinase (JNK) Signalweg (Kieser *et al.*, 1997). Die Mutation des PxQxT Motivs in CTAR1 hat demnach keinen Einfluss auf die Aktivierung des JNK Signalwegs. Die Aktivierung von JNK1/2 durch LMP1 verläuft abhängig von TRAF3/6 über die Kinase TAK1, die JNK-Kinase SEK1 (MKK4) und führt zur Phosphorylierung von c-jun durch JNK, einem Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplexes (siehe Abb. 1.6 und Abschnitt 1.3.3.) (Kieser *et al.*, 1997; Wan *et al.*, 2004; Xie und Bishop, 2004). LMP1 induziert AP-1-abhängige Transkription (Kieser *et al.*, 1997), wobei die biologische Funktion der AP-1 Aktivierung im Kontext von LMP1 bis heute experimentell nicht charakterisiert werden konnte. Da die JNK-Aktivierungsregion mit der TRADD-Binderegion von LMP1 (As 384 bis 386) überlappt (Eliopoulos *et al.*, 1999; Floettmann und Rowe, 1997; Izumi und Kieff, 1997; Kieser *et al.*, 1999), stellte sich die Frage, ob TRADD an der Induktion des JNK Signalwegs beteiligt ist. Diese Frage kann erschöpfend nur durch ein TRADD defizientes Zellsystem beantwortet werden. Ein solches fehlte bis heute und sollte deshalb im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt werden. Ein weiteres Signalmolekül, das direkt die CTAR2 von LMP1 bindet, ist die Rezeptor-interagierende Kinase 1 (RIP1) (Izumi *et al.*, 1999b), deren Funktion in der LMP1 Signaltransduktion bis heute unklar ist.

Ein dritter Signalweg, der durch LMP1 induziert wird, ist der p38 MAPK Signalweg (Eliopoulos *et al.*, 1999; Vockerodt *et al.*, 2001). CTAR1 und CTAR2 kooperieren bei der Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg durch TRAF6 und MKK6 vermittelt wird (Schultheiss *et al.*, 2001) (siehe Abb. 1.6). Eine biologische Funktion des LMP1/p38 MAPK Signalwegs ist in Burkitt-Lymphom Zellen die Induktion von Interleukin-6/8/10 (Eliopoulos *et al.*, 1999; Vockerodt *et al.*, 2001). Weitere biologische Funktionen dieses Signalwegs sind nicht bekannt.

1999 konnte von Gires und Kollegen eine dritte Aktivierungsregion im C-Terminus von LMP1 aufgeklärt werden (siehe Abb. 1.5), über die durch Autophosphorylierung von

JAK3 der STAT Signalweg induziert werden kann (Gires *et al.*, 1999). Die Aktivierung dieses Signalwegs ist ein sehr frühes Ereignis nach Expression von LMP1. Der JAK-STAT Signalweg ist in einigen zellulären Regulationsmechanismen wie der Regulation der Zellproliferation (Leonard und O'Shea, 1998; Macchi *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1995) oder der Inhibition von Apoptose (Catlett-Falcone *et al.*, 1999) involviert. Obwohl der JAK-STAT Signalweg in transformierten lymphoblastoiden Zelllinien aktiv ist, konnte keine Relevanz bei der Transformation von B-Lymphozyten festgestellt werden (Izumi *et al.*, 1999a).

LMP1 wird funktional oft mit Mitgliedern der TNF-Rezeptor Familie, wie dem TNF-R1 und CD40, verglichen. Hinsichtlich der biologischen Effekte LMP1 vermittelter Signaltransduktion ähnelt LMP1 stärker CD40 (Gires *et al.*, 1997; Kilger *et al.*, 1998; Lam und Sugden, 2003; Uchida *et al.*, 1999). In transgenen Mäusen konnte aber gezeigt werden, dass LMP1 Signaltransduktion die CD40 Signaltransduktion nicht ersetzen kann (Panagopoulos *et al.*, 2004). Auf molekularer Ebene sind jedoch mehr Gemeinsamkeiten mit dem TNF-R1 zu erkennen (Izumi *et al.*, 1999b; Izumi und Kieff, 1997; Kieser *et al.*, 1999). LMP1 bindet sowohl TRADD als auch RIP1, was für CD40 nicht bekannt ist. Um ein besseres Verständnis der molekularen und biologischen Zusammenhänge der LMP1 Signaltransduktion zu erlangen, bedarf es weiterer, intensiver molekularbiologischer Forschung. Einen Beitrag zu diesem Verständnis soll diese Doktorarbeit leisten.

1.5. Aufgabenstellung

Ein Schlüsselmolekül zum Verständnis der Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 und des viralen Onkogens LMP1 ist das Adapterprotein TRADD. Die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des TNF-R1 und LMP1 steht im zentralen Interesse dieser Doktorarbeit.

Während angenommen wird, dass TRADD als Plattform zum Aufbau des TNF-R1 Signalkomplexes dient und essentiell für die Aktivierung aller wichtigen Signalwege des TNF-R1 ist, ist die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion von LMP1 vollkommen unklar. Alle heutigen Erkenntnisse über die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des TNF-R1 und von LMP1 wurden entweder durch die Anwendung dominant-negativer TRADD Mutanten, der Überexpression von TRADD oder durch Interaktionsstudien von TRADD mit dem TNF-R1 bzw. LMP1 gewonnen. Einige Ergebnisse dieser Experimente und die daraus getroffenen Schlussfolgerungen sind widersprüchlich und werfen eine Reihe neuer Fragen auf.

Das einzig zuverlässige System zur Klärung der Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des TNF-R1 und LMP1 ist ein *TRADD*-defizientes Zellsystem. Während heutzutage für praktisch alle Signalmoleküle der TNF-R1 bzw. LMP1 Signaltransduktion schon „*knockout*“ Zelllinien oder Mausmodelle existieren, fehlt ein solches gerade für *TRADD*, das zentrale Signalmoleküle beider Signalkomplexe. In der Vergangenheit wurde bereits versucht, ein *TRADD*-defizientes Mausmodell zu etablieren, was aber an der sehr frühen Letalität der homozygot *TRADD*-defizienten Embryonen scheiterte.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, in einer humanen B-Zelllinie beide *TRADD* Allele durch homologe Rekombination zu deletieren und dadurch eine *TRADD*-defiziente B-Zelllinie zu etablieren. In diesen *TRADD*-defizienten B-Zellen sollte dann die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion von TNF-R1 und LMP1 untersucht werden. Zusätzlich sollten biochemische Fragestellungen über die Zusammensetzung des TNF-R1 und LMP1 Signalkomplexes in Abwesenheit von TRADD beantwortet werden.

2. Material

2.1. Antikörper

Primärantikörper

α -Actin (I-19); Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -CD40 (C-20); Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -Flag (M2); Maus, monoklonal	Stratagene, Sigma
α -HA (3F10); Ratte, monoklonal	Roche
α -HA (12CA5); Maus; monoklonal	Roche
α -I-kB α (C-21); Kaninchen, monoklonal	Santa Cruz Biotech.
α -JNK1 (C17); Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -JNK2 (FL); Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech.
α -LMP1 (CS1-4); Maus, Mischung aus vier monoklonalen Ak	Dako
α -TNFR1 (H-5); Maus, monoclonal	Santa Cruz Biotech.
α -TRADD; Maus, monoklonal	Transduktion Lab.
α -TRAF2 (C-20); Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotech.

Phosphospezifische Primärantikörper

Alle verwendeten phosphospezifischen Antikörper sind polyklonale Antikörper aus Kaninchen.

α -Phospho-I-kB α (Ser32)	Cell Signaling (NEB)
α -Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling (NEB)
α -Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling (NEB)

Sekundärantikörper

α -Maus IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Promega
α -Kaninchen IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Promega
α -Kaninchen IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Cell Signaling (NEB)

α -Kaninchen IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Ziege	Dianova
α -Ziege IgG; Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Esel	Jackson Laboratories/ Dianova

2.2. Plasmide

Alle Plasmide wurden mit dem Jetstar-Maxipräparationssystem präpariert.

<u>Plasmidbezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>
pRK5	Expressionsvektor mit CMV-Promotor/Enhancer (Schall <i>et al.</i> , 1990)
pcDNA3.1	Expressionsvektor mit SV40-Promotor/Enhancer (Invitrogen)
pHEBO-URA	Expressionsvektor mit SV40-Promotor/Enhancer, (Sugden <i>et al.</i> , 1985) (Julia Neugebauer und Arnd Kieser)
RPCIP704M111012	pCYPAC2-Vektor, isoliert aus der humanen Blutzellbank RPCI 1, 3-5 (RZPD, Pieter de Jong), der den gesamten humanen <i>TRADD</i> Locus enthält (Birgit Kohlstaal und Arnd Kieser)
pACYC184.1012.4	Plasmid pACYC184, in den der gesamte humane <i>TRADD</i> Locus aus RPCIP704M111012 über EcoRI kloniert wurde (Christian Kaiser und Arnd Kieser)
pSV-HA-LMP1	LMP1 Wildtyp (As 6-386) aus dem EBV-Stamm B95.8 mit N-terminalem Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) in pHEBO-Expressionsvektor; SV40-Promotor/ Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1997)
pSV-HA-caoLMP1	basierend auf pSV-HA-LMP1; die Transmembrandomänen von B95.8-LMP1 wurden durch die Transmembrandomänen von cao-LMP1 (Hu <i>et al.</i> , 1991) ersetzt (Helmut Kutz und Arnd Kieser)

pSV-HA-LMP1 Δ 194-386	LMP1 Mutante, bei der die gesamte zytoplasmatische Signaldomäne von LMP1 deletiert wurde, in pHEBO Vektor; SV40-Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
pSV-HA-LMP1(PQT>AAA)	LMP1 Mutante, bei der im PxQxT Motif der TRAF-Interaktionsdomäne in CTAR1 die As Pro ₂₀₄ , Gln ₂₀₆ und Thr ₂₀₈ jeweils zu Ala (AxAxA) mutiert wurden; SV40-Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
pSV-HA-LMP1(Y384G)	LMP1 Mutante Y384G, in der das Tyrosin 384 in CTAR2 zu Glycin mutiert wurde; SV40-Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
pSV-HA-caoLMP1(Y384G)	pSV-HA-caoLMP1 mit Y384G (Helmut Kutz und Arnd Kieser)
pSV-HA-LMP1 (PQT>AAA/Y384G)	LMP1 Mutante PQT>AAA und Y384G in pHEBO Vektor; SV40-Promotor/Enhancer (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
pSV-HA-LMP1 Δ 371	B95.8 LMP1 ohne As 371-386 der CTAR2-Domäne in pHEBO-Expressionsvektor; SV40-Promotor/Enhancer (Nicola Liefold und Arnd Kieser)
pSV-HA-caoLMP1 Δ 371	pSV-HA-caoLMP1 mit Δ 371 Deletion (Helmut Kutz und Arnd Kieser)
pSV-LMP1-CD40	chimäres Fusionsprotein zwischen den Transmembrandomänen von LMP1 (As 1-190) und der zytoplasmatischen Signaldomäne (As 223-280) des CD40 Rezeptors in pHEBO Vektor; SV40-Promotor/Enhancer (Gires <i>et al.</i> , 1997)
pSV-HA-LMP1-TNFR1	chimäres Fusionsprotein zwischen den Transmembrandomänen von B95.8-LMP1 (As 6-190) und der zytoplasmatischen Signaldomäne (As 206-426) des TNF-Rezeptors 1 in pHEBO Vektor mit N-terminalem HA-Epitop; SV40-Promotor/Enhancer (Ferdinand Reicheneder und Arnd

	Kieser) (Dudziak <i>et al.</i> , 2003; Schneider und Kieser, 2004)
pSV-HA-caoLMP1-TNFR1	basierend auf pSV-HA-LMP1-TNFR1, bei dem die Transmembrandomänen von B95.8-LMP1 durch die Transmembrandomänen von cao-LMP1 (Hu <i>et al.</i> , 1991) ersetzt wurden (Helmut Kutz und Arnd Kieser)
pRK5-TRAF2 wt	TRAF2 (As 1-501) in Expressionsvektor pRK5; CMV Promotor/Enhancer (David Templeton)
pEGFP-C1	modifizierter Expressionsvektor für EGFP (<i>enhanced green fluorescence protein</i>) mit Neomycin Phosphotransferasegen (Cormack <i>et al.</i> , 1996) (Clontech)
pRK5-myc-hTRADD	humanes TRADD mit N-terminalem myc-Epitop in pRK5 (Hsu <i>et al.</i> , 1995)
pRK5-myc-hTRADD(1-194)	dominant-negative TRADD Mutante (As 1-194), bei der die Todesdomäne deletiert wurde, mit N-terminalem myc-Epitop in pRK5 (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
pRK5-myc-hTRADD(194-312)	TRADD Mutante (As194-312), bei der der N-terminale Bereich deletiert wurde, mit N-terminalem myc-Epitop in pRK5 (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
pRK5-myc-TRADD _{296-299A}	TRADD Mutante, bei der die As 296-299 in Alanin mutiert wurden, mit N-terminalem myc-Epitop in pRK5 (Kieser <i>et al.</i> , 1999)
pGL3-hTRADD-luc	TRADD-Promotor Luziferasekonstrukt, bei dem der Bereich von Position -390 bis +3214 des humanen TRADD Locus mit dem Luziferasegen verknüpft wurde, in pGL3 Basisvektor (Arnd Kieser)
pRK5-HA-JNK1	c-jun N-terminale Kinase 1 mit N-terminalem HA-Epitop in pRK5; CMV-Promotor/Enhancer (Ute Schultheiss)

pCDNA3-Flag-IKK β	I- κ B α Kinase β (IKK β) mit N-terminalem Flag-Epitop in Expressionsvektor pCDNA3 (Jun-Hsiang Lin, Philadelphia)
pCMV-I- κ B $\alpha_{32/36A}$	I- κ B α , mutiert in As 32 und 36 zu Alanin, in Expressionsvektor pCMV (Traenckner <i>et al.</i> , 1995)
pCDNA3.1-p35	Bakulovirus Protein p35 in pCDNA3.1(+) (Seshagiri und Miller, 1997b)
p1891	pBS185 Expressionsvektor für Cre Rekombinasegen mit CMV-Promotor/Enhancer (Sauer und Henderson, 1990)
p2282	Gentargeting-Vektor mit Hygromycin B Phosphotransferase, EGFP und Thymidinkinase in einem pUC18 Derivat (Feederle <i>et al.</i> , 2004)
pGEX-2T	bakterielles Expressionsplasmid für die Glutathion-S-Transferase (GST) mit <i>tac</i> -Promotor für chemische Induktion, MCS (Amersham Pharmacia)
pGEX2T-hTNFR1	GST fusioniert mit der intrazellulären Signaldomäne des humanen TNF-Rezeptor 1 (As 206-426) (Arnd Kieser)
pGST-c-jun	GST fusioniert mit der Transaktivierungsdomäne von c-jun
pGST-I- κ B α	GST fusioniert mit I- κ B α in einem bakteriellen Expressionsplasmid (Stephan Ludwig)
p1768 (3 \times κ B-Luc)	Luziferase-Reportergenkonstrukt mit minimalem <i>fos</i> Promoter und drei NF- κ B Bindestellen (Bill Sugden, Madison, USA)
PGK- β Gal	Galaktosidase-Reportergenkonstrukt unter Kontrolle eines <u>Phosphoglycerat</u> kinasepromotors (PGK) (Stefan Wagener)

2.3. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (München) synthetisiert. Die Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung angegeben.

Oligonukleotide für die Klonierung der *TRADD*-Gentargeting Vektoren

AK153/Oligo1 TRADD-ko

GGGGGGCTCGAGACATGTGCTTCTACCGTTCGTATAGCATAACATTATACGAA
GTTATCTCTTGC GGCCGCACGACTGCCGAAGAGCGATATCATTCCATA

AK154/Oligo2 TRADD-ko

GGGGGGCCTGCAGGTTAATTAAGATCGGCCGGCCCGAGATACCGTTCGTAT
AATGTATGCTATACGAAGTTATGGAATGATATCGCTCTTCGGCAGTCGTGC

FS36 GGGGGGGGCGGCCGGACCTGCTTTGGAGATCAGCCTC
FS37 GGGGGGGTTAATTAAGTGGTGGCTTATGCCTGTAACCTC

RT-PCR Primer

GAPDH 5'Primer	GCACCACCAACTGCTTAGCACC
GAPDH 3'Primer	GTCTGAGTGTGGCAGGGACTC
FS46/TNFR1sense ¹	ATTTGCTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACC
FS47/TNFR1anti ¹	GTCGATTTCCACAAACAATGGAGTAGAGC
FS48/TNFR2sense ¹	GAATACTATGACCAGACAGCTCAGATGTGC
FS49/TNFR2anti ¹	TATCCGTGGATGAAGTCGTGTTGGAGAACG

¹ übernommen aus (Aggarwal *et al.*, 1999)

Sequenzierprimer

CMV promotor ²	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
SV40Profor ²	GCCCCTAACTCCGCCGCCCATCC
SP6 ²	CGATTTAGGTGACACTATAG
T7 ²	TAATACGACTCACTATAGGG
EGFP-Cfor ²	AGCACCCAGTCCGCCCTGAGC

EGFP-Nrev² CGTCGCCGTCCAGCTC

² Standardsequenzierprimer der Firma Sequiserve (München)

FS15/Sequiprimer 2282del.+P2 GACACCCTCATCAGTGCCAAC

FS50/p2282/Hyg-GFP 5´ von Hyg CAGCTCTTGTTCGGTCCGGC

FS51/p2282/Hyg-GFP in Hyg GACCGATTCTTGCGGTCCG

FS52/HSV-TK Anfang GATTGCCCGACATTATCGTCG

FS53/HSV-TK Mitte CCACACAACACCGCCTCGACC

FS54/HSV-TK Ende CCTGCTGCAACTTACCTCCGG

siRNA Oligonukleotide

Die TRADD-spezifischen siRNA Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen (Hilden) synthetisiert.

FS/siRNA1 (20µM), Sequenz aus (Wan *et al.*, 2004)

DNA Zielsequenz AACTGGCTGAGCTGGAGGATG

RNA-Duplex Sequenz *sense* r(CUGGCUGAGCUGGAGGAUG)d(TT)

RNA-Duplex Sequenz *antisense* r(CAUCCUCCAGCUCAGCCAG)d(TT)

Kontroll-siRNA, Alexa Fluor 488-gekoppelt (20µM), (Qiagen)

Ziel Sequenz AATTCTCCGAACGTGTCACGT

RNA-Duplex Sequenz *sense* r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)dTdT

RNA-Duplex Sequenz *antisense* r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)dTdT

Kontroll-siRNA (20µM), (Qiagen)

Ziel Sequenz AATTCTCCGAACGTGTCACGT

RNA-Duplex Sequenz *sense* r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)dTdT

RNA-Duplex Sequenz *antisense* r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)dTdT

2.4. Humane Zelllinien

Akata	humane, EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie (Shimizu <i>et al.</i> , 1994)
BJAB	humane, EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie (Clements <i>et al.</i> , 1975)
BL2	humane, EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie (Emanuel <i>et al.</i> , 1986)
BL70	humane, EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie (Lenoir <i>et al.</i> , 1985)
DG75	humane, EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie (Ben-Bassat <i>et al.</i> , 1977)
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie Zelllinie (Schneider <i>et al.</i> , 1977)
Raji	humane, EBV-positive Burkitt-Lymphom Zelllinie (Pulvertaft und Humble, 1962)
HEK293	humane, embryonale Nierenepithel Zelllinie, die durch Expression der E1a und E1b Gene des Adenovirus Typ5 transformiert wurde (Graham <i>et al.</i> , 1977)
HeLa	humane Zervixkarzinom Zelllinie (Scherer <i>et al.</i> , 1953)

DG75 Zelllinien

Die im folgenden aufgeführten DG75 Zelllinien wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt.

DG75 Klon 4.53	DG75 Klon mit heterozygotem $TRADD^{+/-}$ Locus vor Cre-Rekombination
DG75 Klon 4.53.2	DG75 Klon mit heterozygotem $TRADD^{+/-}$ Locus nach Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53
DG75 Klon 4.53.2.9	DG75 Klon mit homozygotem $TRADD^{-/-}$ Locus vor Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53.2

DG75 Klon 9.3	DG75 Klon mit homozygotem <i>TRADD</i> ^{-/-} Locus nach Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53.2.9
DG75 Klon 4.53.2.12	DG75 Klon mit homozygotem <i>TRADD</i> ^{-/-} Locus vor Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53.2
DG75 Klon 12.2	DG75 Klon mit homozygotem <i>TRADD</i> ^{-/-} Locus nach Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53.2.12
DG75 Klon 12.3	DG75 Klon mit homozygotem <i>TRADD</i> ^{-/-} Locus nach Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53.2.12
DG75 Klon 12.7	DG75 Klon mit homozygotem <i>TRADD</i> ^{-/-} Locus nach Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53.2.12
DG75 Klon 12.9	DG75 Klon mit homozygotem <i>TRADD</i> ^{-/-} Locus nach Cre-Rekombination, entstanden aus Klon 4.53.2.12

2.5. Bakterien

<i>E. coli</i> DH5 α	F-, F80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> DH10B	F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ -, <i>rspL</i> , <i>nup6</i> (Life Technologies)

2.6. Chemikalien, Enzyme, Geräte und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von Sigma Chemie (München) oder Merck-Eurolab GmbH bezogen.

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

ECL-Westernblotting Reagenzien, Hybond-C-Nitrozellulosemembran für Westernblot, Hybond-N+-Nylonmembran für Southern-Blot, γ ³²P-ATP (3000Ci/mmol), GammaBind®Plus Sepharose, Glutathion-Sepharose®4B, Monolaurat (Tween-20), Röntgenfilme Hybond Hyperfilm für ECL und Autoradiographie

Beckman, Palo Alto, USA

J25 Zentrifuge mit JA-10 und JA-25.50 Rotor, Coulter Particle Counter Z1 (Partikelzählgerät)

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße (Falcon) 15 und 50ml, Zellkulturflaschen, 96-Loch-, 48-Loch-, 24-Loch-, 6-Loch-Platten, Zellschaber, FACSCalibur

Berthold GmbH & Co, Wildbad 1

Microumat LB96P

Biocat GmbH, Heidelberg

Actinomycin D (10mM), Cy5 gekoppeltes Annexin V Apoptosis Detection Kit, Caspase-Family Inhibitor (z-VAD-fmk), Cycloheximide (100mM)

BioRad, München

Genepulser II, Elektroporationsküvetten, „*Prestained SDS-Page Standards Low Range*“ und „*Kaleidoskop*“

Branson, USA

Digitaler Sonifikator (Model 250-D)

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Kühlzentrifuge 5415R, 1,5ml und 2ml Plastikreaktionsgefäße, BioPhotometer, Heizblock, Thermomixer compact

Fuji PhotoFilm Co., Ltd. Japan

PhosphoImager Fujix Bioimaging Analyser System (BAS-1000)

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

Gibco BLR, Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), Fötale Kälberserum, L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Zellkulturmedium RPMI 1640 und DMEM

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit

Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK

DNAzol® Reagent, Lipofectamine™2000, 1kb DNA Standard, TA-Cloning-Kit, SuperScript™III RNase H⁻ Reverse Transkriptase,

Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

Heraeus Zentrifuge, Multifuge 3 L-R

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 3ml, Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen

New-England-Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, Vent-DNA-Polymerase, 100bp DNA Standard, "Lambda-DNA-BstEII Digest Standard"

Qiagen, Hilden

DNA-Gelextraktions Kit, PCR-Reinigungs kit, RNAesy RNA Extraktionskit, HPP siRNA Oligonukleotide FS/siRNA1 und Kontroll-siRNA Oligonukleotide

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), desoxy Nucleotidtriphosphat-Mix (dNTPS) PCR Grade, alkalische Schrimpsphosphatase, alkalische Kälberphosphatase, Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, humanes TNF α , Highprime Mix, Luziferin, Ribonuclease H

Roth, Karlsruhe

Roti-Block®

Stratagene, Heidelberg

Stratalinker, UV Bestrahlungsgerät

Tropix, Massachusetts, USA

Galacton™-Plus, Emerald™-Lösung

Zeiss, Oberkochen

Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit hochauflösender Digital-Videokamera (Hamamats)

3. Methoden

3.1. Bakterienkultur

3.1.1. Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Antibiotikaresistenz wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Ampicillinresistente Klone wurden mit 100 µg/ml Ampicillin und kanamycinresistente Klone mit 30 µg/ml Kanamycin selektioniert. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde den über Nacht gewachsenen Kulturen 15 % Glycerin zugesetzt und die Kultur bei -80°C eingefroren.

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl

LB-Agar-Platten: 15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium

3.1.2. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Stämme DH5α und DH10B erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Zu einem Aliquot (200 µl) dieser Bakterien wurden ganze Ligationsansätze bzw. ca. 10 pg Plasmid-DNA und 7 µl DMSO pipettiert und für zwei Minuten bei 42°C in einem Thermoheizblock inkubiert. Die transformierten Ligationsansätze wurden daraufhin in 5 ml SOC-Medium für 30 min bei 37°C kultiviert. Nach Sedimentation wurden die Bakterien in ca. 200 µl verbleibendem SOC-Medium resuspendiert und mit einem Glasspatel auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Die kommerziell erhältlichen, transformationskompetenten Bakterien TOP10 und INFαF' der Firma Invitrogen wurden nach dem Protokoll des Herstellers transformiert.

<u>TFB-Puffer:</u>	10 mM K-Mes (pH 6,2), 50 mM CaCl ₂ , 45 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl
<u>SOB-Medium :</u>	2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
<u>SOC-Medium :</u>	SOB-Medium mit 0,2 % (w/v) Glucose

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zellkulturbedingungen

Alle humanen Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und einer 5 %igen CO₂ Atmosphäre kultiviert. Dem Kulturmedium RPMI 1640 wurden 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, 50 IE/ml Penicillin, 1 UG/ml Amphotericin B (Fungizone) und 1 mM Natriumpyruvat zugegeben (RPMI Vollmedium). DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) wurden 10 % fötales Kälberserum, 1 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, 50 IE/ml Penicillin und 1 UG/ml Amphotericin B (Fungizone) zugegeben (DMEM Vollmedium).

3.2.1.1. Adhärent wachsende Zelllinien

Die humane Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa wurde in DMEM Vollmedium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen 1:10 verdünnt und in neuen Kulturgefäßen ausgesät. Die humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie HEK293 wurde in RPMI Vollmedium kultiviert. Die Verdünnung der dicht gewachsenen Kultur erfolgte analog zu den HeLa Zellen.

3.2.1.2. Suspensionszelllinien

Die Zelllinien BL2, BJAB, DG75, Jurkat und Raji wurden in RPMI Vollmedium kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen zwischen 1:2 und 1:10 in frischem Kulturmedium verdünnt.

3.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl in Kultur

Zur Bestimmung der Zellzahl im Kulturmedium, wurde ein Partikelzähler (CoulterCounter™ Z1) verwendet. HeLa Zellen wurden bei einem Ausschlussdurchmesser von 8 nm und alle Suspensionszelllinien bei einem Ausschlussdurchmesser von 5 nm gezählt. Dazu wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in 10 ml isotonen „CoulterCounter“ Puffer gegeben und gut gemischt. Das Messgerät gibt bei Einstellung des Faktors 100 die Zellzahl pro Milliliter an.

3.2.2. Aufbewahrung von Zellen über längere Zeiträume

Um Zellen über längere Zeiträume aufzubewahren, wurden $1-2 \times 10^7$ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (DMEM oder RPMI mit 25 % FKS und 7,5 % DMSO) bei -80°C eingefroren. Um eine langsame Abkühlung zu gewährleisten, wurden die Zellsuspensionen in 2 ml Cryotubes (Nunc-Cryotube™) transferiert und in einem speziellen Einfriercontainer (Nalgene™Cryo 1°C Freezing Container), der Isopropanol enthält, bei -80°C eingefroren. Der verwendete Einfriercontainer gewährleistet eine Abkühlgeschwindigkeit von -1°C pro Minute. Zellen, die zur Langzeitlagerung bestimmt waren, wurden spätestens nach 1 bis 2 Wochen von -80°C in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen eingefrorener Zellen wurde in einem 37°C warmen Wasserbad durchgeführt.

3.2.3. Elektroporation humaner Zelllinien

Die humanen Burkitt-Lymphom Zelllinien BL2, BJAB und DG75 und die humane T-Zell-Leukämie Zelllinie Jurkat wurden mittels Elektroporation transfiziert. Dazu wurden die Zellen (5×10^6 bis 1×10^7 Zellen) in 250 µl Vollmedium mit 10 bis 20 µg Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt und für ca. 10 min inkubiert. Daraufhin wurde der Mix aus Zellen und Plasmid-DNA mit einer 1000 µl Gilson Pipette vorsichtig und ohne Schaumbildung gemischt und anschließend in eine 4 mm Elektroporationsküvette (Biorad, PeqLab) überführt. Um den Einfluss der Materialeigenschaften der Küvetten auf die Transfektionseffizienz und Überlebensrate der Zellen zu minimieren, wurde für transiente Transfektionen für jeden Ansatz dieselbe Elektroporationsküvette verwendet. Zwischen den einzelnen Transfektionsansätzen

wurde die Küvette mit Wasser ausgespült. Bei Transfektionen zur Etablierung stabiler Zelllinien oder zur Herstellung von *TRADD*^{-/-} Klonen wurden sterile Elektroporationsküvetten verwendet. Dadurch sollten Kontaminationen der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen verhindert werden. DG75 Zellen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, bei 240 V und 975 µF, BJAB und Jurkat Zellen bei 180 V und 975 µF im Biorad Genepulser II elektroporiert. Nach der elektrischen Entladung wurden sofort 400 µl FKS in die Elektroporationsküvette pipettiert und der gesamte Ansatz in 5 ml Vollmedium in eine 6-Loch-Platte überführt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

3.2.4. Transfektion von siRNA Oligonukleotiden in HeLa Zellen

Um TRADD-spezifische siRNA bzw. Kontroll-siRNA Oligonukleotide in HeLa Zellen zu transfizieren, mussten zuvor die Transfektionsbedingungen optimiert werden. Dazu wurden zwei Transfektionsreagenzien, RNAifect (Qiagen) und Lipofectamine2000™ (Invitrogen), getestet. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurde in einer Reihe von Transfektionen das beste Verhältnis zwischen siRNA Konzentration, Volumen des Transfektionsreagenzes und Anzahl an transfizierten Zellen ermittelt. Dafür wurden Alexa-Fluor 488 gekoppelte siRNA Oligonukleotide (siehe Abschnitt 2.3.) transfiziert, bei denen man die Transfektionseffizienz direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüfen kann (siehe Abschnitt 4.5.1.). Es wurde ein optimiertes Transfektionsprotokoll erstellt, mit dem wie im folgenden beschrieben, TRADD-spezifische siRNA Oligonukleotide in HeLa Zellen transfiziert wurden.

Um eine maximale Reduktion der TRADD Proteinexpression für die in Abschnitt 4.5. beschriebenen Experimente zu erreichen, wurden TRADD-spezifische siRNA Oligonukleotide zweimal an aufeinander folgenden Tagen mit Lipofectamine2000™ (Invitrogen) in HeLa Zellen transfiziert. 48 h nach der zweiten Transfektion wurden die weiteren Experimente durchgeführt.

Zur Transfektion von siRNA Oligonukleotiden in HeLa Zellen wurden die Zellen zwei Tage vor der ersten Transfektion in 6-Loch-Platten (1 bis 2x 10⁵ Zellen pro Loch) ausgesät. Die Zellen brauchen ausreichend Zeit, um gut an der Oberfläche der Kulturgefäße zu adhären. Dies verhindert ein Ablösen und Absterben der Zellen während der Behandlung mit der Transfektionsreagenz. Zur Transfektion wurden

jeweils 96 μ l Optimem I Medium (Invitrogen) mit 4 μ l Lipofectamine2000TM und 85 μ l Optimem I mit 15 μ l siRNA Lösung (20 μ M) in FACS Röhren (Becton Dickinson) gemischt. Die Lösungen wurden nach 5 min vereinigt und für 20 min bei RT zur Bildung eines siRNA-Liposomenkomplexes inkubiert. Nach Komplexbildung wurden 2 ml Optimem I Medium zugegeben, und die Lösung vorsichtig auf die Zellen, die zuvor einmal mit PBS gewaschen wurden, getropft. Die Zellen wurden für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C mit dem Transfektionsgemisch inkubiert. Danach wurde das Transfektionsgemisch abgenommen, durch 2 ml frisches DMEM Vollmedium ersetzt und die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Dieselbe Prozedur wurde nach 24 Stunden wiederholt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen mit Trypsin-EDTA (1x) von den 6-Loch-Platten abgelöst und in die entsprechenden Kulturgefäße (24-Loch- oder 6-Loch-Platten) in der für die folgenden Experimente benötigten Zelldichte neu ausgesät. Nach weiteren 24 Stunden wurden TNF α Stimulationsexperimente durchgeführt.

3.2.5. Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)

Zur Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen in transienten Zelltodexperimenten (siehe Abschnitt 4.2. und 4.4.3.) wurden die transfizierten B- oder T-Zellen geerntet, sedimentiert (1200 Upm, 5 min, 20°C), einmal in PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit 3 % FKS und 0,5 μ g Propidiumiodid (PI) resuspendiert (Belloc *et al.*, 1994). Die Zellen wurden nach 5 min an einem FACSCalibur (Becton Dickinson) für 1 min bei mittlerer Durchflussgeschwindigkeit (entspricht hier einem analysierten Volumen von 44 μ l) auf GFP Expression (Kanal FL1) und PI Färbung (Kanal FL3) analysiert. Es wurden sowohl lebende als auch tote Zellen im FACS gemessen und gespeichert. Dabei wurde zum Ausschluss kleiner subzellulärer Fragmente eine Ausschlussgrenze im „forward scatter“ von 108 in einer 1024 Kanalskala eingestellt. Es ist entscheidend, dass innerhalb des Experimentes alle Einstellungen am FACS Gerät beibehalten werden.

Zur Analyse apoptotischer HeLa Zellen nach TNF α Stimulierung (siehe Abschnitt 4.5.3.) wurden die Zellen von der Kulturplatte mit Hilfe von Trypsin abgelöst, einmal in PBS gewaschen und in 300 μ l Annexin V-Testpuffer mit 3 μ l Cy5 gekoppeltem Annexin V (Biotec, Heidelberg) und 0,5 μ g/ml PI resuspendiert. Nach 5 min Inkubation

im Dunklen wurden die Annexin V und PI gefärbten Zellen an einem FACSCalibur (siehe oben) auf Annexin V positive und PI negative Zellen (AnnexinV+/PI- Zellen) analysiert. Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Cellquest Pro™ der Firma BD Biosciences Pharmingen durchgeführt.

3.3. DNA-Arbeitstechniken

3.3.1. Plasmid-Schnellaufreinigung

Die Plasmidpräparation erfolgte nach einer modifizierten „Boiling Method“ von *Holmes* (Holmes und Quigley, 1981). 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß sedimentiert (30 sec., 13000 g, RT). Die Überstände wurden quantitativ abdekantiert und das Zellsediment in 250 µl M-Sted Lysepuffer mit 7 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden zur Denaturierung der bakteriellen, genomischen DNA die Reaktionsgefäße für 2 min in ein Sandbad mit 100°C gesteckt. Danach wurden die Ansätze für 5 min auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 13000 g abzentrifugiert. Die Überstände enthielten die gewünschte Plasmid-DNA, die zur Restriktionsverdauung verwendet werden konnte.

M-Sted Lysepuffer: 0,5 % Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 % (w/v) Sucrose, 25 mM EDTA (pH 8,0)

3.3.2. Präparative Plasmidaufreinigung

Die präparative Plasmidaufreinigung im Maxi-Maßstab erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed, Qiagen).

3.3.3. Sonstige DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung gängiger DNA-Arbeitstechniken, wie z.B. enzymatische Restriktionsanalyse, Auftrennung und Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase bzw. Polynukleotidkinase, Ligierung freier DNA-Enden, etc.

erfolgte in enger Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook *et al.*, 1989). Spezielle DNA-Arbeitstechniken, die für die Erzeugung der *TRADD*^{-/-} Zelllinien angewandt und zum Teil optimiert wurden, werden gesondert in Abschnitt 3.6. aufgeführt.

3.4. RNA-Arbeitstechniken

3.4.1. Isolierung gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturzellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen. Alle Puffer und Lösungen sind Bestandteil des Kits. Die Präparation erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

3.4.2. Reverse Transkription zellulärer RNA

Von der isolierten gesamtzellulären RNA (siehe Abschnitt 3.4.1.) wurde 1 µg zur reversen Transkription (RT-Reaktion) in komplementäre DNA (cDNA) verwendet. Die RT-Reaktion wurde mit der Superscript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Um den TNF-R1 und TNF-R2 Status in den Kandidatenzelllinien zu bestimmen, wurde mit der cDNA aus der reversen Transkription (siehe oben) eine PCR mit TNF-R1- und TNF-R2-spezifischen Primern (siehe Abschnitt 2.3.) durchgeführt.

Folgendes PCR Programm wurde angewendet:

1x	5 min	95°C
32x	45 sec	95°C
	45 sec	55°C
	1 min	72°
1x	10 min	72°C
	∞	4°C

3.5. Protein-Arbeitstechniken

3.5.1. Immunoblot-Analyse

Je nach experimentellem Ansatz wurden ca. 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen in entsprechenden Mengen TBST-Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren für 15 min auf Eis lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min, 13000 g, 4°C) abgetrennt. Die lösliche Fraktion wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate im Verhältnis 1:4 mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bei 35 mA auf 12,5 %igen SDS-Gelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard dienten „*prestained molecular weight standards*“ der Firmen Sigma oder Biorad. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe eines flüssigen Elektrotransfer-Verfahrens aus dem Gel auf eine Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia) transferiert. Der Transfer erfolgte in einem Transferpuffer bei 100 V für 36 min. Nach dem Transfer wurden die Membranen für ca. 1 h in TBS mit 5 % (w/v) Magermilch und 0,02 % (w/v) Natriumazid oder bei der Verwendung phosphospezifischer Antikörper in Roti-Block® (Carl Roth) geschwenkt. Dies dient zur Absättigung unspezifischer Proteinbindestellen. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in TBS mit 5 % w/v Magermilchpulver und 0,02 % (w/v) Natriumazid mit den primären Antikörpern in entsprechender Verdünnung (meist 1:1000) inkubiert. Phosphospezifische Antikörper wurden in Roti-Block® inkubiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Membranen dreimal mit TBS und 1 % Tween-20 gewaschen und danach für 1 h mit Sekundäantikörper (Verdünnung 1:3000) inkubiert. Da die Sekundäantikörper mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, darf in dem Inkubationspuffer (TBS mit 5 % w/v Magermilchpulver) kein Natriumazid sein, da Natriumazid die Meerrettich-Peroxidase inaktiviert. Danach wurden die Membranen dreimal für 10 min mit TBS und 1 % Tween-20 gewaschen, fünfmal kurz mit deionisiertem Wasser gespült und mit Verstärker-Chemolumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia) entwickelt.

Um die Membranen mit einem weiteren Primäantikörper zu färben, wurden alle gebundenen Antikörper wieder entfernt. Dies erfolgte durch Inkubation der Membran in

50 ml eines „Stripping-Puffers“ bei ca. 65°C. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS und 1 % Tween-20 und erneutem Blocken der Membran konnten die Immunoblots erneut mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden.

<u>TBS:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
<u>TBST-Lysepuffer:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0), 1 % Triton X-100 Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden immer frisch zugeben: 1 mM PMSF, 0,5 mM β -Glycerophosphat, 0,5 mM Natriumortho- vanadat, 0,5 mM Natriumfluorid, 0,5 mM Natriummolybdat
<u>Laemmli-Puffer (4x):</u>	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 20 % Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 M DTT (frisch zugeben)
<u>Sammelgel-Mix (400 ml):</u>	307 ml H ₂ O, 60 ml 30 % Polyacryamid, 25 ml 2 M Tris-HCl (pH 6,8), 4 ml 10 % (w/v) SDS, 4 ml 0,5 M EDTA pro Gel: 2 ml Sammelgel-Mix + 28 μ l APS + 8 μ l TEMED
<u>12,5 % SDS-Trenngel (100 ml):</u>	41 ml H ₂ O, 41,6 ml 30 % Polyacrylamid, 16,6 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,9), 666 μ l 0,5 M EDTA + 530 μ l APS, 50 μ l TEMED
<u>Einlegelösung für SDS-Gele:</u>	83,3 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,9), 3,3 ml 0,5 M EDTA, 413,4 ml H ₂ O
<u>SDS-Laufpuffer (1x):</u>	30 g Tris, 144 g Glyzin, 100 ml SDS (10 %); ad 1 l H ₂ O
<u>Transferpuffer (10x):</u>	30 g Tris-OH, 95 g Glyzin; ad 1 l H ₂ O
<u>Waschlösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Tween-20
<u>Blocklösung:</u>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Magermilchpulver
<u>Stripping-Puffer:</u>	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 10 mM DTT

3.5.2. Immunkomplex-Kinaseversuch

Die Methode wurde adaptiert von *Kieser* (Kieser, 2001) und wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

3.5.2.1. Immobilisierung von α -HA-Epitop Antikörpern an Protein G-Sepharose Kügelchen

Protein G-Sepharose Kügelchen (80 μ l, Amersham Pharmacia) in Ethanol wurden dreimal in TBS gewaschen. 200 μ g α -HA Antikörper 3F10 (Roche) wurden in 500 μ l PBS mit 4 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (w/v) Natriumazid gelöst. Nach Zugabe des gelösten Antikörpers zu der Protein G-Sepharose wurde der Ansatz für 2 h bei 4°C gedreht. Nachdem die Antikörper an die Protein G-Sepharose Kügelchen

(GammaBind®, Amersham Pharmacia) gebunden hatten, wurden sie präzipitiert (1 min, 4°C, 13000 g), dreimal mit TBST-Lysepuffer gewaschen und in 1,2 ml PBS mit 4 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (w/v) Natriumazid aufgenommen. Die so immobilisierten Antikörper können für mehrere Monate bei 4°C gelagert werden.

3.5.2.2. Immunpräzipitation von HA- oder Flag- fusionierten Proteinen aus Zelllysaten

Für Immunkomplex-Kinaseversuche wurden je Ansatz 5×10^6 Zellen transient mittels Elektroporation transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.3.). Nach ca. 20 h Inkubation wurden die Zellen in 400 µl TBST-Puffer lysiert und klare Zelllysate durch Zentrifugation (20 min, 13000 g, 4°C) hergestellt. Da viele LMP1-Derivate durch ihre Lokalisation in der Zellmembran nach der Zellyse und Präzipitation im Sediment zu finden sind, können diese nur noch teilweise in den klaren Zelllysaten nachgewiesen werden. Deshalb wurden zum Nachweis der Proteinexpression transfizierter Gene vor der Zellyse ca. 10 % der Zellen direkt in 1x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C erhitzt. Zur Immunpräzipitation der HA- bzw. Flag-fusionierten Kinasen wurden die klaren Zelllysate über Nacht bei 4°C mit 20 µl α -HA 3F10 Antikörper gekoppelten Protein G-Sepharose Kügelchen (siehe oben) bzw. in Gegenwart von 5 µl GammaBind® Sepharose Kügelchen und 4 µg ungekoppeltem Anti-Flag (M2) Antikörper gedreht. Die Immunpräzipitate wurden je zweimal mit TBST-Lysepuffer und Kinasereaktionspuffer gewaschen und auf ein Volumen von ca. 30 µl in Kinasereaktionspuffer eingestellt.

Zur Bestimmung der Kinaseaktivität wurde im Anschluss eine *in vitro* Immunkomplex-Kinasereaktion mit radioaktivem γ -³²P-ATP durchgeführt. Die relative Kinaseaktivität der untersuchten Kinasen wurde anhand der Substratphosphorylierung bestimmt, da durch die Enzymaktivität der Kinase das radioaktive γ -³²Phosphat des in den Reaktionsansätzen enthaltenen γ -³²P-ATP auf ein Substrat übertragen wird. Für JNK1 Kinasereaktionen wurde als Substrat die in *E.coli* exprimierte, mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierte Transaktivierungsdomäne von c-jun (GST-c-jun) verwendet (siehe Abschnitt 2.2.). Für IKK β Kinasereaktionen wurde in *E.coli* exprimiertes, GST fusioniertes I- κ B α (GST-I- κ B α) verwendet (Expression und Aufreinigung der Substrate in *E.coli*, siehe Abschnitt 3.5.3.). Zum Starten der Kinasereaktion wurde der immunpräzipitierten Kinase ein Reaktionsmix aus 10 µl

Kinasereaktionspuffer mit $5\mu\text{Ci } \gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (3000Ci/mmol) und ca. $2\mu\text{g}$ GST-fusioniertem Substrat zugegeben und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Kinasereaktionen wurden durch Zugabe von $12\mu\text{l}$ 4x Laemmli-Puffer und sofortiges Erhitzen auf 95°C für 5 min gestoppt. Nach Auftrennung der Proteine auf einem 12,5 %igen SDS-Gel und Transfer auf eine Hybond-ECL-Membran wurden die radioaktiven Membranen autoradiographiert und mit Hilfe eines Fuji BAS 1000 Phosphoimagers quantifiziert.

Kinasereaktionspuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 , 20 mM NaCl, $1\mu\text{M}$ DTT, $2\mu\text{M}$ ATP

3.5.3. Expression von GST-Fusionsproteinen in E.coli

Am Vortag der Proteinpräparation wurde eine 100 ml Vorkultur (LB-Medium mit $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) der entsprechenden Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein (GST-c-jun, GST-I- $\kappa\text{B}\alpha$, GST-TNR1, GST) exprimierenden Bakterien angesetzt. Am folgenden Tag wurden 400 ml LB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 bis 0,8 bei 37°C geschüttelt. Bei Erreichen der richtigen Bakteriendichte wurde die Proteinexpression mit $400\mu\text{l}$ 0,2 M IPTG induziert, und die Bakterien bei 30°C für vier bis fünf Stunden geschüttelt. Daraufhin wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (3000 Upm, 10 min, 4°C) und das Zellsediment in 10 ml PBST-Lysepuffer mit einer Spatelspitze Lysozym aufgenommen. Das Zelllysate wurde für 5 min auf Eis gestellt und daraufhin dreimal für 15 sec sonifiziert, zentrifugiert (19000 Upm, 10 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde das Zelllysate über Nacht mit gewaschenen Glutathion-Sepharose 4B Kügelchen (siehe Anleitung des Herstellers, Amersham Pharmacia) inkubiert, am nächsten Tag dreimal mit PBST-Lysepuffer gewaschen und dreimal mit je $250\mu\text{l}$ Elutionspuffer eluiert. Die drei Eluate wurden vereinigt.

Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 % Triton-X 100, 10 mM Glutathion

PBST-Lysepuffer: PBS + 1 % Triton-X100, 0,01 M DTT (Frisch zugeben)

3.5.4. GST-Kopräzipitationsversuche

Um mit der Signaldomäne von TNF-R1 interagierende Proteine nachzuweisen, wurden Kopräzipitationen mit GST-TNFR1 durchgeführt. Das GST-TNFR1 Fusionsprotein, eine Fusion zwischen der zytoplasmatischen Signaldomäne des TNF-R1 und GST, wurde wie in Abschnitt 3.5.3. beschrieben in *E.coli* exprimiert und an Glutathion-Sepharose 4B Kügelchen (Amersham Pharmacia) gebunden. Das immobilisierte GST bzw. GST-TNFR1 wurde über Nacht mit klaren RIPA Zelllysaten von je 1×10^8 DG75 wt bzw. DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kügelchen sedimentiert (1 min, 13000 g, 4°C) und je dreimal in RIPA-Lysepuffer und PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Kügelchen erneut sedimentiert, auf ein Gesamtvolumen von ca. 30 µl in PBS eingestellt und mit 12 µl 4x Laemmlipuffer für 5 min bei 95°C erhitzt. Die an die Signaldomäne des TNF-R1 bzw. GST gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und es wurden Immunoblot Analysen mit TRADD- und TRAF2-spezifischen Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitt 4.6.1.).

RIPA-Lysepuffer: 1 % (w/v) NP40, 0,5 % (w/v) DOC, 0,1 % (w/v) SDS, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

3.5.5. Isolierung „lipid raft“ assoziierter Proteine

Zur Isolierung von mit „lipid rafts“ assoziierten Proteinen aus DG75 Zellen wurden die entsprechenden Konstrukte (siehe Abschnitt 4.6.2.) in 1×10^7 Zellen mittels Elektroporation transfiziert und die Zellen 24 h nach Transfektion geerntet, einmal in PBS gewaschen und in 380 µl TXNE-Lysepuffer lysiert. Die Zelllysate wurden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogenisiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation auf Eis wurden die Lysate nochmals homogenisiert und mit 520 µl Optiprep™ (Progen) und Proteaseinhibitoren (Complete-Mini Proteaseinhibitorencocktail-EDTA frei; 1 Tablette auf 10 ml Optiprep™; Roche) gemischt. Die Mischung wurde auf den Boden eines 10x60 mm Zentrifugen-Röhrchens (PA, thinwall, 4,4 ml, Drol Laborgeräte) gegeben und vorsichtig mit 2,5 ml 30 % Optiprep™ in TXNE-Lysepuffer und danach mit 0,6 ml TXNE-Lysepuffer überschichtet. Die Ansätze wurden daraufhin in einem SW 60 Ti Beckman Rotor bei 160000 g (entspricht 39000 Upm) und 4°C für 4 h ultrazentrifugiert. Die „lipid rafts“ sind an der oberen

Interphase als weiße Flocken sichtbar. Nach der Zentrifugation wurden von oben acht Fraktionen von je 500 µl abgenommen. In Fraktion 2 befinden sich die mit „*lipid rafts*“ assoziierten Proteine. Je 1 µl der Fraktionen wurde auf eine Hybond ECL Nitrozellulosemembran getropft und mit der HRP-gekoppelten Cholera-Toxin Untereinheit B (CTB-HRP; Sigma) zum Nachweis der Raftfraktion über Nacht inkubiert. Der Rest der Fraktionen wurde mit 167 µl 4x Laemmli-Puffer bei 95°C für 5 min erhitzt. Die Lysate wurden anschließend für den Nachweis entsprechender Proteine auf einem 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. (Diese Experimente wurden in Kollaboration mit Cinthia Briseño aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.)

TXNE-Lysepuffer: 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA,
0,5 % Triton X-100, Complete-Mini Proteaseinhibitoren-cocktail-
EDTA frei

3.5.6. Luziferase-Reporter-Gen Versuche

Um eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB nachzuweisen, wurden DG75wt und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen mit Expressionsvektoren für LMP1 und LMP1-TNFR1 zusammen mit einem Luziferase-Reporter-Genkonstrukt (3κB-Luc) und einem β-Galaktosidase-Reporter-Genkonstrukt (PGK-β-Gal) transfiziert. In dem Plasmid 3κB-Luc steht das Luziferasegen (Glühwürmchenluziferase) unter Kontrolle eines minimalen *c-fos*-Promoters, der drei NF-κB Bindestellen enthält. Das β-Galaktosidasegen steht unter Kontrolle eines Phosphoglyceratkinase (PGK) Promoters, der nicht durch NF-κB Signale beeinflusst wird und somit als Transfektionskontrolle zur Standardisierung diente. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, einmal in kaltem PBS gewaschen und in 150 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Suspensionen wurden umgehend bei -80°C für 30 min tiefgefroren, auf Eis wieder aufgetaut und die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (13000 g, 10 min, 4°C). Der Nachweis der Luziferaseaktivität und der β-Galaktosidaseaktivität erfolgte in entsprechendem Testpuffer unter Verwendung eines Injektor-Luminometers (Microumat LB96P). Zur Messung der Luziferaseaktivität wurden 10 µl des Lysates in 150 µl Luziferase-Testpuffer verdünnt. Im Luminometer wurde durch automatische Injektion von 50 µl Luziferin nach 10 Sekunden Inkubationszeit die Lichtemission gemessen. Die Auswertung erfolgte durch das Programm EG&G Berthold Winglow. Zur Standardisierung wurde zusätzlich die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt. Dazu

wurden 5 µl Zelllysat in 75 µl Galacton-Plus™-Lösung als chemolumineszentes β-Galaktosidasesubstrat verdünnt und für 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Messung im Luminometer nach automatischer Zugabe von 50 µl Emerald™-Lösung. Die Emerald-Lösung dient als Chemolumineszenz-Verstärker, damit auch kleinste Mengen an β-Galaktosidaseaktivität gemessen werden können. Die Werte der Luziferaseaktivität wurden auf die Werte der β-Galaktosidaseaktivität bezogen. Diese normalisierten Werte konnten dann direkt in den unterschiedlichen Ansätzen verglichen werden.

<u>Extraktionspuffer:</u>	100 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7,8), 100 mM KH ₂ PO ₄ , 1 mM DTT, 1 % Triton X-100
<u>Luziferase-Testpuffer:</u>	25 mM Glyzylglyzin (pH 7,8), 15 mM MgSO ₄ , 5 mM ATP
<u>Luziferin:</u>	Stocklösung: 50 mg d-Luziferin (Roche) gelöst in 17,85 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), Endkonzentration: Stocklösung 1:10 mit H ₂ O verdünnt
<u>Galacton-Plus™-Lösung:</u>	50 µl 0,01M MgCl ₂ , 500 µl 1 M Na ₃ PO ₄ (pH 8,0), 50 µl Galacton-Plus™ (Tropix) auf 4,4 ml H ₂ O
<u>Emerald™-Puffer:</u>	1 ml 1 M NaOH, 500 µl Emerald™-Lösung (Tropix) auf 3,5 ml H ₂ O (vor Licht schützen!)

3.6. Spezielle Techniken für das Gentergeting in humanen B-Zellen („somatischer *knockout*“)

3.6.1. Transfektion der TRADD-Gentergeting Vektoren in humane B-Zellen

Die Vektoren pTRADDko.1 und pTRADDko.2 wurden vor der Transfektion in die B-Zellen (DG75, BJAB, BL2) mit dem Restriktionsenzym BstEII linearisiert. BstEII besitzt eine einzelne Schnittstelle im Rückgrat beider Vektoren, ohne dass essentielle Komponenten der Vektoren zerschnitten werden. Durch die Linearisierung des Vektors wird die Frequenz der homologen Rekombination erhöht. Die linearisierten Vektoren wurden mit Phenol-Chloroform gereinigt, mit Ethanol gefällt und in H₂O gelöst. Zur Transfektion der DNA in die Zellen wurde die Elektroporation mit einem GenePulserII™ der Firma Biorad bei 180 V und 975 µF durchgeführt. Es wurden je Transfektion 1×10^7 Zellen mit 20 µg linearisierter Vektor-DNA elektroporiert.

3.6.2. Selektion

Bei ortsspezifischer, homologer Rekombination der Gentergeting-Vektoren im *TRADD* Locus der transfizierten Zellen enthalten diese Zellen ein Gen für GFP und ein Gen für die Hygromycin B Phosphotransferase. Das HSV-Thymidinkinasegen, das im Rückgrat der Gentergeting-Vektoren sitzt, bleibt nur bei ortsunspezifischer Integration der gesamten Vektoren in das Genom der Zellen erhalten. Um Zellklone mit korrekt homolog rekombinierten *TRADD* Locus zu erhalten, wurde auf GFP exprimierende, Ganciclovir und Hygromycin B resistente Zellen selektioniert.

Nach Elektroporation wurden die Zellen für zwei Tage in einem geringen Volumen (ca. 10 ml) RPMI Vollmedium bei 5 % CO₂ Atmosphäre im 37°C Brutschrank inkubiert. Am dritten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in verschiedenen Zellzahlen in 96-Loch-Platten ausplattiert. Es wurden Platten mit $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , 2×10^4 bzw. 4×10^4 lebenden Zellen (limitierte Verdünnung) in 200 µl konditioniertem Medium pro 96-Loch ausgesät. Diesem speziellen, konditionierten Medium (50 % frisches RPMI Vollmedium + 50 % frischer, klarer Zellkulturüberstand einer exponentiell wachsenden B-Zellkultur der jeweiligen, zu selektionierenden B-Zelllinie; Rezept nach Michael Pawlita) wurden 400 µg/ml Hygromycin B und 10 µM Ganciclovir zugesetzt. Das konditionierte Medium verringert den oxidativen Stress, dem die Zellen in geringer Zellzahl unter Selektion ausgesetzt sind. Außerdem liefert es zelltypspezifische Wachstumsfaktoren und Zytokine, die von den Zellen selbst in das Medium abgegeben wurden. Da die Zellen während der Selektionsphase nicht mehr gefüttert wurden, mußten die ausgesäten 96-Loch-Platten in Frischhaltefolie eingewickelt werden, um so ein Verdunsten des Mediums zu verhindern. Nach ca. 3 bis 4 Wochen wurden die 96-Loch-Platten auf auswachsende Einzelzellklone unter dem Fluoreszenzmikroskop geprüft. Derart selektionierte Einzelzellklone wurden zuerst auf 48-Loch-Platten und schließlich auf 24-Loch-Platten expandiert, wenn eine Vertiefung der 96-Loch-Platte zu 60 bis 80 % bewachsen war. Bei einer Konfluenz von etwa 60 bis 80 % in der 24-Loch-Platte wurden ca. 2/3 der Zellen entnommen, und genomische DNA für die Southern-Blot Analyse präpariert (siehe Abschnitt 3.6.3.). Die restlichen Zellen wurden bis zum Ergebnis der Southern-Blot Analyse weiter in 24-Loch-Platten kultiviert.

3.6.3. Isolierung genomischer DNA aus selektionierten Einzelzellklonen

Zur Gewinnung genomischer DNA aus selektionierten Einzelzellklonen wurde zu Beginn ein ES-Lysepuffer verwendet. Da die Qualität der genomischen DNA, die durch Verwendung des ES-Lysepuffers gewonnen wurde, schlechter Qualität war, wurde nach etwa der Hälfte der *TRADD*-Gentargeting Prozedur im weiteren Verlauf zur Isolierung der genomischen DNA das Reagenz DNAzol™ (Invitrogen) verwendet. Bei DNAzol™ handelt es sich um eine neuartige Guanidinsalz-Lösung, mit der spezifisch genomische DNA aus Zellen oder Geweben präzipitiert werden kann. Die Anwendung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Durch die Verwendung von DNAzol™ konnte genomische DNA in wesentlich besserer Qualität als mit dem ES-Lysepuffer gewonnen werden. Dies spielte speziell bei EcoRI eine entscheidende Rolle, mit dem die genomische DNA anschließend für die Southern-Blot Analyse verdaut wurde.

ES-Lysepuffer: 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8,0),
0,5 % (w/v) Sacrosyl, RNase A (100 mg/ml, 1:1000 eingesetzt)

3.6.4. Southern-Blot Analyse

Genomische DNA wurde mit je 1 µl hochkonzentriertem EcoRI (50 Units/µl) Restriktionsenzym verdaut. Dies wurde in 100 µl Ansätzen unter Verwendung des EcoRI-spezifischen Restriktionsenzym-puffers der Firma MBI Fermentas durchgeführt. Die verdaute genomische DNA wurde auf einem 0,7 %igen Agarosegel in 1x TAE Puffer bei 60 V über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt. Am nächsten Tag wurde der DNA-Marker (Lambda DNA-BstEII digest, New England Biolabs) mit Tinte markiert, und die mit Ethidiumbromid sichtbare DNA im Gel mit einer Polaroidkamera fotografiert. Um Strangbrüche in die DNA einzuführen, wurde das Agarosegel für 30 min in 0,25 M HCl geschüttelt, danach kurz in H₂O gewaschen und für 1 h in Denatpuffer denaturiert. Anschließend wurde die aufgetrennte, denaturierte genomische DNA durch Kapillartransfer für ca. 2 h auf eine Hybond N+ Nylonmembran (Amersham Pharmacia) transferiert (Southern, 1975). Die Nylonmembran wurde daraufhin kurz in 2x SSC geschwenkt und für 1 h in Hybridisierungspuffer nach Church (Churchpuffer) (Church und Gilbert, 1984) bei 65°C in einer Hybridisierungsflasche prähybridisiert. Dem Hybridisierungspuffer wurde zuvor 100 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (5 min, 95°C, 0,94 mg/ml; Sigma) zugegeben. Die

Lachsspermien-DNA diente zur Absättigung unspezifischer DNA Bindestellen auf der Membran. Daraufhin wurde die spezifische, radioaktiv markierte Probe (siehe Abschnitt 3.6.5.) zugegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Membran einmal 15 min in Waschpuffer 1 und zweimal 15 min in Waschpuffer 2 gewaschen, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

<u>Denatpuffer:</u>	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
<u>Churchpuffer:</u>	1 % (w/v) BSA, 400 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)
<u>1x TAE Puffer:</u>	40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM NaAc, 1 mM EDTA (pH 8,0)
<u>2x SSC:</u>	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat
<u>Waschpuffer 1:</u>	2x SSC, 0,1 % SDS
<u>Waschpuffer 2:</u>	0,2x SSC, 0,1 % SDS

3.6.5. Radioaktive Markierung von DNA

Die zur Detektion spezifischer Restriktionsfragmente in der Southern-Blot Analyse aus Abschnitt 3.6.4. verwendete externe Probe 1 (SP1) und die interne Probe 2 (SP2) wurden zuvor aus pACYC184.1012.4 bzw. aus pEGFP-C1 mittels Restriktionsverdauung isoliert (siehe Abschnitt 2.2. und 3.3.3.). SP1 ist ein 835 bp langes Fragment des *TRADD* Lokus (Pos. +10198 bis +11033), welches mit NheI und EcoRI aus pACYC184.1012.4 geschnitten wurde. SP2 besteht aus einem Teil des *GFP* Gens und wurde mit NheI und BsrGI aus pEGFP-C1 geschnitten und isoliert. Für die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA Fragmente wurde die Methode nach *Feinberg* und *Vogelstein* (Feinberg und Vogelstein, 1983) verwendet. Dabei werden Hexanukleotide zufälliger Sequenz an hitzedenaturierte, einzelsträngige DNA gebunden, die als Primer für die Elongation mit Hilfe der Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments dienen. Die Markierung von ca. 50 ng DNA wurde mit Hilfe des „*High Prime DNA Labeling Kit*“ der Firma Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden über eine Sephadex-G-50 Säule (*Nick Column*, Amersham Pharmacia) abgetrennt. Nach kurzer Hitzedenaturierung (5 min. bei 95°C, 5 min. auf Eis) wurde die radioaktive Probe direkt in die Hybridisierungslösung gegeben.

3.6.6. Cre-Rekombinase Reaktion in DG75 Zellen

Nach der erfolgreichen homologen Rekombination der *TRADD*-Gentargeting Vektoren im ersten bzw. zweiten *TRADD* Allel, müssen die mit loxP Sequenzen flankierten Selektionsmarker, die Hygromycin B Phosphotransferase und GFP, aus dem Genom der Zellen entfernt werden. Dies wurde durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase und darauf folgende Einzelzellklonierung erreicht. Um Cre transient zu exprimieren, wurden 10 µg des Cre-Expressionsplasmids p1891 in je 1×10^7 Zellen des entsprechenden Klons mittels Elektroporation transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden 1, 10, 100 und 1000 Zellen pro 96 Loch in 200 µl RPMI Vollmedium mit PTB (Brielmeier *et al.*, 1998) ohne Selektionsreagenzien ausgesät. Für jede Verdünnung wurden drei Platten ausgesät. Nach 3 bis 4 Wochen wurden die 96-Loch-Platten auf auswachsende, nicht grün fluoreszierende Einzelzellklone geprüft. Auswachsende Klone wurden daraufhin auf 24-Loch-Platten expandiert und mit Zellen dieser Klone Southern-Blot Analysen mit der Probe SP1 durchgeführt.

PTB:

Endkonzentration im Medium: 1 mM Natriumpyruvat, 50 µM α-Thioglycerol, 20 nM BCS (*Bathocuproindisulfonic disodium salt*) (Brielmeier *et al.*, 1998)

4. Ergebnisse

4.1. Vorbereitende Arbeiten zur Auswahl einer geeigneten Zelllinie für das somatische Gentergeting des humanen *TRADD* Gens

Das Ziel dieser Doktorarbeit bestand in der Herstellung einer *TRADD*-defizienten (*TRADD*^{-/-}) humanen B-Zelllinie mit Hilfe von homologer Rekombination, um die Rolle von *TRADD* in der Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 und des viralen LMP1 zu untersuchen. Eine humane B-Zelle ist ein geeignetes und relevantes Modellsystem zur Untersuchung der Signaltransduktion von TNF-R1 und LMP1, da in den meisten B-Zelllinien der TNF-R1 exprimiert wird und die humane B-Zelle das natürliche Kompartiment der LMP1 Expression darstellt (Lam und Sugden, 2003; Wajant *et al.*, 2003). Zunächst musste eine geeignete Zelllinie gefunden werden, die bestimmte Kriterien erfüllen musste.

Ein wichtiges Kriterium, das die Kandidatenzelllinie erfüllen sollte, ist ein diploider *TRADD* Genotyp. Bei der Herstellung einer „*knockout*“ Maus, muss nur das erste Allel mittels homologer Rekombination in ES-Zellen der Maus targetiert werden (Capecchi, 1989b). Das Zweite Allel wird durch Kreuzung der heterozygoten Mäuse entfernt. Im Gegensatz dazu, muss bei einem „*knockout*“ in einer somatischen Zelllinie jedes Allel einzeln durch homologe Rekombination eines Gentergeting-Vektors im Locus des zu deletierenden Gens entfernt werden muss (Sedivy und Dutriaux, 1999). Viele etablierte Zelllinien besitzen einen partiell polyploiden Genotyp. Mehr als zwei Allele eines Gens aus einer Zelle zu entfernen, wäre sehr zeitaufwendig. Um eine B-Zelllinie mit diploiden Genotyp des *TRADD* Gens zu finden, wurden FISH-Analysen (*fluorescence in situ hybridization*) in einigen Kandidatenzelllinien mit einer *TRADD*-spezifischen Sonde durchgeführt (siehe Abschnitt 4.1.1.).

Zweitens sollte die verwendete B-Zelllinie EBV negativ sein, um eine endogene LMP1 Expression in den Zellen auszuschließen. Dies könnte sonst bei späteren Untersuchungen der LMP1 Signalwege durch transiente Expression von LMP1 bzw. LMP1 Mutanten einen störenden Einfluss auf die Experimente haben. Aus diesem Grund wurden alle EBV positiven B-Zelllinien für dieses Vorhaben ausgeschlossen.

Drittens sollten die B-Zellen nach Möglichkeit vor allem den TNF-R1 und nicht TNF-R2 exprimieren, um bei der Stimulierung der Zellen mit TNF α auftretende Mischsignale, verursacht durch TNF-R1 und TNF-R2 prinzipiell auszuschließen (siehe Abschnitt 1.3.3.). Aus diesem Grund wurde der TNF-R1 und TNF-R2 Status in den Kandidatenzelllinien mittels RT-PCR Analysen untersucht (siehe Abschnitt 4.1.2.).

4.1.1. FISH-Analyse zur Bestimmung des TRADD Genotyps in Kandidatenzelllinien

Die meisten im Labor verwendeten Zelllinien wurden aus transformierten bzw. immortalisierten Zellen generiert und haben oft einen polyploiden Genotyp (siehe <http://www.dsmz.de/>). Zudem sind sie genetisch oft instabil.

Um eine für das *TRADD* Gen diploide B-Zelllinie zu finden, wurden einige gängige EBV-negative B-Zelllinien mittels FISH-Analyse auf ihren *TRADD* Genotyp untersucht. Für die *in situ* Hybridisierung wurde als Sonde das gesamte Plasmid RPCIP704M111012 (siehe Abschnitt 2.2.) eingesetzt. In diesem Plasmid ist ein ca. 140 kb langes, genomisches Fragment mit dem gesamten humanen *TRADD* Locus enthalten. Die FISH-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Schoch, Labor für Leukämiediagnostik, III. Med. Klinik des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München, durchgeführt. Untersucht wurden die B-Zelllinien BJAB, DG75 und Akata. Als Kontrollen dienten zusätzlich die humane T-Zelllinie Jurkat und die humanen Epithelzelllinien HEK293 und HeLa. In Abb. 4.1 sind exemplarisch einzelne Zellen der untersuchten Zelllinien in der Interphase als mikroskopische Aufnahmen der FISH-Analyse dargestellt.

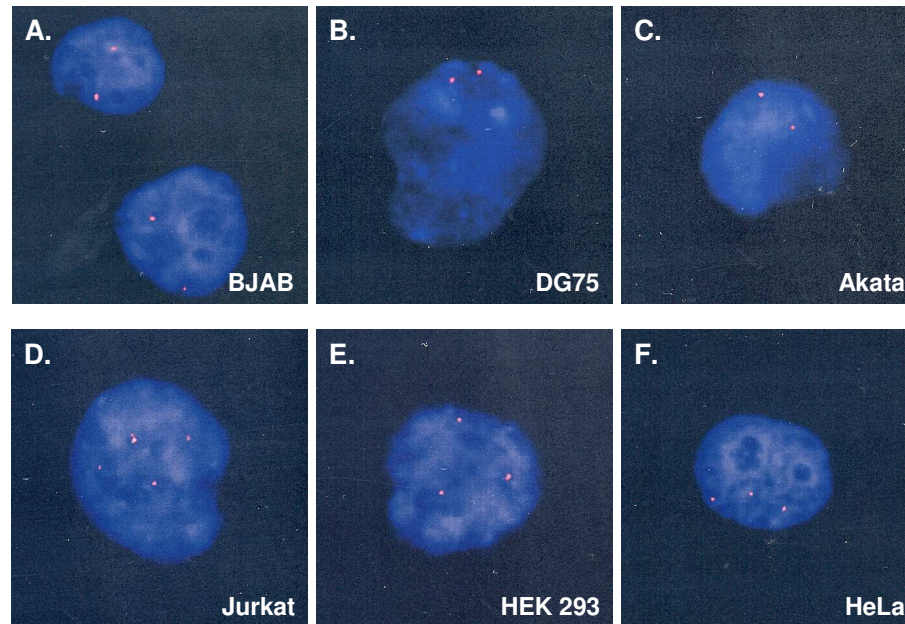


Abb. 4.1: *TRADD* Karyotyp verschiedener Zelllinien in der FISH-Analyse. (A) BJAB Zellen wurden in der Interphase mit einer *TRADD*-spezifischen Sonde hybridisiert und zeigten zwei Fluoreszenzsignale für *TRADD*. (B) DG75 zeigen zwei Fluoreszenzsignale für *TRADD*. (C) Die abgebildete Akata Zelle zeigt zwei Fluoreszenzsignale für *TRADD*. Es sind allerdings nicht alle Akata Zellen diploid für *TRADD* (siehe Tab. 4.1). (D) In Jurkat Zellen sind zwei oder vier Fluoreszenzsignale für *TRADD* ersichtlich. (E) HEK293 zeigen zwei, drei oder vier Fluoreszenzsignale für *TRADD*. (F) HeLa Zellen zeigen zwei, drei oder vier Fluoreszenzsignale für *TRADD*.

In den analysierten Zelllinien wurde eine repräsentative Anzahl von Zellen auf die Anzahl von *TRADD*-spezifischen Fluoreszenzsignalen in der FISH-Analyse ausgezählt. Eine Zusammenfassung der quantitativen Analyse ist in Tab. 4.1 aufgeführt.

Nach Auswertung der getesteten Zelllinien in der FISH-Analyse wurden zwei B-Zelllinien (BJAB und DG75) mit einem diploiden *TRADD* Genotyp identifiziert (siehe Abb. 4.1 und Tab. 4.1). Diese Zelllinien würden sich aus genetischer Sicht für ein *TRADD*-Gentargeting eignen. Hierzu kam noch eine dritte, in der FISH-Analyse nicht mehr getestete Kandidatenzelllinie, die EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie BL2. Diese wurde nach den hier beschriebenen vorbereitenden Arbeiten als geeignet für ein somatisches Gentargeting publiziert (Faili *et al.*, 2002). Alle anderen getesteten Zelllinien (Akata, Jurkat, HEK293, HeLa) besitzen einen polyploiden *TRADD* Genotyp und kamen deshalb für dieses Vorhaben zunächst nicht in Frage.

Zelllinie	Interphasesignale für den <i>TRADD</i> Genlokus			
	1	2	3	4
BJAB	0	50	0	0
DG75	(4)	68	0	0
Akata	0	23	2	5
Jurkat	0	45	0	35
HEK 293	0	14	89	3
HeLa	0	14	88	6

Tab. 4.1: Quantitative Auswertung der FISH-Analysen für *TRADD* in den getesteten Zelllinien. Bei der FISH-Analyse der genannten Zelllinien wurden die entsprechenden Zellen bezüglich ihrer Anzahl an *TRADD*-spezifischen Interphasesignalen pro Zelle ausgewertet. Es wurden in den getesteten Zelllinien entweder 1, 2, 3 oder 4 Fluoreszenzsignale für den *TRADD* Lokus detektiert. Jedes Fluoreszenzsignal entspricht einem *TRADD* Allel. Bei den in DG75 detektierten einzelnen Fluoreszenzsignal pro Zelle könnte das zweite *TRADD* Allel möglicherweise nicht sichtbar gewesen sein.

4.1.2. Untersuchung der Expression von TNF-Rezeptor 1 und 2 in den Kandidatenzelllinien

Da nach Herstellung der *TRADD*-defizienten B-Zelllinie die Signaltransduktion des TNF-R1 untersucht werden sollte, musste der Rezeptorstatus für die beiden TNF-Rezeptoren in den Kandidatenzelllinien bekannt sein. Es sollte möglichst eine Zelllinie gefunden werden, die hauptsächlich den TNF-R1 exprimiert. Dies sollte gewährleisten, dass bei der Stimulierung des TNF-R1 mit TNF α keine durch den TNF-R2 verursachten Mischsignale auftreten (siehe Abschnitt 1.3.3.).

Zur Untersuchung der TNF-R1 und TNF-R2 Expression wurde als Methode die RT-PCR-Reaktion gewählt (siehe Abschnitt 2.3. und 3.4.2.).

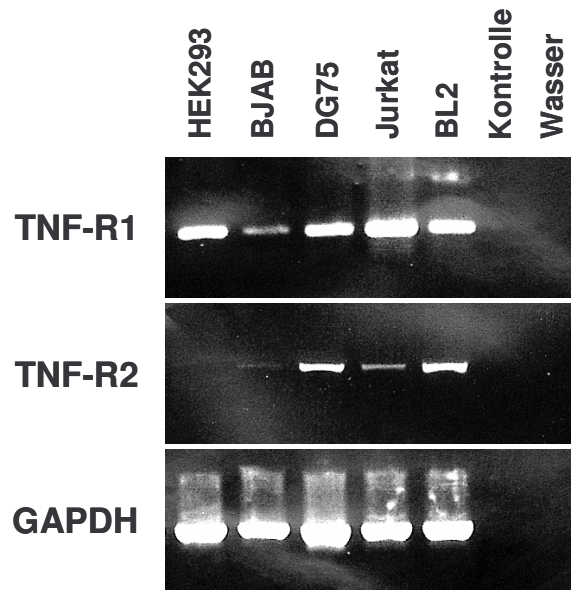


Abb. 4.2: RT-PCR Analysen der TNF-R1 und TNF-R2 Expression in den Kandidatenzelllinien. Die Expression des TNF-R1 und TNF-R2 wurde auf mRNA Ebene untersucht. Die Zelllinien HEK293 und Jurkat wurden ebenfalls als Kontrollzelllinien mit untersucht. Aus der gesamtzellulären RNA der genannten Zelllinien wurde mit der Superscript IIITM Reversen Transkriptase (RT) komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Daraufhin wurden aus der komplementären DNA genspezifische Abschnitte mittels PCR amplifiziert und in einem 1,5 % Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. GAPDH diente als Kontrolle für die RT-Reaktion. Zur spezifischen Analyse der TNF-R1 Expression wurden die Primer FS46/47 und für die TNF-R2 Expression die Primer FS48/49 verwendet (siehe Abschnitt 2.3.). Als weitere Kontrollen wurden in Spur 6 die RT-Reaktion ohne RT durchgeführt und in Spur 7 eine Wasserkontrolle für die PCR Reaktion verwendet.

Die RT-PCR Analyse ergab, dass alle drei Kandidatenzelllinien (BJAB, DG75 und BL2) den TNF-R1 exprimieren. Der TNF-R2 wird in BJAB Zellen nur sehr schwach exprimiert, während in DG75 und BL2 Zellen eine relativ hohe Expression des TNF-R2 erkennbar ist. Dieses Ergebnis bestätigt, dass in lymphoiden Zellen meist beide TNF-Rezeptoren exprimiert werden (Wajant *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Befunde war BJAB die bevorzugte B-Zelllinie für das somatische *TRADD*-Gentargeting. Aber auch DG75 und BL2 wurden weiterhin für dieses Vorhaben in Betracht gezogen.

4.2. Entwicklung einer neuen Methode zur Analyse von Zelltod nach transienter Transfektion Apoptose induzierender Gene in B- und T-Zellen

4.2.1. Prinzip der Methode

Ein wichtiger Bestandteil dieser Doktorarbeit war die Aufklärung von apoptotischen Signalwegen des TNF-R1 in *TRADD*^{-/-} B-Zellen. Da es hierzu experimentell notwendig war, das apoptotische Potenzial von transient exprimierten Proteinen in den hergestellten *TRADD*^{-/-} B-Zellen zu untersuchen, wurde die im folgenden beschriebene Methode etabliert.

Zur Untersuchung der Funktion potenziell apoptotischer Proteine in B-Zellen ist die transiente Expression dieser Proteine die Methode der Wahl, da die stabile Überexpression dieser Proteine in den meisten Fällen nicht möglich ist. Für die Transfektion der zu untersuchenden Gene in B-Zellen ist die Elektroporation die einzig effektive und gleichzeitig kostengünstige Methode. Die Elektroporation selbst verursacht jedoch eine sehr hohe Zelltodrate (in BJAB Zellen bis zu 90 % bei 240 V und 975 μ F; siehe Abb. 4.3). Dagegen ist die Transfektionseffizienz meist sehr gering. Bei BJAB Zellen liegt sie bei ca. 5 %, bezogen auf die ursprünglich ins Experiment eingebrachte Anzahl an Zellen. Eine Konsequenz hieraus ist, dass in einer elektroporierten Zellpopulation die durch das transfizierte Gen verursachte Apoptose, durch den Zelltod überlagert wird, der durch die Elektroporation verursacht wurde. Beides kann experimentell nicht durch die Anwendung standardmäßiger Methoden zur Quantifizierung von Apoptose, wie z.B. der Annexin V Färbung (Koopman *et al.*, 1994; Vermes *et al.*, 1995) oder dem TUNEL-Test (Gavrieli *et al.*, 1992; Gorczyca *et al.*, 1993), unterschieden werden.

Die Koexpression von GFP (*green fluorescent protein*) mit dem zu untersuchenden Gen würde eine Identifizierung der transfizierten Zellen möglich machen. Es wurden schon durchflusszytometrische Methoden zur Quantifizierung von Apoptose in Lymphozyten beschrieben, bei denen die Koexpression von GFP verwendet wurde, um die Analyse im Durchflusszytometer auf erfolgreich transfizierte Zellen zu beschränken. In praktisch

allen beschriebenen Fällen wurde jedoch erst nach bereits erfolgter GFP Expression Apoptose durch externe Stimuli induziert. Wie z.B. durch Stimulierung des zellulären Fas-Rezeptors mit agonistischen Antikörpern oder dem Fas-Liganden, (Holler *et al.*, 2000; Strebel *et al.*, 2001; Vezina *et al.*, 2001). Nach Stimulation wurden die GFP positiven Zellen durch Standard-Apoptosemethoden untersucht.

Im Gegensatz dazu wird in transienten Transfektionen die gleichzeitig einsetzende Expression des transfizierten apoptoseinduzierenden Gens einen Großteil der erfolgreich transfizierten Zellen töten, bevor diese den kotransfizierten Fluoreszenzmarker (GFP) exprimieren können. Deshalb sind nach Färbung der Transfektionsansätze mit Propidiumiodid (PI) kaum GFP positive und PI positive (GFP+/PI+) Zellen detektierbar (siehe Abb. 4.5). Die Konsequenz hieraus ist, dass Zellen, in denen Zelltod durch das zu untersuchende Gen induziert wurde, nicht durch die Analyse von GFP positiven Zellen auf Merkmale der Apoptose untersucht werden können.

Um dennoch die durch ein transient transfiziertes Gen induzierte Apoptose durchflusszytometrisch bestimmen zu können, wurde hier ein neuer Ansatz gewählt. Die durch das transient transfizierte Gen induzierte Zelltodrate wurde bestimmt als die Abnahme lebender grüner Zellen (GFP+/PI-) im Testansatz gegenüber einem parallel mit Leervektor und GFP transfizierten Referenzansatz. Hierzu wurde in jedem Ansatz eine identische Anzahl von Zellen mit Expressionsvektoren für GFP und dem zu untersuchenden apoptotischen Gen (Testansatz) bzw. mit GFP und Leervektor (Referenzansatz) elektroporiert (siehe Abschnitt 3.23.). Sofort nach der Transfektion wurden alle Ansätze vollständig in ein gleiches Volumen RPMI Vollmedium transferiert. Dadurch waren alle Ansätze direkt miteinander vergleichbar, und ein bestimmtes Volumen der Kultur entsprach einer bestimmten Anzahl der ursprünglich in das Experiment eingebrachten Zellen. Die einzelnen Ansätze wurden 24 h nach der Transfektion mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und durchflusszytometrisch auf GFP und PI analysiert (siehe Abschnitt 3.2.5. und Tab. 4.2). Abhängig vom apoptotischen Potenzial des transfizierten Gens hatte dieses Protein bereits einen Teil der transfizierten Zellen getötet, bevor GFP exprimiert werden konnte. Einige dieser Zellen waren zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Analyse bereits vollständig desintegriert und nicht mehr als Zellen detektierbar. Durch den Vergleich der Anzahl GFP+/PI- Zellen in

einem normalisierten Volumen des Testansatzes mit der Anzahl GFP+/PI- Zellen im gleichen Volumen des Referenzansatzes war dadurch die Anzahl dieser bereits desintegrierten Zellen indirekt bestimmbar. Unter der Annahme, dass die Transfektionseffizienz und die durch die Elektroporation verursachte Zelltodrate in allen Ansätze gleich ist, stellt die Abnahme an GFP+/PI- Zellen pro normalisiertem Ansatzvolumen im Testansatz gegenüber dem Referenzansatz eine direktes Maß für die durch das transfizierte Gen verursachte Zelltodrate dar. Der hohe Hintergrund an toten Zellen, verursacht durch die Elektroporation, wird dabei ausgeblendet.

Status	Kriterien
GFP-/PI-	Lebende und nicht transfizierte Zellen
GFP+/PI-	Lebende und transfizierte Zellen
GFP+/PI+	Transfizierte und noch als Zellen detektierbare, tote Zellen
GFP-/PI+	Nichttransfizierte und noch als Zellen detektierbare, tote Zellen
zerstört	Nur indirekt detektierbare, zerstörte Zellen

Tab. 4.2: Kriterien nach GFP und PI Status für die FACS-Analyse.

Die einzelnen Schritte zur Etablierung der Methode und deren Funktionsbeweis werden im Folgenden beschrieben.

4.2.2. Optimierung der Elektroporationsbedingungen

Zunächst mussten die Elektroporationsbedingungen bezüglich der Parameter Spannung (V) und Kapazität (μF) am Elektroporator für BJAB Zellen optimiert werden. Es sollten Parameter gefunden werden, die ein möglichst gutes Verhältnis zwischen erfolgreich transfizierten und durch die Elektroporation getöteten Zellen ergeben. Zur Entwicklung dieser Methode wurden BJAB Zellen verwendet, da BJAB Zellen schon des Öfteren für Apoptosestudien verwendet wurden und hier für das *TRADD*-Gentargeting eingesetzt werden sollten (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Graves *et al.*, 1998). Dafür wurden, wie in Abschnitt 3.2.3. beschrieben, 3×10^6 BJAB Zellen mit jeweils $1 \mu\text{g}$ pEGFP-C1 bei

verschiedenen Spannungen und 975 μF in einem Gene Pulser II (Biorad) elektroporiert. Die Gesamtmenge an DNA wurde auf 15 μg mit Lachsspermien-DNA angeglichen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen nach den in Tab. 4.2 aufgeführten Parametern analysiert (verwendete FACS Profile siehe Abb. 4.5). Wie in Abb. 4.3 zu erkennen ist, verursacht die Elektroporation selbst eine sehr hohe Zelltodrate (angegeben als „zerstört“ und PI+), die mit steigender Spannung stark zunimmt.

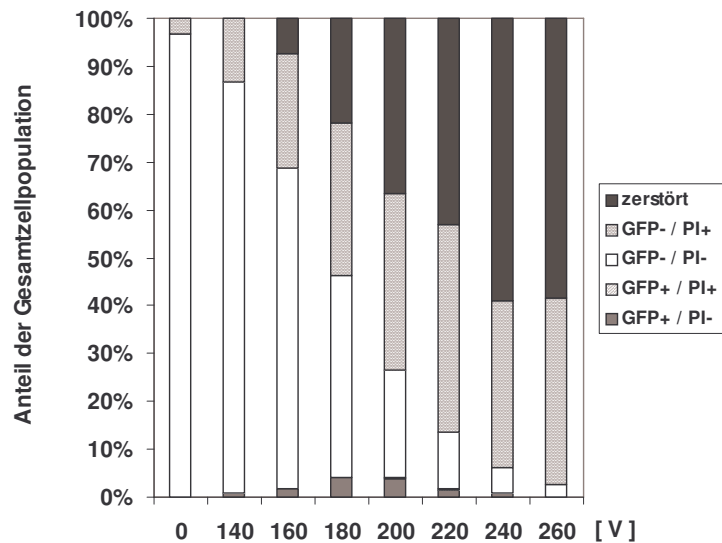


Abb. 4.3: Optimierung der Elektroporationsbedingungen für BJAB Zellen. 3×10^6 BJAB Zellen wurden mit je 1 μg pEGFP-C1 und 14 μg inerter Lachsspermien-DNA bei 975 μF und den angegebenen Voltzahlen elektroporiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI gefärbt und eine FACS-Analyse wie in Abschnitt 3.2.5. beschrieben durchgeführt. Bei dieser Art der Analyse ist es auch möglich, die Anzahl der zerstörten, im FACS nicht mehr detektierbaren Zellen zu quantifizieren (angeben als „zerstört“). Es wurden durchweg weniger als 0,17 % GFP+/PI+ Zellen detektiert, weshalb diese Zellen in der Grafik nicht sichtbar sind. Die Prozentangaben der einzelnen Subpopulationen wurde auf die ursprünglich ins Experiment eingesetzte Zellzahl bezogen.

Das beste Verhältnis zwischen der Anzahl an transfizierten, lebenden Zellen (GFP+/PI-) und toten Zellen wurde für die Elektroporationsbedingungen bei 180 V und 975 μF ermittelt. Im Laufe dieser Arbeit wurden alle weiteren Elektroporationen von BJAB Zellen mit diesen Einstellungen durchgeführt.

4.2.3. Analyse der zeitabhängigen Expression von GFP nach Elektroporation

Der nächste Parameter, der getestet wurde, war der optimale Zeitpunkt für die Durchführung der FACS-Analyse nach Elektroporation. Zum Zeitpunkt der Zelltodanalyse sollte die GFP Expression in allen Zellen ihr Maximum erreicht haben, um alle apoptotischen Ereignisse zu analysieren. Eine zeitabhängige Analyse der GFP Expression nach Elektroporation in BJAB Zellen ist in Abb. 4.4 gezeigt. Der prozentuale Anteil an GFP-exprimierenden, lebenden Zellen (GFP+/PI-) nimmt bis zu 24 h nach Transfektion zu und erreicht ab dort ein Plateau.

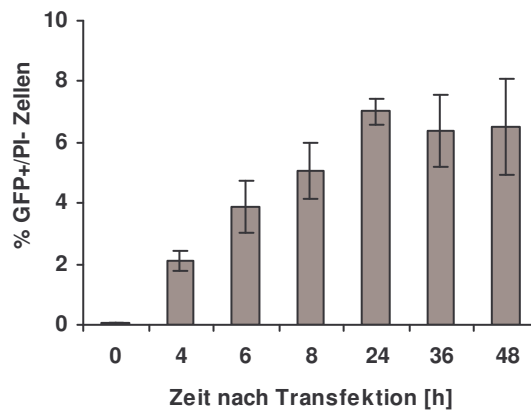


Abb. 4.4: Zeitabhängige Expression von GFP in BJAB Zellen nach Elektroporation. BJAB Zellen wurden mit 3 μg pEGFP-C1 und 12 μg inerte Lachsspermien-DNA elektroporiert. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Zellen mit PI gefärbt und die Anzahl der GFP+/PI- Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die GFP+/PI- Zellen sind in Prozent bezogen auf die Anzahl der lebenden Zellen angegeben.

Da 24 h nach Transfektion die volle GFP Expression in den Zellen erfolgt war, wurden alle weiteren Zelltodanalysen 24 h nach Elektroporation durchgeführt.

4.2.4. Analyse von Zelltod nach transienter Expression von TRADD

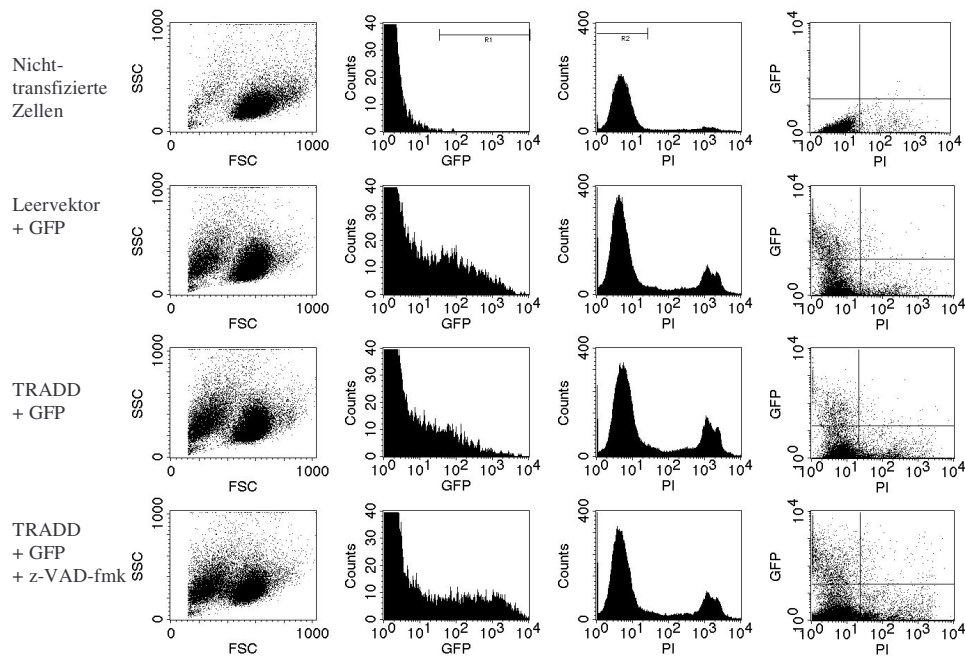
Da bekannt ist, dass die Überexpression von TRADD stark Apoptose induziert (Hsu *et al.*, 1995), wurden zur Demonstration der Funktionalität der neu entwickelten Methode BJAB Zellen transient mit dem Expressionsvektor pRK5-myc-hTRADD transfiziert.

Die Abbildung 4.5A zeigt die Datenerhebung während der FACS-Analyse exemplarisch für ein Experiment. Die Einstellungen am FACS und die Einteilung der Regionen 1 (R1) und 2 (R2) (siehe GFP und PI Histogramme) müssen innerhalb eines Experimentes beibehalten werden. Der massiv negative Einfluss der Elektroporationsprozedur auf die Zellviabilität wird in der FSC vs. SSC Grafik und dem PI Histogramm im Vergleich zwischen den transfizierten Ansätzen und den nichttransfizierten BJAB Zellen sichtbar (siehe Abb. 4.5A). Es wurde in einer Subpopulation eine deutliche, elektroporationsbedingte Verschiebung auf der FSC-Achse und eine deutliche Zunahme von PI+ Zellen im Histogramm beobachtet, was in beiden Fällen den durch die Elektroporation verursachten Zelltod widerspiegelt.

Vergleicht man nun den mit TRADD transfizierten Ansatz mit der Leervektorkontrolle in der FSC vs. SSC Grafik bzw. im PI Histogramm, kann man keine deutliche Abnahme von GFP+/PI- Zellen in dem mit TRADD transfizierten Ansatz erkennen. Bei Betrachtung des GFP Histogramms ist eine deutliche Abnahme der Anzahl an GFP-positiven Zellen zu erkennen. Dies zeigt, dass die transfizierten Zellen durch die Expression von TRADD getötet wurden, bevor sie ausreichend GFP exprimieren konnten, oder dass apoptotische Zellen, die GFP exprimierten, am Zeitpunkt der Messung schon zerstört waren und so nicht mehr als Zellen detektierbar waren. Die Zugabe des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk ins Kulturmedium der Zellen verhindert das Absterben der mit TRADD transfizierten Zellen (siehe Abb. 4.5A und 4.7A). Dies zeigt, dass es sich bei dem beobachteten Zelltod nach Überexpression von TRADD um eine Caspase-abhängige Apoptose handelt.

Die vierte Spalte der Abb. 4.5A zeigt eine Grafik, bei der die GFP+ gegen die PI+ Zellen dargestellt werden. Die vier Quadranten innerhalb der Grafik wurden durch die Regionen R1 und R2 aus den GFP bzw. PI Histogrammen festgelegt, mit denen GFP+ (R1) und PI- (R2) Zellen definiert wurden. Der prozentuale Anteil an Zellen in den einzelnen Quadranten in Bezug auf die ursprünglich in das Experiment eingesetzten Zellen wird in Abb. 4.5B angegeben. Wie zu erwarten war, wurden sehr wenige GFP+/PI+ Zellen detektiert (< 0,14 %). Die Anzahl an GFP+/PI- Zellen (oberer, linker Quadrant) spiegelt direkt die erfolgreich transfizierten, überlebenden Zellen wieder.

A.



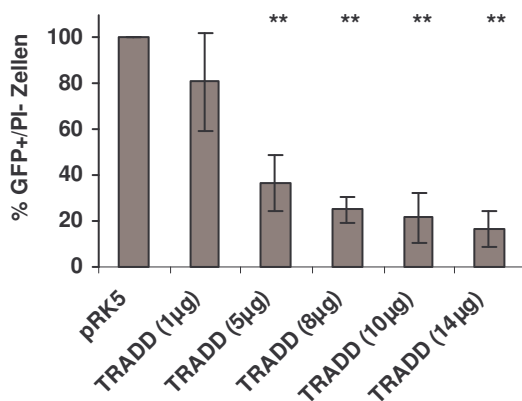
B.

Ansatz	GFP+/PI-	GFP+/PI+	GFP-/PI-	GFP-/PI+	Zerstört
Nicht-transfizierter Ansatz	0,00 %	0,05 %	93,10 %	6,85 %	0,00 %
Leervektor + GFP	2,26 %	0,12 %	34,35 %	12,20 %	51,70 %
TRADD + GFP	1,33 %	0,12 %	35,08 %	17,03 %	46,44 %
TRADD + GFP + z-VAD-fmk	2,19 %	0,13 %	35,07 %	16,51 %	46,10 %

Abb. 4.5: FACS-Profil und Einteilung der Regionen R1 und R2 für die Analyse von TRADD induziertem Zelltod. (A) Wie aufgeführt wurden 3×10^6 BJAB Zellen mit $1 \mu\text{g}$ pEGFP-C1, $9 \mu\text{g}$ inerter Lachsspermien-DNA und $5 \mu\text{g}$ pRK5-myc-TRADD bzw. $5 \mu\text{g}$ pRK5 Leervektor elektroporiert. Um die Aktivität von Caspasen zu inhibieren, wurden die Zellen in einem Ansatz direkt nach Elektroporation in Gegenwart von $2 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk kultiviert (unterste Reihe). 24 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ PI gefärbt und die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Datenerhebung in der FACS-Analyse dauerte bei jedem Ansatz 1 min, was einem Probenvolumen von $44 \mu\text{l}$ entsprach. Die erste Spalte zeigt FACS-Profil, bei denen die Zellen auf FSC vs. SSC analysiert wurden. Die zweite und dritte Spalte zeigen Histogramme für die Expression von GFP und für die Färbung der Zellen mit PI. Die Spalte vier zeigt FACS-Profil, bei denen GFP vs. PI aufgetragen wurde. Die vier Quadranten innerhalb der FACS-Grafik wurden über R1 und R2 definiert. Die eingestellten Parameter wurden bei allen Experimenten beibehalten. (B) Angegeben sind die prozentualen Anteile der Zellzahlen in den vier Quadranten aus der GFP vs. PI Grafik (siehe Abb. 4.5A) bezogen auf die ursprünglich in das Experiment eingebrachten Zellen. Der prozentuale Anteil an GFP+/PI- Zellen im Probenvolumen entspricht der Überlebensrate der erfolgreich transfizierten Zellen.

Um den Einfluss der transfizierten TRADD Menge auf das Überleben erfolgreich transfizierter Zellen zu untersuchen, wurden die angegebenen Mengen an pRK5-myc-hTRADD (1 bis 14 μg) Expressionsvektoren zusammen mit 1 μg pEGFP-C1 in BJAB Zellen transfiziert (siehe Abb. 4.6). Als Referenzansatz wurde der Leervektor pRK5 eingesetzt. Die Anzahl an GFP+/PI- Zellen im pRK5 Ansatz wurde als 100 % Überlebensrate definiert. Für alle weiteren Ansätze im Experiment wurde die Überlebensrate relativ zum pRK5 Ansatz ausgedrückt. Als Zelltodrate kann die Differenz der Überlebensraten zwischen dem Referenzansatz und dem jeweiligen Testansatz berechnet werden.

A.



B.

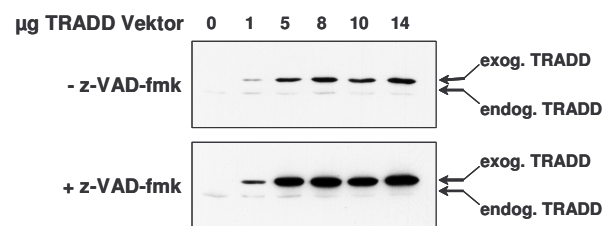


Abb. 4.6: Induktion von Zelltod mit steigenden Mengen transfiziertem TRADD Expressionsvektor in BJAB Zellen. (A) 3×10^6 BJAB Zellen wurden mit den angegebenen Mengen pRK5-myc-hTRADD und 1 μg pEGFP-C1 elektroporiert. Die Menge an transfizierter DNA wurde mit pRK5 Leervektor auf 15 μg angeglichen. Der pRK5 Referenzansatz wurde mit 14 μg pRK5 und 1 μg pEGFP-C1 transfiziert. 24 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI gefärbt und die durchflusszytometrische Analyse wie in Abschnitt 3.2.5. beschrieben durchgeführt. Die Datenerhebung erfolgte für 1 min bei mittlerer Durchflussgeschwindigkeit, was einem gemessenen Probenvolumen von 44 μl entsprach. Die Anzahl an GFP+/PI- Zellen im pRK5 Referenzansatz wurde als 100 % Überlebensrate transfizierter Zellen definiert. Die Überlebensraten aller weiteren Ansätze beziehen sich auf den pRK5 Referenzansatz (Student's T-Test, ** $p < 0,08$). (B) TRADD Proteinexpression. 3×10^6 BJAB Zellen wurden wie in (4.6A) beschrieben transfiziert und in Medium ohne (obere Tafel) bzw. mit 2 μM z-VAD-fmk (untere Tafel) kultiviert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion in TBST-Lysepuffer lysiert, und eine Immunoblot-Analyse mit einem TRADD-spezifischen Antikörper (Transduction Laboratories) durchgeführt. Banden für exogenes (exog.) und endogenes (endog.) TRADD werden angezeigt.

Es ist eine deutliche Korrelation zwischen der Menge an transfizierten TRADD Expressionsvektoren und der Zelltodrate transfizierter Zellen zu erkennen. 1 µg pRK5-myc-hTRADD verursachte eine Zelltodrate von ca. 19 %. Mit steigender Menge transfiziertem TRADD nimmt die Zelltodrate bis auf 83 % bei 14 µg pRK5-myc-hTRADD zu. In Abb. 4.6B erkennt man, dass ab 5 bis 8 µg transfiziertem pRK5-myc-hTRADD ein Plateau der TRADD Proteinexpression erreicht war, das sich in der Zelltodrate widerspiegelte (siehe Abb. 4.6A). Durch Zugabe des Pan-Caspaseninhibitors z-VAD-fmk ins Kulturmedium der transfizierten Zellen konnte eine deutlich höhere TRADD Proteinexpression erreicht werden (siehe Abb. 4.6B). Dies zeigt deutlich, dass die Überexpression von TRADD in BJAB Zellen zur Apoptose der Zellen führt.

Anhand des in Abb. 4.6 gezeigten Experimentes wird die Funktionalität der Methode demonstriert. Die Anwendung dieser Methode liefert sofort quantitative Daten.

4.2.5. TRADD-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspasen

Zuletzt musste bewiesen werden, dass es sich bei dem durch TRADD Überexpression verursachten Zelltod tatsächlich um Apoptose und nicht z.B. um Nekrose oder eine andere Art von Zelltod handelt. Diese verschiedenen Arten von Zelltod können durch die neue Methode zunächst nicht unterschieden werden. Es ist bekannt, dass TNF-R1 Apoptose über einen TRADD, FADD und Caspase-abhängigen Signalweg induziert (siehe Abschnitt 1.3.3.). Wenn TRADD nach transients Transfektion apoptotischen Zelltod verursacht, dann sollte diese Apoptose durch den Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk zu blocken sein (Slee *et al.*, 1996). Um unspezifische Effekte der TRADD Expression auszuschließen, wurde zusätzlich eine TRADD Mutante (TRADD_{296-299A}) transfiziert, bei der die As 296 bis 299 zu Alanin mutiert wurden. Diese TRADD Mutante ist nicht in der Lage, den NF-κB Signalweg oder Apoptose zu induzieren (Park und Baichwal, 1996). Zur Aktivierung TNF-R1-spezifischer Signalwege wurde das chimäre LMP1-TNFR1 Fusionsprotein (genaue Beschreibung siehe Abschnitte 2.2. und 4.4.1.) transfiziert, das konstitutiv TNF-R1 Signale erzeugt (Dudziak *et al.*, 2003). Es wurden jeweils 5 µg der genannten Konstrukte zusammen mit 1 µg pEGFP-C1 in BJAB Zellen elektroporiert und die Zelltodanalyse nach 24 h wie oben beschrieben durchgeführt (Abb. 4.7A).

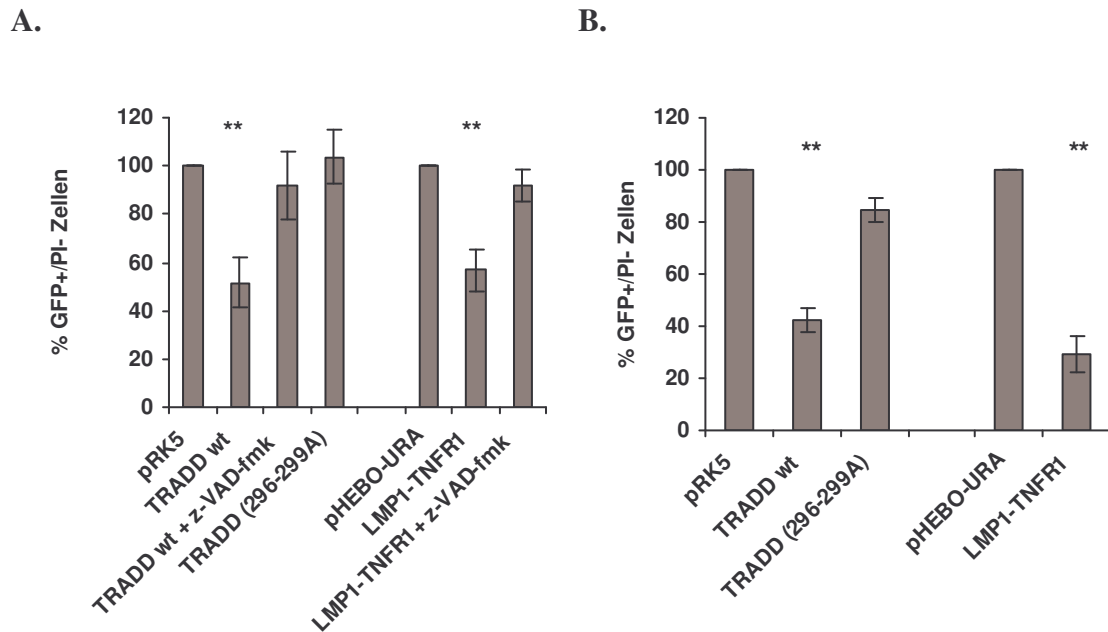


Abb. 4.7: Die transiente Expression von TRADD und dem chimären Fusionsprotein LMP1-TNFR1 verursacht eine durch Caspasen vermittelte Apoptose in BJAB und Jurkat Zellen. BJAB und Jurkat Zellen wurden mit jeweils 5 µg der genannten Konstrukte zusammen mit 1 µg pEGFP-C1 und 9 µg inerter Lachsspermien DNA bei 180 V und 975 µF elektroporiert. Bei den angegebenen Ansätzen wurden die Zellen direkt nach Elektroporation in Kulturmedium mit 2 µM z-VAD-fmk kultiviert. 24 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 0,5 µg/ml PI gefärbt und die Zelltodanalyse, wie in Abschnitt 3.2.5. beschrieben, durchgeführt. **(A)** Zelltodexperiment in BJAB Zellen. Der durch TRADD und LMP1-TNFR1 verursachte Zelltod konnte durch Zugabe des Pan-Caspaseinhibitors z-VAD-fmk ins Kulturmedium revertiert werden. Wie erwartet induzierte die inaktive TRADD_{296-299A} Mutante keine Apoptose. **(B)** Zelltodexperiment in Jurkat T-Zellen. TRADD und LMP1-TNFR1 induzieren auch in Jurkat Zellen Apoptose (Student's T-Test, **p<0,02).

Die Expression von TRADD wie auch von LMP1-TNFR1 verursachte bei den eingesetzten DNA Mengen eine Zelltodrate von 48 bzw. 43 %. Durch die Zugabe von 2 µM z-VAD-fmk in das Kulturmedium der Zellen konnte der zytotoxische Effekt der TRADD bzw. LMP1-TNFR1 Expression fast vollständig inhibiert werden. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Reduktion der Überlebensrate sowohl bei TRADD Überexpression als auch bei LMP1-TNFR1 Expression auf einen Caspase-abhängigen Zelltod, d.h. auf Apoptose, zurückzuführen ist. Wie erwartet, hatte transient exprimiertes TRADD_{296-299A} keinen Effekt auf die Überlebensrate der Zellen. Dies zeigt deutlich die Spezifität dieser Methode auf. Um die Methode in einem zweiten Zellsystem zu testen, wurden Jurkat T-Zellen, wie für BJAB Zellen beschrieben, mit

den in Abb. 4.7B aufgeführten Konstrukten elektroporiert und auf Zelltod analysiert. In Jurkat Zellen zeigte die transiente Überexpression von TRADD (Zelltodrate ca. 60 %) und LMP1-TNFR1 (Zelltodrate ca. 60 bis 70 %) ähnliche Effekte wie in BJAB Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die hier beschriebene neue Methode (Schneider und Kieser, 2004) ein hilfreiches Werkzeug zur Erforschung von Apoptose induzierenden Genen in Lymphozyten darstellt. Sie ist vor allem in B- und T-Zellen gut anwendbar, die meist für die Untersuchung Apoptose induzierenden Gene durch transiente Transfektionen schwer zugänglich sind. Diese Methode hat viele Vorteile. Es ist möglich mit dieser Methode die Effekte einzelner Gene, Kombinationen aus mehreren Genen, Genmutationen oder den Einfluss von Genfragmenten auf das Überleben von Lymphozyten zu studieren. Die hier beschriebene Zelltodmethode löst das allgemeine Problem der transienten Transfektion von Lymphozyten, mit dem hohen Hintergrund an elektroporationsbedingtem Zelltod und der geringen Transfektionseffizienz. Diese Methode ermöglicht außerdem die gleichzeitige Untersuchung vieler Parallelansätze, ist zu dem Kosten sparend und liefert sofort quantitative Daten. Im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit wird diese neue Methode Anwendung finden (siehe Abschnitt 4.4.3.).

4.3. Somatisches Gentergeting des *TRADD* Gens in humanen B-Lymphozyten

4.3.1. Die *TRADD*-Gentergeting Strategie

Aufgrund der Ergebnisse aus der FISH-Analyse (siehe Abschnitt 4.1.1.) und der TNF-R1 und TNF-R2 Genexpressionsstudien (siehe Abschnitt 4.1.2.) wurden die Burkitt-Lymphom-Zelllinien BJAB und DG75 als Kandidatenzelllinien für das somatische *TRADD*-Gentergeting ausgewählt. Die EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL2 wurde nachträglich in die *TRADD*-Gentergeting Experimente mit einbezogen, da diese in der Literatur kurz nach Beendigung der vorbereitenden Arbeiten als geeignete Zelllinie für ein somatisches Gentergeting beschrieben wurde (Faili *et al.*, 2002).

Das Vorgehen bei einem somatisches Gentergeting in einer humanen Zelllinie unterscheidet sich prinzipiell von dem bei der Herstellung einer homozygoten „*knockout*“ Maus (Übersichtsartikel: Capecchi, 1989a; Capecchi, 1989b). Beim somatischen Gentergeting in einer Zelllinie muss jedes einzelne Allel des zu deletierenden Gens separat durch homologe Rekombination mit einem Gentergeting-Vektor entfernt werden (Übersichtsartikel: Sedivy und Dutriaux, 1999). Zum Gentergeting der beiden Allele des *TRADD* Gens wurde die im Folgenden beschriebene Strategie gewählt.

Um beide *TRADD* Allele separat aus einer Zelle der Kandidatenzelllinien zu entfernen, wurden zwei *TRADD*-Gentergeting Vektoren (pTRADDko.1 und pTRADDko.2) konstruiert, die unterschiedliche *TRADD*-Deletionskassetten enthalten. Diese *TRADD*-Deletionskassetten dienen zur homologen Rekombination mit den endogenen *TRADD* Loci. Beide Konstrukte bestehen jeweils aus einem 5' *TRADD*-homologen Arm, aus einem 3' *TRADD*-homologen Arm und aus einer mit loxP Sequenzen flankierten Hygromycin B Phosphotransferase-GFP Kassette zur Positivselektion (siehe Abb. 4.8 und 4.9). Im Rückgrat der Vektoren wurde zur zusätzlichen Negativselektion ein HSV-Thymidinkinasegen integriert, das nicht Bestandteil der *TRADD*-Deletionskassetten ist.

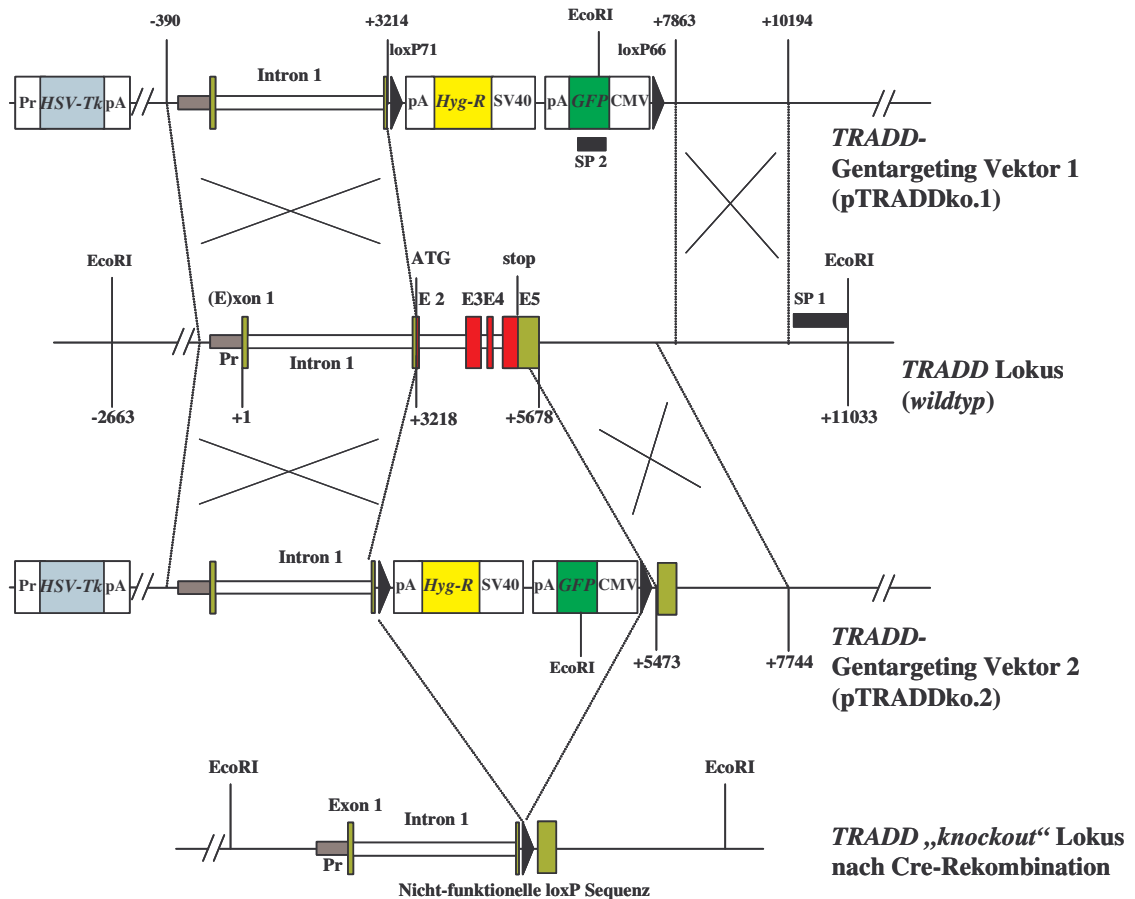


Abb. 4.8: Schematische Darstellung der *TRADD*-Gentargeting Strategie. Gezeigt werden die beiden *TRADD*-Gentargeting Vektoren pTRADDko.1 und pTRADDko.2 oberhalb und unterhalb des *TRADD* wildtyp Lokus. Die gestrichelten Linien mit den Überkreuzungen zeigen die Bereiche der *TRADD*-Gentargeting Vektoren, die mit dem endogenen *TRADD* Lokus homolog rekombinieren können. Ganz unten ist der zweite homolog rekombinierte *TRADD* Lokus nach Cre-vermittelter Entfernung der Hyg-GFP-Kassette dargestellt. Es bleiben nicht-funktionelle loxP Sequenzen im Genom zurück. Alle Positionsangaben in der Abbildung beziehen sich immer auf den Transkriptionsstart des endogenen *TRADD* Gens, dem die Position +1 zugeordnet wurde.

Während der 5' homologe Arm in beiden Gentargeting-Vektoren identisch ist, sind die 3' homologen Arme der beiden Gentargeting-Vektoren unterschiedlich (siehe unten). Die 5' homologe *TRADD* Sequenz entspricht dem Bereich von Position -390 bis +3214 im *TRADD* Lokus und umfasst den Promotorbereich des *TRADD* Gens, Exon 1, Intron 1 und einen Teil des Exons 2, der bis kurz vor dem ATG Translationsstart (Position +3218) des offenen Leserahmens von *TRADD* reicht (siehe Abb. 4.8 und 4.9). Die Positionsangaben beziehen sich immer relativ zur ersten Base des Exons 1 im *TRADD* Gen, der die Position +1 zugeordnet wurde (Arnd Kieser). Im pTRADDko.1 wurde eine

weiter außen liegende 3' homologe *TRADD* Sequenz gewählt, die im Bereich von Position +7863 bis +10194 mit dem *TRADD* Locus homolog rekombinieren kann. Damit erfolgt bei der homologen Rekombination von pTRADDko.1 mit dem ersten *TRADD* Allel eine Deletion des *TRADD* Gens zwischen den Positionen +3214 und +7863. Für den Vektor pTRADDko.2 wurde eine weiter innen liegende 3' homologe Sequenz gewählt, die mit den Positionen +5473 bis +7744 des *TRADD* Locus homolog rekombinieren kann. Da diese Sequenz im ersten Allel bereits deletiert wurde, kann pTRADDko.2 nur mit dem zweiten *TRADD* Allel homolog rekombinieren. Damit wird eine Rekombination von pTRADDko.2 mit dem ersten, bereits erfolgreich deletierten *TRADD* Allel vermieden.

Zwischen den beiden *TRADD* homologen Sequenzen wurde eine von modifizierten loxP Sequenzen (loxP71 und loxP66) flankierte Kassetten mit einem Hygromycin B Phosphotransferasegen (Hyg) und dem grünen Fluoreszenzprotein (GFP) integriert, um auf Integration der *TRADD*-Deletionskassetten im Genom der Zellen zu selektieren. Bei dieser Strategie stehen die Selektionsmarker Hyg und GFP unter Kontrolle eines eigenen SV40 bzw. CMV Promotors. Die loxP71 und loxP66 Sequenzen dienen der späteren, Cre vermittelten Entfernung der Selektionsmarker aus dem Genom der Zellen. Sie sind in den außen liegenden invertierten, sich wiederholenden Sequenzen mutiert (Albert *et al.*, 1995), so dass sie zwar als Substrat für die Cre Rekombinase dienen, aber nach Cre-Rekombination keine funktionelle loxP Sequenz im Genom hinterlassen (siehe Abschnitt 3.6.6.). Dies soll eine weitere Verwendung des loxP/Cre-Systems zur genetischen Manipulation dieser Zellen ermöglichen, ohne dass es bei wiederholten Cre Reaktionen zu Translokationen im Genom der Zellen kommt.

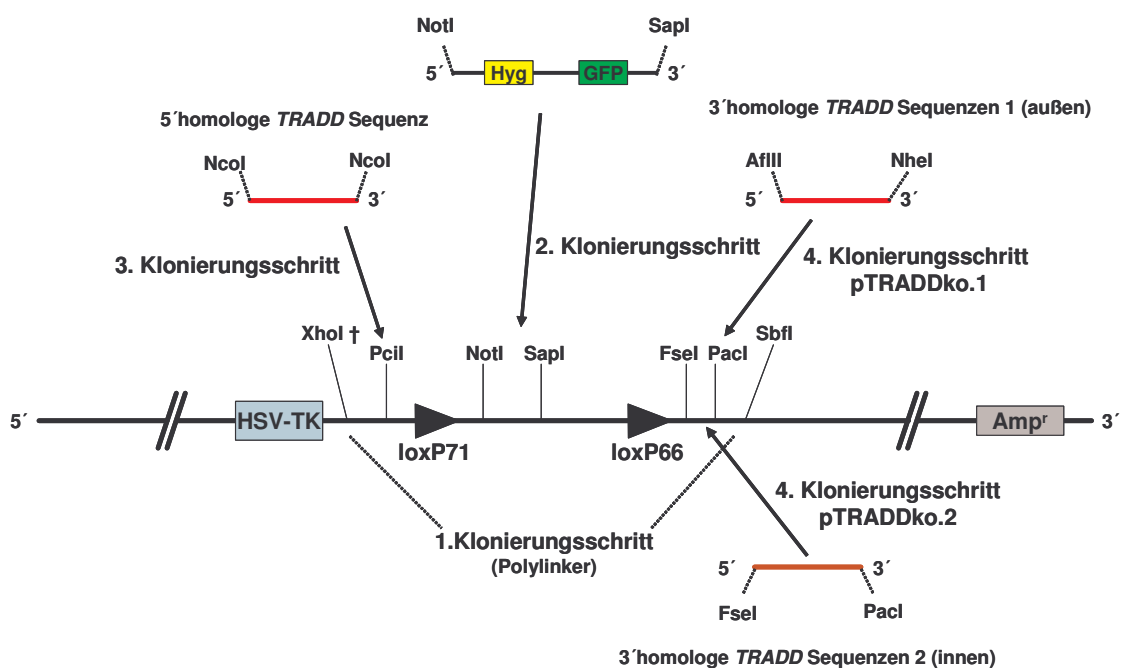
Um gegen ortsunspezifische Integrationsereignisse der gesamten Gentergeting-Vektoren mit Ganciclovir zu selektionieren, wurde zusätzlich in das Rückrat der *TRADD*-Gentergeting Vektoren eine Expressionskassette für das HSV-Thymidinkinasegen (HSV-TK) integriert. Das HSV-Thymidinkinasegen stammt vom Herpes-Simplex-Virus und kodiert für eine Thymidinkinase, die das Purinanalogon Ganciclovir monophosphoryliert. Das monophosphorylierte Ganciclovir wird dann von zellulären Enzymen in ein Triphosphat umgewandelt. In dieser Form kann es in die replizierende DNA der Zellen eingebaut werden und führt dort zu einem Strangabbruch während der DNA Replikation, was den Tod der Zelle zur Folge hat. Bei

ortsspezifischer, homologer Rekombination der *TRADD*-Deletionskassetten sollte das Thymidinkinasegen nicht im Genom der Zellen enthalten sein, so dass diese Zellen gegen eine Ganciclovir Behandlung resistent sind.

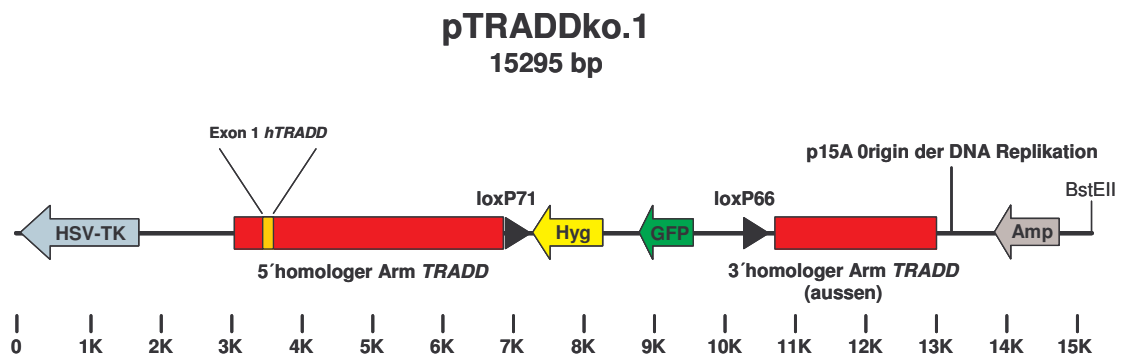
4.3.2. Klonierung der *TRADD*-Gentargeting Vektoren *pTRADDko.1* und *pTRADDko.2*

Bevor mit der Klonierung der *TRADD*-Gentargeting Vektoren begonnen werden konnte, wurde der gesamte humane *TRADD* Lokus aus einer Blutzellbank isoliert (RPCIP704M111012) und ein *EcoRI* Fragment des *TRADD* Lokus in den Vektor *pACYC184* (*pACYC184.1012.4*) subkloniert (Christian Kaiser und Arnd Kieser). *pACYC184.1012.4* enthält somit den gesamten *TRADD* Genlokus von Position -2669 (*EcoRI*) bis +11033 (*EcoRI*). Dabei zeigte sich, dass das humane *TRADD* Gen, nicht wie für die Maus beschrieben vier, sondern fünf Exons besitzt. Das erste Exon bleibt untranslatiert und der offene Leserahmen des *TRADD* Gens beginnt im Exon 2 an Position +3218 (siehe Abb. 4.8). Die Klonierung der *TRADD*-Gentargeting Vektoren wurde wie folgt beschrieben durchgeführt. In Abb. 4.9. sind die einzelnen Klonierungsschritte und der Aufbau der beiden *TRADD*-Gentargeting Vektoren schematisch dargestellt.

A.



B.



C.

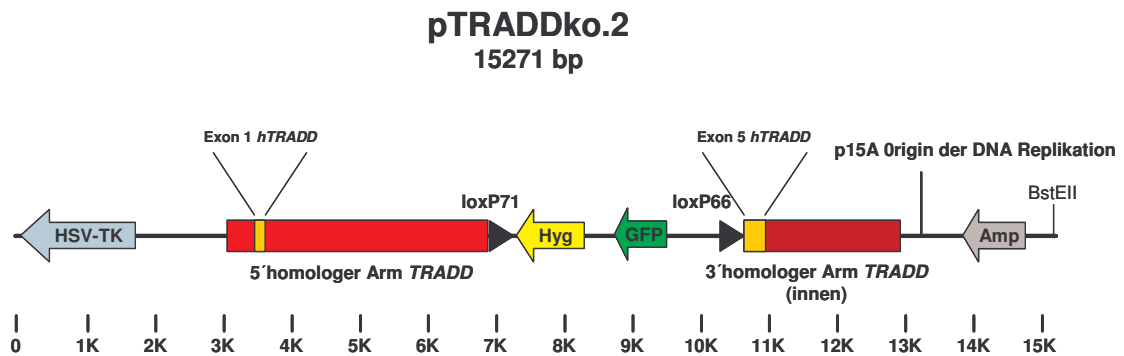


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Klonierung (A) und der hergestellten *TRADD*-Gentargeting Vektoren pTRADDko.1 (B) und pTRADDko.2 (C). Die Vektoren pTRADDko.1 und pTRADDko.2 enthalten Expressionskassetten für die Selektionsmarker Hygromycin B Phosphotransferase (Hyg), das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) und die Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase (HSV-TK). Die Hyg- und GFP-Kassette ist von zwei modifizierten loxP Sequenzen (loxP71 und loxP66) flankiert. Der 5' homologe Arm von *TRADD* ist in beiden Vektoren identisch und umfasst den Promotorbereich des *TRADD* Gens, Exon 1, Intron 1 und einen Teil des Exons 2, der bis zum ATG des *TRADD* ORFs reicht (von Position -390 bis +3214 des *TRADD* Lokus). Der 3' homologe Arm von *TRADD* ist in den beiden Vektoren unterschiedlich. In pTRADDko.1 wurde ein weiter außen liegender Bereich des *TRADD* Lokus (Position +7863 bis +10194) verwendet (Erklärung siehe Text). In pTRADDko.2 wurde der 3' Arm weiter innen gewählt. Er enthält noch ein kurzes Stück von Exon 5 des *TRADD* Gens (Position +5473 bis +7744). Die aufgeführte BstEII Restriktionsschnittstelle wurde zur Linearisierung der Vektoren vor der Transfektion verwendet. In (B) und (C) sind die Vektoren in ihrer durch BstEII linearisierten Form dargestellt.

Erster Klonierungsschritt:

Als Rückgrat zur Klonierung der *TRADD*-Gentargeting Vektoren wurde aus dem Vektor p2282 (siehe Abschnitt 2.2.) mit den Restriktionsenzymen XhoI und SbfI ein Fragment von 5751 bp geschnitten und isoliert. Es enthält die zur Vektorreplikation in *E.coli* notwendigen Sequenzen (*p15A origin of DNA replication*), ein Ampicillinresistenzgen (*β -lactamase*) und das HSV-Thymidinkinasegen (*HSV-TK*). In dieses Fragment wurde ein DNA-Polylinker eingesetzt, der alle notwendigen Restriktionsschnittstellen und zwei modifizierte loxP Sequenzen (loxP71 und loxP66) enthält. Dieser Polylinker wurde aus zwei synthetischen DNA-Oligonukleotiden (AK153 und AK154, Sequenzen siehe Abschnitt 2.3.) hergestellt. Dazu wurden die beiden Oligonukleotide, die in ihrem 3' Bereich über 30 Basenpaare überlappen, hybridisiert und mit Hilfe von Taq-Polymerase aufgefüllt. Der DNA-Polylinker wurde zunächst in den Vektor pCRII (Invitrogen) über eine TA-Klonierung nach Maßgabe des Herstellers kloniert und sequenziert (SP6 Primer). Von dort wurde der Polylinker über die Restriktionsschnittstellen XhoI und SbfI in das 5751bp lange Fragment aus p2282 eingefügt. Die XhoI Schnittstelle geht dabei verloren. Der entstandene Vektor wurde **pUC18-Tk/AK153-154** genannt.

Zweiter Klonierungsschritt:

In den Vektor pUC18-Tk/AK153-154 wurden nun zwei Expressionskassetten für das Hygromycinresistenzgen (Hyg) und für das Gen des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) über die Restriktionsschnittstellen NotI und SapI eingefügt. Die Hygromycin und GFP Kassette wurde komplett über NotI und SapI aus dem Vektor p2282 (siehe oben) entnommen. Dieser Vektor wurde **pUC18-Tk/Hyg-GFP** genannt.

Dritter Klonierungsschritt:

In den Vektor pUC18-Tk/Hyg-GFP wurde die 5' homologe *TRADD* Sequenz über die Restriktionsschnittstelle PciI eingefügt. Dazu wurde aus dem Vektor pGL3-hTRADD-luc (Arnd Kieser) ein 3614 bp langes Fragment (Position -390 bis +3214 des *TRADD* Locus) durch das Restriktionsenzym NcoI ausgeschnitten und isoliert. Dieses Fragment wurde in die PciI Schnittstelle des Vektors pUC18-Tk/Hyg-GFP kloniert. Dies war möglich, da PciI und NcoI kompatible kohesive Enden haben. Sowohl die PciI als auch die NcoI Schnittstelle gehen bei der Ligation verloren. Dieser Vektor wurde **pUC18-Tk/5'-Hyg-GFP** genannt.

Vierter Klonierungsschritt :

a) *TRADD*-Gentargeting Vektor 1

Um den ersten *TRADD*-Gentargeting Vektor fertigzustellen, musste der außen liegende 3' homologe Arm von *TRADD* eingefügt werden. Dazu wurde aus dem Vektor pACY184.1012.4 ein 2335 bp langes Fragment über AflIII und NheI (Position +7863 bis +10194 des *TRADD* Gens) ausgeschnitten, die Enden mittels Klenow-Reaktion geglättet und über PacI (Enden geglättet mittels T4 DNA Polymerasereaktion) in pUC18-Tk/5'-Hyg-GFP kloniert. Der hiermit fertiggestellte erste *TRADD*-Gentargeting Vektor wurde **pTRADDko.1** genannt (Abb. 4.9 B.).

b) *TRADD*-Gentargeting Vektor 2

Für die Herstellung des zweiten *TRADD*-Gentargeting Vektors wurde ein weiter innen liegender 3' homologer Bereich des *TRADD* Gens (Position +5473 bis +7744 des *TRADD* Gens) mittels PCR aus pACYC184.1012.4 mit den Primern FS36/FS37 amplifiziert. Die notwendigen FseI und PacI Schnittstellen wurden mit den Primern addiert. Das PCR Produkt wurde zunächst in den Vektor pCRII (Invitrogen) subkloniert und von dort über FseI und PacI in pUC18-Tk/5'-Hyg-GFP umkloniert. Dieser zweite *TRADD*-Gentargeting Vektor wurde **pTRADDko.2** genannt (Abb. 4.9 C.).

4.3.3. Herstellung *TRADD*-defizienter B-Zellen durch homologe Rekombination

Nach Klonierung der beiden *TRADD*-Gentargeting Vektoren konnte mit dem *TRADD*-Gentargeting in humanen B-Zellen begonnen werden. Unter Anwendung der in Abschnitt 3.6. beschriebenen Methoden wurden *TRADD*-Gentargeting Experimente in den Zelllinien DG75, BJAB und BL2 durchgeführt.

Nach der Transfektion von BJAB Zellen mit pTRADDko.1 und anschließender Selektion konnten ca. 200 Hygromycin- und Ganciclovir-resistente, sowie GFP exprimierende Einzelzellklone isoliert werden, von denen jedoch nicht ein einziger einen homolog rekombinierten *TRADD* Lokus aufwies (siehe Tab. 4.3). Der *TRADD*-Gentargeting Vektor integrierte damit offensichtlich ortsunspezifisch im Genom der Zellen, unter Verlust der Ganciclovir-Expressionskassette. Offensichtlich unterstützen

BJAB Zellen die homologe Rekombination nur unzureichend. BL2 Zellen konnten überhaupt nicht mit pTRADDko.1 transfiziert werden. Es waren keine GFP-exprimierenden Zellen zu erkennen und es wuchsen nach Hygromycin-Selektion keine Klone aus. Ein Grund dafür könnte die Größe des Vektors gewesen sein, da der deutlich kleinere Expressionsvektor pEGFP-C1 (ca. 4,7 kb) erfolgreich transfiziert werden konnte.

In Tab. 4.3 ist eine zusammenfassende Auflistung der selektionierten und in der Southern-Blot Analyse getesteten Klone der Zelllinien DG75, BJAB und BL2 dargestellt.

Zelllinie	DG75		BJAB		BL2	
	Getestete, GFP-positive, Hyg- und Ganciclovir-resistente Zellklone	Erfolgreiche Integration im <i>TRADD</i> Lokus	Getestete, GFP-positive, Hyg- und Ganciclovir-resistente Zellklone	Erfolgreiche Integration im <i>TRADD</i> Lokus	Getestete, GFP-positive, Hyg- und Ganciclovir-resistente Zellklone	Erfolgreiche Integration im <i>TRADD</i> Lokus
<i>TRADD</i> -Gentargeting, erstes Allel	145	2	204	0	k.K.	0
Erste Cre-Rekombination	27	27	0	0	0	0
<i>TRADD</i> -Gentargeting, zweites Allel	108	2	0	0	0	0
Zweite Cre-Rekombination	10	7	0	0	0	0

Tab. 4.3: Statistik der im Southern-Blot getesteten Einzelzellklone für die Zelllinien DG75, BJAB und BL2. Aus 145 selektionierten DG75 Klonen konnten in der ersten *TRADD*-Gentargeting Runde zwei *TRADD*-heterozygote Klone (*TRADD*^{+/−}) identifiziert werden. In diesen zwei Klonen wurde transient Cre exprimiert und auf GFP negative Klone selektioniert. Alle 27 getesteten GFP-negativen Klone waren für die Cre-Rekombination positiv. In der zweiten *TRADD*-Gentargeting Runde wurden 108 DG75 Klone getestet, in denen 2 homozygote, *TRADD*-defiziente Klone identifiziert wurden. In diesen beiden Zellklonen wurde erneut Cre transient exprimiert und daraus sieben homozygote, *TRADD*-defiziente Klone (*TRADD*^{−/−}) generiert. Bei dem Versuch, in BJAB Zellen *TRADD* zu deletieren, wurden 204 selektionierte Klone im Southern-Blot auf ortsspezifische Integration der *TRADD*-Deletionskassette des pTRADDko.1 im *TRADD* Lokus getestet und dabei kein einziger positiver Klon gefunden. In BL2 war es nicht möglich, GFP-positive, Hygromycin- und Ganciclovir-resistente Klone zu selektionieren. k.K.= keine Klone.

Dagegen konnten in der Zelllinie DG75 *TRADD*-defiziente Zellklone generiert werden (siehe Abb. 4.10, 4.11 und Tab. 4.3). Nach Transfektion von pTRADDko.1 in DG75 Zellen und folgender Selektion wurden 145 Hygromycin-resistente und GFP-exprimierende Klone isoliert und im Southern-Blot auf homologe Rekombination der *TRADD*-Deletionskassette im ersten *TRADD* Allel getestet. Hierfür und für alle folgenden Southern-Blot Analysen wurde die externe Southern-Blot Probe SP1 (siehe Abb. 4.8) verwendet. Es wurden zwei erfolgreich homolog rekombinierte DG75 *TRADD*^{+/-} Klone identifiziert (DG75 cl.4.53 und cl.4.56). Durch transiente Expression der Cre Rekombinase in Zellen der Klone DG75 cl.4.53 und cl.4.56 wurden die Selektionsmarker Hyg und GFP entfernt. Es entstanden nach Einzelzellklonierung die DG75 *TRADD*^{+/-} cl. 4.53.2 und cl. 4.56.20 (cl.4.56 und cl.4.56.20 sind in Abb. 4.10 nicht gezeigt). Zur Entfernung des zweiten *TRADD* Allels wurden nur Zellen des *TRADD*-heterozygoten Klons DG75 cl.4.53.2 mit pTRADDko.2 transfiziert. Nach Selektion konnten 108 Klone isoliert und im Southern-Blot auf homologe Rekombination im zweiten *TRADD* Allel getestet werden. Dabei wurden zwei homozygote DG75 *TRADD*^{-/-} Klone identifiziert (DG75 cl.4.53.2.9 und cl.4.53.2.12). In diesen beiden DG75 *TRADD*^{-/-} Klonen wurde erneut transient die Cre Rekombinase exprimiert und nach Einzelzellklonierung die *TRADD*^{-/-} Klone DG75 cl.9.3 und cl.9.4 aus DG75 cl.4.53.2.9 und die Klone DG75 cl.12.2, cl.12.3, cl.12.5, cl.12.7 und cl.12.9 aus DG75 cl.4.53.2.12 isoliert (siehe Abb. 4.10). Die Zellen der fertig hergestellten DG75 *TRADD*^{-/-} Klone haben keine Selektionsmarker und keine funktionellen loxP Sequenzen mehr im Genom. Zusätzlich wurden die Zwischenstufen bei der Herstellung der *TRADD*-defizienten DG75 Klone im Southern-Blot mit der internen Southern-Blot Probe SP2 (siehe Abb. 4.8) auf mehrmalige Integration der *TRADD*-Gentargeting Vektoren ins Genom der Zellen getestet. Dabei wurde keine mehrmalige Integration der Gentargeting-Vektoren im Genom der Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

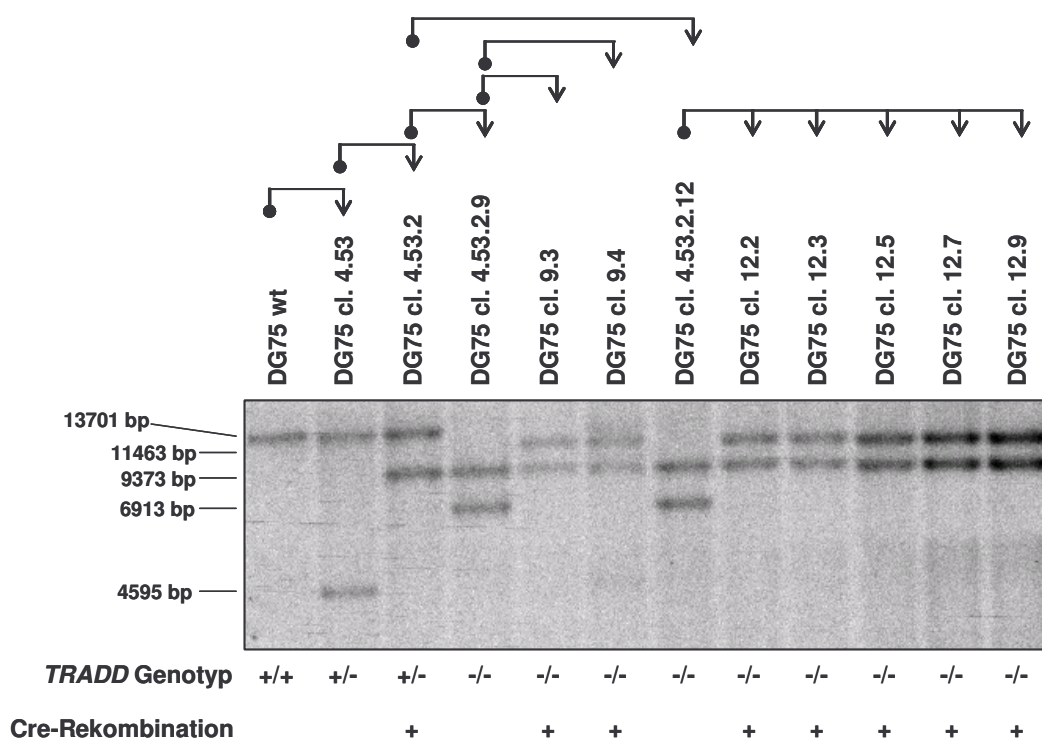


Abb. 4.10: Southern-Blot Analyse des *TRADD*-Gentargetings in DG75 Zellen. Die Southern-Blot Analyse wurde wie in Abschnitt 3.6.4. beschrieben durchgeführt. Dafür wurde die aus den aufgeführten DG75 Klonen isolierte genomische DNA mit EcoRI verdaut. Der endogene *TRADD* Locus ergibt bei der radioaktiven Southern-Blot Analyse ein spezifisches Signal bei 13701 bp. Die ortsspezifische Integration von pTRADDko.1 im *TRADD* Locus wird durch ein Signal bei 4595 bp angezeigt (DG75 cl. 4.53). Nach Cre-vermittelter Entfernung der Hyg- und GFP-Kassetten verändert sich das zweite Signal für den targetierten *TRADD* Locus auf 9373 bp (DG75 cl.4.53.2). Die Integration des zweiten Vektors pTRADDko.2 im zweiten *TRADD* Allel ergibt ein spezifisches, zusätzliches Signal bei 6913 bp (DG75 cl.4.53.2.9 und cl.4.53.2.12). Die *TRADD* wildtyp Bande bei 13701 bp ist dann nicht mehr detektierbar. Aus dem Klon 4.53.2.9 wurden die Klone 9.3 und 9.4, und aus 4.53.2.12 wurden die Klone 12.2, 12.3, 12.5, 12.7 und 12.9 durch Cre-vermittelte Entfernung der Hyg- und GFP-Kassette generiert. Dies wird durch die beiden spezifischen Banden bei 11463 bp und 9373 bp im Southern-Blot angezeigt. Der *TRADD* Genotyp und die Cre-Rekombination sind unterhalb des Southern-Blots angezeigt. Die Pfeile über der Abbildung verdeutlichen den Stammbaum der Zellklone.

Zusätzlich zur genetischen Verifikation der homozygoten DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen wurde die *TRADD* Proteinexpression in den hergestellten DG75 Klonen durch Immunoblot-Analyse getestet. In den heterozygoten DG75 *TRADD*^{+/-} Klonen cl.4.53 und cl.4.53.2 ist die *TRADD* Proteinexpression im Vergleich zu DG75wt um ca. 50 % reduziert. In den homozygoten DG75 *TRADD*^{-/-} Klonen cl.9.3 und cl.12.2 ist kein *TRADD* Protein mehr nachweisbar (siehe Abb. 4.11).

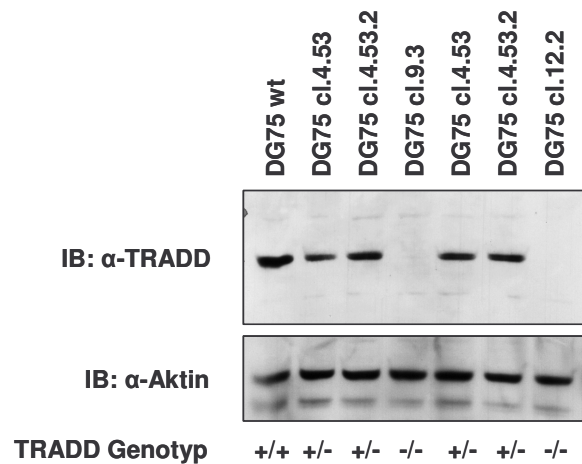


Abb. 4.11: TRADD Proteinexpression in DG75wt, DG75 $TRADD^{+/-}$ und DG75 $TRADD^{-/-}$ Klonen. Es wurden Immunoblot-Analysen der Klone DG75wt, DG75 cl.4.53, DG75 cl.4.53.2, DG75 cl.9.3 und DG75 cl.12.2 (siehe Abb. 4.10) mit einem TRADD-spezifischen, monoklonalen Antikörper (Transduction Laboratories) durchgeführt. Als Ladekontrolle wurden von der gleichen Nitrozellulosemembran die TRADD Antikörper entfernt (siehe Abschnitt 3.5.1.) und diese Membran nochmals mit einem für Aktin spezifischen Antikörper (I-19) gefärbt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten damit erstmalig durch das oben beschriebene Verfahren mehrere *TRADD*-defiziente DG75 Klone hergestellt werden. Alle Zwischenstufen und die finalen DG75 $TRADD^{-/-}$ Klone wurden genetisch durch Southern-Blot Analysen und auf Proteinebene durch Immunoblot-Analysen auf ihren jeweiligen *TRADD* Genotyp hin untersucht und verifiziert. Diese hergestellten *TRADD*-defizienten DG75 Zellen stellen das erste *TRADD* „knockout“ Zellsystem dar, in dem die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 und des viralen LMP1 nun untersucht werden konnte.

4.3.4. Morphologie und Viabilität der hergestellten *TRADD*-defizienten DG75 Klone

Die hergestellten Zwischenstufen und finalen DG75 $TRADD^{-/-}$ Klone wurden morphologisch unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiovert 200) untersucht. Es konnten keine phänotypischen Unterschiede zu den DG75wt Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Proliferationsrate der hergestellten DG75 Klone im Vergleich zu DG75wt Zellen zu untersuchen, wurden Wachstumskurven der DG75 Klone über fünf Tage erstellt (siehe Abb. 4.12).

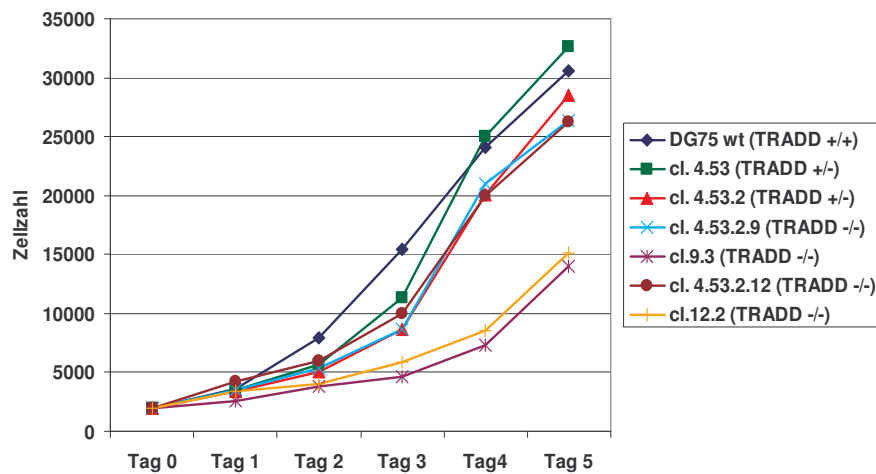


Abb. 4.12: Proliferationsraten der DG75wt, DG75 $TRADD^{+/-}$ und DG75 $TRADD^{-/-}$ Klone. Am Tag 0 wurden je 2000 Zellen der genannten DG75 Zellklone in Triplets in 96-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Coulter Counters an den jeweiligen Tagen gezählt. Die aufgeführten Zellzahlen entsprechen der Gesamtzellzahl pro 96-Loch.

Die Zellteilungsrate der generierten DG75 Klonen weisen gewisse Unterschiede im Vergleich zu DG75wt Zellen auf. Abb. 4.12 zeigt Wachstumskurven über fünf Tage für die genannten Zellklone. Die heterozygoten DG75 $TRADD^{+/-}$ Klone cl. 4.53 und cl.4.53.2 und die homozygoten $TRADD^{-/-}$ Klone cl.4.53.2.9 und cl.4.53.2.12 haben eine nahezu gleiche Zellteilungsrate wie DG75wt Zellen. Dies zeigt deutlich, dass das Fehlen von TRADD in diesen Zellen keinen Einfluss auf den Zellmetabolismus hat. Die homozygoten, rekombinierten DG75 $TRADD^{-/-}$ Klone cl.9.3 und cl.12.2 haben bei geringerer Zelldichte eine niedrigere Zellteilungsrate als DG75wt Zellen. Bei dichterem Zellkultur wachsen auch diese Zellen nahezu gleich schnell wie DG75wt Zellen. Deshalb wurden die Zellen der Klone DG75 cl.9.3 und cl.12.2 immer in einer ausreichenden Dichte, aber nicht zu dicht kultiviert. Die geringere Zellteilungsrate der Klone DG75 cl.9.3 und cl.12.2 kann nicht auf das Fehlen von TRADD zurückgeführt werden, da die homozygoten $TRADD$ -defizienten Klone DG75 cl. 4.53.2.9 und cl.4.53.2.12 eine normale Zellteilungsrate aufweisen. Die Unterschiede im Wachstumsverhalten der Klone DG75 cl.9.3 und cl.12.2 sind wahrscheinlich auf klonale Effekte zurückzuführen.

4.4. Charakterisierung der Signaltransduktion von TNF-Rezeptor 1 und LMP1 in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen

Nachdem die DG75 *TRADD*^{-/-} Zelllinien hergestellt und charakterisiert wurden (siehe Abschnitt 4.3.), konnte nun mit der Untersuchung der TRADD-abhängigen Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 und des viralen LMP1 begonnen werden. Wie in den Abschnitten 1.3.3. und 1.4.3. im Detail beschrieben, induzieren TNF-R1 und LMP1 eine Reihe von zellulären Signalwegen. Die wichtigsten dieser Signalwege, der NF-κB, der JNK1 und der apoptotische Signalweg, wurden im Folgenden in Abhängigkeit von TRADD genauer untersucht. Die Daten aller im Folgenden gezeigten Experimente wurden in DG75wt (DG75 *TRADD*^{+/+}) und DG75 cl.12.2 (DG75 *TRADD*^{-/-}) Zellen erhoben und in Zellen des Klons DG75 cl.9.3 (DG75 *TRADD*^{-/-}) bestätigt.

4.4.1. TNF-Rezeptor 1 und LMP1 aktivieren den klassischen NF-κB Signalweg über TRADD

Während der TNF-R1 nur den klassischen (kanonischen) NF-κB Signalweg aktivieren kann (siehe Abschnitt 1.3.3.), ist LMP1 in der Lage, sowohl den klassischen als auch den alternativen (nicht-kanonischen) Signalweg zur Aktivierung von NF-κB zu induzieren (siehe Abschnitt 1.4.3.). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass LMP1 über seine CTAR2 Domäne spezifisch den klassischen und über seine CTAR1 Domäne spezifisch den alternativen NF-κB Signalweg aktiviert (Luftig *et al.*, 2003; Luftig *et al.*, 2004).

Um die gesamte durch LMP1 und TNF-R1 induzierte, transkriptionelle Aktivierung von NF-κB zu erfassen, wurden als erstes NF-κB Luziferase-Reportergergen Experimente in DG75 *TRADD*^{+/+} (DG75wt) und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen durchgeführt. Bei diesen Experimenten wird nicht zwischen dem klassischen und alternativen NF-κB Signalweg unterschieden. Dazu wurden DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen mit dem Leervektor pHEBO-URA als Basiswert, Expressionsvektoren für LMP1 und für das chimäre Fusionsprotein LMP1-TNFR1, zusammen mit dem NF-κB Luziferase-Reportergergenkonstrukt 3κB-Luc und einem PGK-β-gal-Reportergergenkonstrukt transfiziert (siehe Abb. 4.13). Bei dem LMP1-TNFR1 Fusionsprotein wurden die LMP1 Transmembrandomänen mit der Signaldomäne des TNF-R1 fusioniert. Dieses

Konstrukt hat das gleiche Potential zur Autoaggregation in der Plasmamembran wie LMP1 und aktiviert dadurch konstitutiv und spezifisch TNF-R1 Signalwege über seinen TNF-R1 Anteil (Dudziak *et al.*, 2003; Schneider und Kieser, 2004). Durch die Verwendung von LMP1-TNFR1 wird damit ein Mischsignal mit TNF-R2 ausgeschlossen. Da nur geringe Mengen der Expressionsvektoren für die genannten Konstrukte transfiziert wurden, wurde auf die Koexpression des in Abschnitt 4.4.2. verwendeten, antiapoptotischen p35 Proteins verzichtet. 24 h nach Transfektion wurde die durch die NF- κ B Aktivierung induzierte Luziferasemenge gemessen (siehe Abschnitt 3.5.6.). Da DG75 Zellen bereits eine sehr hohe endogene NF- κ B Aktivität besitzen, konnten im Vergleich zur Leervektorkontrolle pHEBO-URA insgesamt nur schwache Induktionen durch LMP1 bzw. LMP1-TNFR1 erreicht werden, die aber trotzdem aussagekräftig waren.

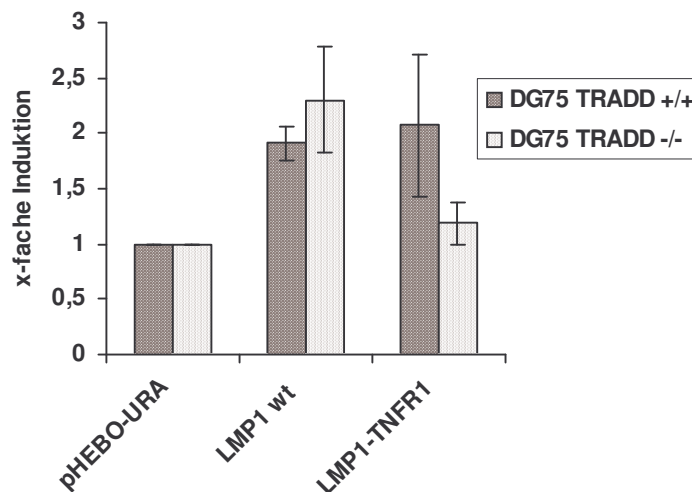


Abb. 4.13: NF- κ B Luziferase-Reportergen Experimente. Jeweils 5×10^6 DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen wurden mit je 2 μ g Leervektor oder Expressionsplasmiden für LMP1 bzw. LMP1-TNFR1, 2 μ g p1768 (3 \times κ B-Luc) und 4 μ g PGK- β Gal elektroporiert. 24 h nach Elektroporation wurde die Luziferaseaktivität bestimmt (siehe Abschnitt 3.5.6.). Die Luziferasewerte wurden auf die β Gal-Expression in den Zellen normalisiert. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch LMP1 konnte zwischen DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 4.13). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass LMP1 unabhängig von TRADD über CTAR1 die transkriptionelle Aktivität des NF- κ B

Reportergenkonstrukts erhöhen kann. Bei diesem Ergebnis ist es nicht möglich, eine Aussage über die Notwendigkeit von TRADD im CTAR2 Signalweg zutreffen. Dagegen induzierte die Expression des Fusionsproteins LMP1-TNFR1 in DG75 *TRADD*^{+/+} Zellen die NF-κB-abhängige Transkription um den Faktor zwei bis drei, was in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen nicht der Fall war. Dieses Ergebnis zeigt, dass TRADD in der Aktivierung von NF-κB durch den TNF-R1 eine essentielle Rolle spielt.

Da die Ergebnisse der NF-κB Luziferase-Reportergen Experimente für LMP1 keine eindeutigen Aussagen zuließen und um die Ergebnisse für den TNF-R1 zu bestätigen, wurde eine zweite Methode zur Untersuchung des NF-κB Signalwegs angewendet. Diese erlaubte eine differenziertere Untersuchung der Aktivierung des klassischen NF-κB Signalwegs von LMP1 und TNF-R1. Hierzu wurden IKKβ (I-κBα Kinase β) Immunkomplex-Kinaseversuche durchgeführt, um eine Aktivierung von IKKβ direkt nachzuweisen (siehe Abb. 4.14). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des klassischen NF-κB Signalwegs durch LMP1 und TNF-R1 spezifisch über IKKβ verläuft (Luftig *et al.*, 2003; Zandi *et al.*, 1997). Die Aktivierung der IKKβ durch LMP1 bzw. LMP1-TNFR1 Expression ist daher ein direktes Maß für die Induktion des klassischen NF-κB Signalwegs.

In diesen Experimenten wurden cao-LMP1 Konstrukte transfiziert, außer bei LMP1-CD40 (siehe Abschnitt 2.2.). Dies sollte zusätzlich potentielle zytotoxische Effekte vermeiden, die durch die B95.8-LMP1 Transmembrandomänen ausgelöst werden könnten (siehe Abschnitt 1.4.2.). Es wurde auch bei diesen Experimenten auf die Koexpression des antiapoptotischen p35 Proteins verzichtet, da dieses selbst bei Überexpression Einfluss auf die Aktivierung von NF-κB haben kann (Shiraki *et al.*, 2002) und dadurch die hohe NF-κB Hintergrundaktivität in DG75 Zellen noch weiter erhöhen könnte. In diesem Experiment wurden 2 µg der Expressionsvektoren für cao-LMP1(Y384G), cao-LMP1, cao-LMP1-TNFR1 und LMP1-CD40 zusammen mit 4 µg einer Flag-Epitop fusionierten IKKβ in jeweils 5x 10⁶ DG75 *TRADD*^{+/+} bzw. DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle wurde cao-LMP1(Y384G) verwendet, das den IKKβ/NF-κB Signalweg nicht mehr aktivieren kann. Als weitere Kontrolle wurde der Expressionsvektor für das LMP1-CD40 Fusionsprotein transfiziert, bei dem die LMP1 Transmembrandomänen mit der CD40 Signaldomäne fusioniert sind (Gires *et al.*, 1997). Dieses Fusionsprotein induziert konstitutiv CD40 Signale in der

Zelle, die TRADD-unabhängig sein sollten. 20 h nach Transfektion wurde Flag-IKK β mit dem Flag-spezifischen Antikörper M2 (Stratagene) immunpräzipitiert und anschließend *in vitro* Kinasereaktionen mit dem Substrat GST-I- κ B α durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.2.). Der Grad der Phosphorylierung von GST-I- κ B α ist ein direktes Maß für die Aktivierung des IKK β /NF- κ B Signalwegs durch die exprimierten Konstrukte.

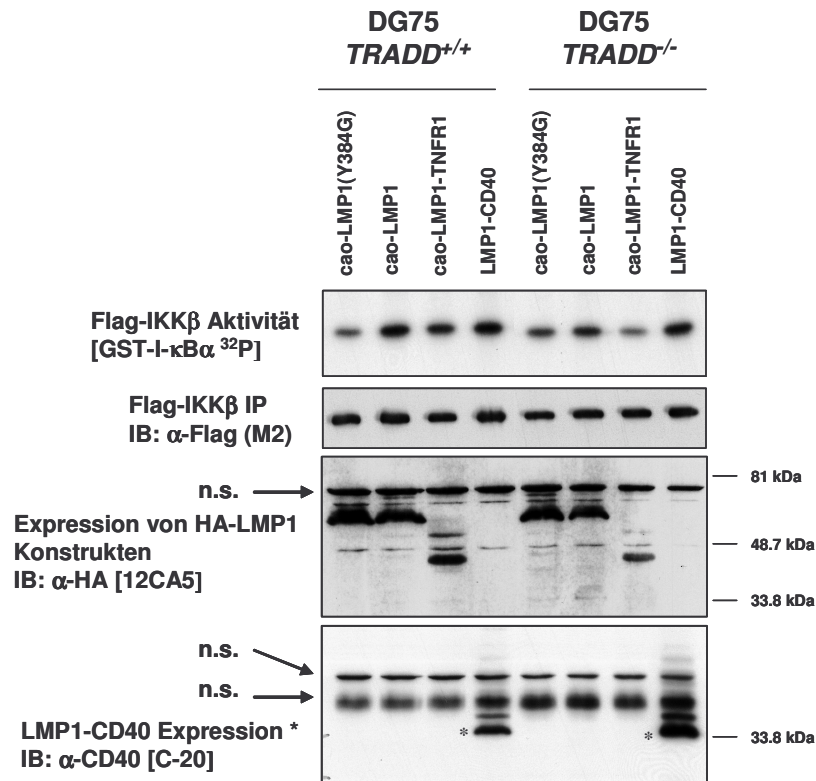


Abb. 4.14: Die Aktivierung des IKK β /NF- κ B Signalwegs durch LMP1 und TNF-R1 ist abhängig von TRADD. DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen wurden mit je 1 μ g Expressionsvektor der oben genannten Konstrukte und 5 μ g pcDNA3-Flag-IKK β elektroporiert. Die transfizierte Gesamtmenge an DNA wurde mit Lachsspermien-DNA auf 15 μ g angeglichen. 20 h nach Transfektion wurden IKK β Immunkomplex-Kinaseversuche (siehe Abschnitt 3.5.2.) durchgeführt. Die Aktivität der präzipitierten IKK β wurde durch *in vitro* Phosphorylierung des Substrats GST-I- κ B α nachgewiesen. Die Menge an immunpräzipitierter IKK β wurde durch Immunoblot-Analyse mit dem Flag-spezifischen Antikörper M2 dargestellt. Die Expression der transfizierten *cao*-LMP1 Konstrukte wurde durch Immunoblot-Analyse mit dem HA-spezifischen Antikörper 12CA5 und die Expression des LMP1-CD40 Konstrukts mit einem CD40 Antikörper (C-20), der spezifisch die zytoplasmatische Signaldomäne von CD40 erkennt, nachgewiesen. n.s.= nicht spezifisches Signal.

Wie in Abb. 4.14 gezeigt, aktivieren LMP1 (2,2-fach), LMP1-TNFR1 (1,9-fach) und LMP1-CD40 (2,5-fach) nach transientser Expression in DG75 *TRADD*^{+/+} Zellen den klassischen NF- κ B Signalweg. Während LMP1-CD40 auch in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen IKK β aktiviert (2,3-fach), liegt die Aktivierung von IKK β in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen sowohl durch LMP1 (1,2-fach) als auch durch LMP1-TNFR1 (0,9-fach) nahezu auf dem Basalwert von LMP1(Y384G). Diese Ergebnisse zeigen erstmals eindeutig, dass TRADD für die Aktivierung des IKK β /NF- κ B Signalwegs sowohl von LMP1 als auch von TNF-R1 essentiell ist.

Die IKK β Immunkomplex-Kinaseversuche zeigten, dass die Signaldomäne des LMP1-TNFR1 den IKK β /NF- κ B Signalweg nur in Abhängigkeit von TRADD aktivieren kann. Um die Rolle von TRADD bei der TNF-R1 induzierten NF- κ B Aktivierung auch im endogenen TNF-Rezeptorkontext zu zeigen, wurden DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen für 0, 5, 10 und 20 Minuten mit 50 ng/ml humanem TNF α stimuliert und die Phosphorylierung von I- κ B α durch Immunoblot-Analyse mit einem phosphospezifischen I- κ B α Antikörper untersucht (siehe Abb. 4.15). Um die hohe endogene NF- κ B Aktivität in den DG75 Zellen zu senken, wurde den Zellen vor TNF α Stimulierung für zwei Stunden das fötale Kälberserum entzogen. Bei längerem Entzug des Serums sterben DG75 Zellen ab. Trotz Entzug des Serums ist die basale Phosphorylierung von I- κ B α immer noch relativ hoch (siehe Abb. 4.15).

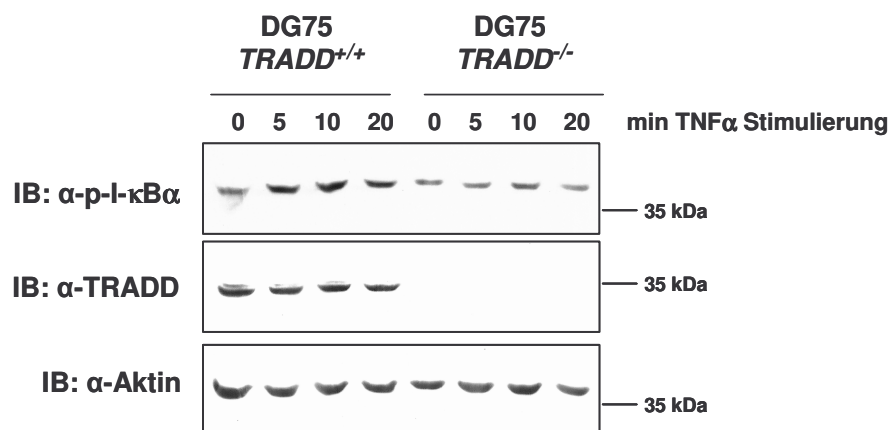


Abb. 4.15: TRADD ist notwendig für die TNF α -induzierte Aktivierung des NF- κ B Signalwegs in DG75 Zellen. DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen wurde für 0, 5, 10 oder 20 Minuten mit 50 ng/ml humanem TNF α (Roche) stimuliert. Es wurden klare Zelllysate hergestellt und Immunoblot-Analysen mit einem phosphospezifischen I- κ B α Antikörper (Cell Signaling), einem monoklonalen TRADD Antikörper (Transduction Laboratories) und einem aktinspezifischen Antikörper (I-19) durchgeführt.

Durch Stimulierung mit löslichem TNF α für die genannten Zeiträume ist in DG75 *TRADD*^{+/+} Zellen eine Zunahme der Phosphorylierung von I- κ B α zu erkennen. DG75 Zellen zeigen im Allgemeinen eine geringe Sensibilität für die Stimulierung mit TNF α . Der Grund für diese Beobachtung ist momentan unklar. DG75 Zellen exprimieren sowohl den TNF-R1 als auch den TNF-R2 (siehe Abb. 4.2). Da lösliches TNF α vor allem den TNF-R1 und nicht den TNF-R2 stimuliert, kann davon ausgegangen werden, dass die sichtbare Phosphorylierung von I- κ B α spezifisch vom TNF-R1 induziert wurde. In DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen bleibt die Phosphorylierung von I- κ B α auf dem Basallevel unstimulierter Zellen. Dieses Ergebnis stützt zusätzlich die Erkenntnisse aus den zuvor beschriebenen Experimenten. TRADD ist für die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs durch den TNF-R1 essentiell.

4.4.2. TNF-Rezeptor 1 und LMP1 aktivieren JNK1 unabhängig von TRADD

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der sowohl von TNF-R1 als auch von LMP1 aktiviert wird, ist der JNK1 Signalweg (siehe Abschnitt 1.3.3. und 1.4.3.). In TRAF2-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des JNK1 Signalwegs von TNF-R1 über TRAF2 verläuft (Hsu *et al.*, 1996b; Lee *et al.*, 1997; Natoli *et al.*, 1997; Reinhard *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). Da TRAF2 direkt mit TRADD, jedoch nicht mit dem TNF-R1 interagieren kann, wurde postuliert, dass TRAF2 über TRADD an den TNF-R1 bindet (Hsu *et al.*, 1996b; Park *et al.*, 2000; Rothe *et al.*, 1995). Dies konnte allerdings bis heute nur in Überexpressionsstudien bestätigt werden (Hsu *et al.*, 1996b). So wurde angenommen, dass die Aktivierung von JNK1 durch TNF-R1 über TRADD und TRAF2 verläuft. Somit wurde hier erwartet, dass TNF-R1 den JNK1-Signalweg in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen nicht mehr aktivieren kann.

Die Aktivierung des JNK1 Signalwegs durch LMP1 erfolgt über eine JNK-Aktivierungsregion (JAR), die zwischen den As 379 bis 384 der CTAR2 lokalisiert ist. Diese Region überlappt mit der TRADD Binderegion (As 384 bis 386) von LMP1 (Kieser *et al.*, 1999). Nach wie vor ist völlig unklar, ob TRADD an der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 beteiligt ist. Die Mutante LMP1(Y384G), in der das Tyrosin 384 in der CTAR2 von LMP1 zu Glycin mutiert ist, verliert die Bindung von TRADD an LMP1 und die LMP1-induzierte Aktivierung des JNK1 Signalwegs (Kieser *et al.*, 1999). Dennoch fehlte bis heute ein direkter Beweis für eine Rolle von TRADD bei der

Aktivierung des JNK Signalwegs durch LMP1 aufgrund des Fehlens eines *TRADD*^{-/-} Zellsystems.

Um diese offenen Fragen in der TNF-R1 und LMP1 Signaltransduktion zu beantworten, wurden in DG75wt und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen transiente JNK1-Immunkomplex-Kinaseexperimente durchgeführt. Dafür wurden Expressionsvektoren für die im Folgenden beschriebenen Konstrukte von LMP1 zusammen mit Expressionsvektoren für eine HA-Epitop fusionierte JNK1 (HA-JNK1) und dem Baculovirusprotein p35 in die genannten Zelllinien transfiziert. Das antiapoptotische p35 Protein wurde koexprimiert, um eventuelle apoptotische Signalwege, vor allem von LMP1-TNFR1, zu inhibieren (Seshagiri und Miller, 1997a). Als Kontrollen zur Bestimmung der basalen JNK1 Aktivität wurden Expressionsvektoren für die LMP1 Mutanten LMP1(Y384G) und LMP1 Δ 194-386 transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.). Beide LMP1 Mutanten sind nicht mehr in der Lage, JNK1 zu aktivieren (Kieser *et al.*, 1999). Als weitere Kontrolle wurden Expressionsvektoren für das chimäre LMP1-CD40 Fusionsprotein (siehe Abschnitt 4.4.1.) transfiziert. Zur Untersuchung der LMP1 bzw. TNF-R1 induzierten Aktivierung des JNK1 Signalwegs wurden Expressionsvektoren für LMP1 bzw. für das LMP1-TNFR1 Fusionsprotein transfiziert (siehe Abschnitt 4.4.1.). Auch hier konnte durch die Verwendung von LMP1-TNFR1 eine Erzeugung von Mischsignalen mit TNF-R2 ausgeschlossen werden.

20 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und HA-JNK1 Immunkomplex-Kinaseversuche durchgeführt. Dabei wurde HA-JNK1 mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 (Roche) immunpräzipitiert und *in vitro* das Substrat GST-c-jun phosphoryliert (siehe Abb. 4.16). Die Phosphorylierung von GST-c-jun ist ein direktes Maß für die JNK1 Aktivierung durch die exprimierten Konstrukte.

Wie in Abb. 4.16 gezeigt, können die Mutanten LMP1(Y384G) und LMP1 Δ 194-386 den JNK1 Signalweg nicht aktivieren. Wie zu erwarten war, aktiviert die Expression des LMP1-CD40 Fusionsproteins in Abwesenheit von TRADD den JNK1 Signalweg. Ebenso ist LMP1 in der Lage, TRADD-unabhängig den JNK1 Signalweg zu aktivieren. Dieses Ergebnis beweist erstmals, dass TRADD nicht für die Aktivierung des JNK1 Signalwegs durch LMP1 benötigt wird.

Erstaunlicherweise wird durch die Expression des LMP1-TNFR1 Fusionsproteins auch in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen (3,7-fache Induktion) der JNK1 Signalweg in Gleicherweise wie in DG75 *TRADD*^{+/+} Zellen (3,6-fache Induktion) aktiviert. Dieses Ergebnis war unerwartet, da es das bis heute gültige Modell der TNF-R1 Signaltransduktion in Frage stellt, in dem die JNK1 Aktivierung durch den TNF-R1 über TRADD und TRAF2 verläuft (Aggarwal, 2003; Chen und Goeddel, 2002; Wajant *et al.*, 2003).

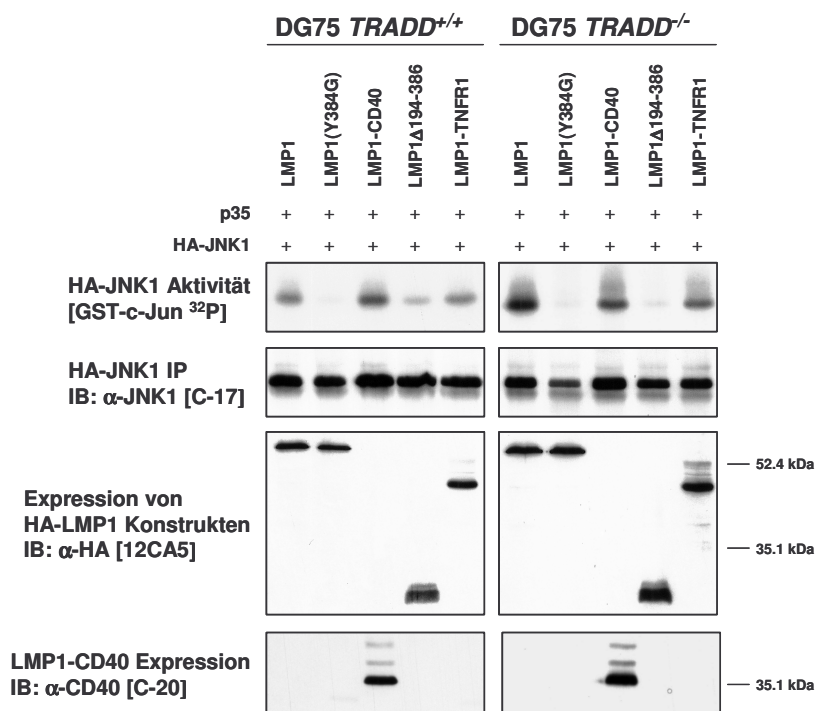


Abb. 4.16: TNF-R1 und LMP1 aktivieren JNK1 unabhängig von TRADD. DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen wurden mit 5 µg der Expressionsvektoren für die oben aufgeführten LMP1-Konstrukte, 3 µg HA-JNK1 und 2 µg p35 transfiziert. Die transfizierte Gesamtmenge an DNA wurde mit Lachsspermien-DNA auf 15 µg angeglichen. 20 h nach Elektroporation wurden *in vitro* HA-JNK1 Immunkomplex-Kinaseversuche durchgeführt. Die Aktivität des präzipitierten HA-JNK1 wurde durch Autoradiografie des radioaktiv phosphorylierten Substrats GST-c-jun nachgewiesen. Die Mengen an immunpräzipitierter HA-JNK1 (IP) wurde mit einem JNK1 (C-17) spezifischen Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Die Expression der HA-LMP1 Konstrukte wurde in Ganzzelllysaten mit dem HA-spezifischen monoklonalen Antikörper 12CA5 (Roche) nachgewiesen. Die Expression von LMP1-CD40 wurde mit einem CD40 Antikörper (C-20) nachgewiesen, der spezifisch die zytoplasmatische Signaldomäne von CD40 erkennt.

An dieser Stelle stellte sich nun die Frage, wie TNF-R1 durch einen TRADD-unabhängigen, aber TRAF2-abhängigen Signalweg JNK1 aktiviert. Kann TRAF2 ohne TRADD mit dem TNF-R1 interagieren? Diese Frage wird im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit adressiert werden (siehe Abschnitt 4.6.).

4.4.3. TNF-Rezeptor 1 induziert Apoptose über TRADD

Nachdem die Rolle von TRADD in der TNF-R1- und LMP1-induzierten Aktivierung von NF- κ B und JNK1 geklärt werden konnte, war nun die Rolle von TRADD im apoptotischen Signalweg des TNF-R1 von Interesse. Dieser Signalweg wurde als ein TRADD-, FADD- und Caspasen-abhängiger Signalweg beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.3.).

Als erstes wurde versucht, in DG75 Zellen durch TNF α Stimulierung Apoptose zu induzieren. Trotz Zugabe von Cycloheximid ins Kulturmedium der Zellen, welches die Expression NF- κ B-regulierter, antiapoptotischer Proteine inhibiert, konnte in DG75 Zellen keine Apoptose induziert werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die geringe Caspase-8 Proteinmenge (Daten nicht gezeigt) oder das Fehlen von Bax sein, dessen Gen in DG75 Zellen mutiert ist (Brimmell *et al.*, 1998).

Um die Rolle von TRADD bei der Aktivierung des apoptotischen Signalwegs von TNF-R1 in DG75 Zellen zu charakterisieren, wurde daher die in Abschnitt 4.2. beschriebene Methode herangezogen, mit der Apoptose nach transienter Transfektion Apoptose induzierender Gene nachgewiesen werden kann. Dazu wurden wie in Abb. 4.17 aufgeführt, jeweils 10 μ g pHEBO-URA Leervektor, bzw. Expressionsvektoren für cao-LMP1 und cao-LMP1-TNFR1 zusammen mit 1 μ g pEGFP-C1 und 3 μ g pCMV-I- κ B $\alpha_{32/36A}$ in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen transfiziert. Die cao-LMP1 Konstrukte wurden gewählt, um einen Beitrag der Transmembrandomänen von LMP1 zum detektierten Zelltod auszuschließen. Die Expression von GFP dient, wie in Abschnitt 4.2. beschrieben, der Detektion erfolgreich transfizierter Zellen in der FACS-Analyse. I- κ B $\alpha_{32/36A}$ ist eine dominant-negative I- κ B α Mutante (siehe Abschnitt 2.2.), die spezifisch den TNF-R1 induzierten, klassischen NF- κ B Signalweg inhibiert. Dadurch kommt es bei TNF-R1 Aktivität nicht zur Expression NF- κ B-induzierter, antiapoptotischer Faktoren, wie z.B. der von cIAPs, XIAP oder bcl-2 (Traenckner *et al.*,

1995). Es wurde für viele Zelllinien beschrieben, dass TNF-R1 Apoptose nur bei gleichzeitiger Inhibition des NF- κ B Signalwegs induzieren kann (Beg und Baltimore, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1996a; Wang *et al.*, 1998).

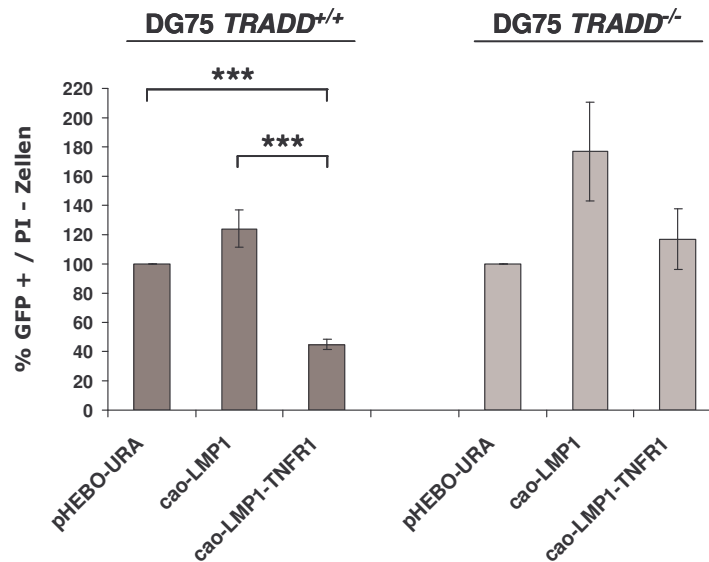


Abb. 4.17: TNF-R1 induziert Apoptose über einen TRADD-abhängigen Signalweg. DG75 TRADD^{+/+} und DG75 TRADD^{-/-} Zellen wurden mit je 10 μ g pHEBO-URA, pSV-HA-caoLMP1 oder pSV-HA-caoLMP1-TNFR1 zusammen mit 1 μ g pEGFP-C1 und 3 μ g pCMV-I- κ B $\alpha_{32/36A}$ transfiziert. Die Gesamtmenge an DNA wurde mit inerte Lachsspermien-DNA auf 15 μ g angeglichen. 24 h nach Transfektion wurde der durch die Expression der Konstrukte verursachte Zelltod mit der in Abschnitt 4.2. beschriebenen Methode im FACS quantifiziert. Die relative Anzahl an GFP+/PI- Zellen ist ein Maß für die Überlebensrate. Die Anzahl an GFP+/PI- Zellen im Leervektor-Ansatz wurde auf eine Überlebensrate von 100 % gesetzt. Alle weiteren Ansätze wurden auf die entsprechenden Leervektor-Ansätze bezogen. (Student's T-Test, *** p < 0,004).

Die Anzahl an GFP+/PI- Zellen in den mit Leervektoren transfizierten Ansätzen wurde als Überlebensrate von 100 % definiert (siehe Abschnitt 4.2.). Die Anzahl an GFP+/PI- Zellen in den mit Expressionsvektoren für cao-LMP1 bzw. cao-LMP1-TNFR1 transfizierten Ansätzen wurde auf die Überlebensrate des Leervektor-Ansatzes bezogen.

Die Expression von cao-LMP1-TNFR1 führte in DG75 TRADD^{+/+} Zellen zu einer Zelltodrate von ca. 50 bis 60 % (siehe Abb. 4.17). Dieser Effekt, der durch die TNF-R1 Signaldomäne des Fusionsproteins induzierten Signale, ging in DG75 TRADD^{-/-} Zellen verloren. Die Expression von cao-LMP1 erhöhte sogar die Überlebensrate der

transfizierten Zellen, sowohl in DG75 *TRADD*^{+/+} als auch in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen. Dies könnte auf proliferative Signale des cao-LMP1 zurückzuführen sein. B95.8-LMP1 führt dagegen bei Überexpression in DG75 Zellen zu zytotoxischen oder zytostatischen Effekten (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass TRADD für die Induktion von Apoptose durch den TNF-R1 notwendig ist. Damit wird das heute gültige Modell der TNF-R1-vermittelten Apoptose gestützt.

4.5. Charakterisierung der Rolle von TRADD in der TNF-Rezeptor 1 Signaltransduktion mit Hilfe von TRADD-siRNA in HeLa Zellen

Durch die Etablierung *TRADD*-defizienter DG75 Zellen konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit neue Erkenntnisse über die Rolle von TRADD in der Signalübertragung durch den TNF-R1 und durch LMP1 gewonnen werden. Da sich DG75 Zellen jedoch nur unzureichend mit TNF α stimulieren ließen (siehe Abschnitt 4.4.1.), wurden die bisherigen Ergebnisse im Bereich von TNF-R1 Signaltransduktion größtenteils durch Anwendung des chimären LMP1-TNFR1 Fusionsproteins gewonnen. Hierbei handelt es sich zwar um ein etabliertes System, das aber trotzdem als artifiziell bezeichnet werden muss. Daher war es von großer Bedeutung, die gewonnenen Ergebnisse aus den *TRADD*-defizienten DG75 Zellen mit dem endogenen TNF-R1 in einem anderen Zellsystem zu verifizieren.

Da keine zweite *TRADD*-defiziente Zelllinie zur Verfügung steht, wurde zusätzlich die siRNA Technologie (Übersichtsartikel: Meister und Tuschl, 2004) zur spezifischen Reduktion der TRADD Expression in HeLa Zellen angewendet. HeLa Zellen exprimieren nur TNF-R1, nicht TNF-R2 und lassen sich sehr gut mit TNF α stimulieren (Jupp *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 1997). Deswegen wurden diese Zellen in der Vergangenheit des Öfteren zur Untersuchung von TNF-R1 Signalwegen verwendet (Deng *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1996; McFarlane *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000).

4.5.1. Optimierung der Transfektion von siRNA Oligonukleotiden in HeLa Zellen

Vor Beginn der eigentlichen TNF α Stimulationsexperimente musste die Transfektion der siRNA Oligonukleotide optimiert werden. Dazu wurden unspezifische, mit Alexa-Fluor 488 gekoppelte siRNA Oligonukleotide (siehe Abschnitt 2.3.) mit zwei verschiedenen Transfektionsreagenzien (RNAifect, Lipofectamine2000™) in HeLa Zellen transfiziert. Es wurde in einer Reihe von Transfektionen versucht, das optimale Verhältnis zwischen siRNA Oligonukleotidmenge, Menge an Transfektionsreagenz und Zelldichte der zu transfizierenden Zellen zu ermitteln (Daten nicht gezeigt).

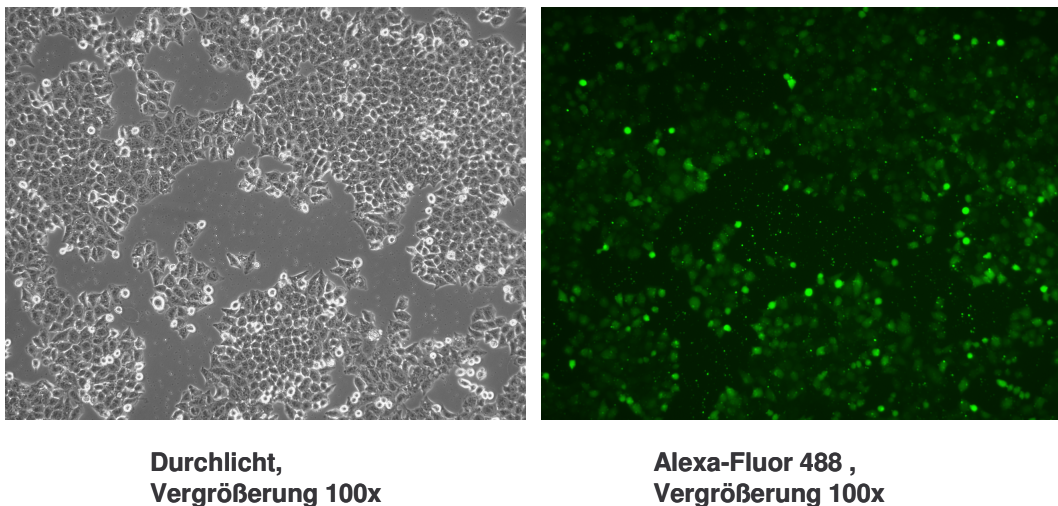


Abb. 4.18: Überprüfung der Transfektionseffizienz von Alexa-Fluor 488-gekoppelten siRNA Oligonukleotiden. Um die Transfektionseffizienz der siRNA Oligonukleotide für die folgenden Experimente zu optimieren und zu überprüfen, wurden unspezifische Alexa-Fluor 488 gekoppelte siRNA Oligonukleotide mit Lipofectamine2000™ in HeLa Zellen transfiziert (siehe Abschnitte 2.3. und 3.2.4.). Die transfizierten Zellen zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop eine grüne Fluoreszenz. Die Zellen wurden bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Die Abbildung der grün fluoreszierenden Zellen wurde nachträglich mit dem Programm Openlab (Improvision) eingefärbt.

Die Transfektionseffizienz konnte bei der Transfektion von Alexa-Fluor 488-gekoppelten siRNA Oligonukleotiden direkt am Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Es konnte schließlich ein optimiertes Transfektionsprotokoll erstellt werden, bei dem die siRNA Oligonukleotide mit Lipofectamine2000™ nach dem in Abschnitt 3.2.4. detailliert beschriebenen Protokoll transfiziert wurden. Lipofectamine2000™

zeigte zwar eine etwas höhere Zytotoxizität als RNAiVect, dafür aber eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz. In Abb. 4.18 sind mikroskopische Aufnahmen von HeLa Zellen gezeigt, die nach diesem optimierten Transfektionsprotokoll mit Alexa-Fluor 488-gekoppelten siRNA Oligonukleotiden transfiziert wurden. Es konnte eine Transfektionseffizienz von annähernd 100 % ermittelt werden.

Um eine maximale Reduktion der TRADD Proteinmenge in HeLa Zellen zu erreichen, mussten HeLa Zellen mit den TRADD-spezifischen siRNA Oligonukleotiden FS/siRNA1 zweimal an aufeinander folgenden Tagen mit Lipofectamine2000™ transfiziert werden. Nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen weitere 48 h kultiviert, bis die im Folgenden beschriebenen TNF α Stimulationsexperimente durchgeführt wurden. Der Grund für diese Vorgehensweise war die offensichtlich lange Halbwertszeit des TRADD Proteins. Erst nach zweifacher Transfektion der HeLa Zellen mit den TRADD-spezifischen siRNA Oligonukleotiden und weiteren 48 Stunden in Kultur war die erwünschte Reduktion der TRADD Expression erreicht (siehe Abschnitt 4.5.2.). Alle weiteren Transfektionen von siRNA Oligonukleotiden wurden mit Lipofectamine2000™ nach dem in Abschnitt 3.2.4. beschriebenen Protokoll durchgeführt.

4.5.2. Die Rolle von TRADD in TNF-Rezeptor 1 Signalwegen in HeLa Zellen

Um die Rolle von TRADD in TNF-R1 Signalwegen zu untersuchen, wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll parallel unspezifische und TRADD-spezifische siRNA Oligonukleotide in HeLa Zellen transfiziert. Der Ansatz mit den transfizierten unspezifischen siRNA Oligonukleotiden diente als Kontrolle, um mögliche Nebeneffekte der siRNA Transfektion zu erfassen.

Jeweils 48 h nach der zweiten siRNA Transfektion wurde den Zellen für 3 h das fötale Kälberserum (FKS) im Kulturmedium entzogen. Dies diente zur Reduktion von Hintergrundsignalen, die durch Bestandteile des FKS, wie z.B. Zytokinen oder Wachstumsfaktoren, verursacht werden. Daraufhin wurden die Zellen für die jeweiligen Zeitspannen in serumfreiem Kulturmedium mit 20 ng/ml humanem TNF α stimuliert (siehe Abb. 4.19 und 4.20). Die Zellen wurden umgehend in TBST-Lysepuffer lysiert

und die TNF α induzierten Signalwege mittels Immunoblot-Analysen untersucht. Die TRADD Proteinexpression konnte durch Transfektion TRADD-spezifischer siRNA Oligonukleotiden in HeLa Zellen um ca. 90 % reduziert werden. Die Aktivierung des JNK1/2 und NF- κ B Signalwegs wurde jeweils mit phosphospezifischen Antikörpern gegen p-JNK1/2 und p-I- κ B α untersucht (siehe Abb. 4.19 und 4.20).

Wie in Abb. 4.19 gezeigt, ist bei der Phosphorylierung und Degradierung von I- κ B α , Erkennungszeichen für die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs, eine leichte Reduktion in der Gegenwart von TRADD-siRNA zu erkennen. Der Signalweg ist allerdings nicht vollständig geblockt. Die Degradation des I- κ B α Proteins, eine Folge der Phosphorylierung (siehe Abschnitt 1.3.3.), scheint bei reduzierter TRADD Proteinmenge in den Zellen etwas langsamer zu verlaufen, ist aber dennoch nachweisbar. Dies deutet auf eine reduzierte Aktivierung des NF- κ B Signalwegs hin. Da die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs nur schwach inhibiert wurde, war anzunehmen, dass die geringe in den HeLa Zellen verbliebene TRADD Proteinmenge ausreichend war, um diesen Signalweg durch TNF-R1 noch zu aktivieren. Da in vielen Fällen eine sehr geringe Anzahl von Signalmolekülen in der Zelle ausreichend ist, um Signaltransduktion zu vermitteln, ist dieses Ergebnis nicht ungewöhnlich.

Die TNF α -induzierte Phosphorylierung von JNK1/2 und damit dessen Aktivierung ist bei stark reduzierter TRADD Proteinmenge nahezu identisch mit den Kontrollansätzen, die eine normale TRADD Expression zeigen (siehe Abb. 4.19). Die Erklärungsmöglichkeit, dass der Grad der Reduktion der TRADD Expression prinzipiell zu gering ist, um TNF-R1 Signaltransduktion zu inhibieren, scheidet aus, da unter gleichen Bedingungen die Aktivierung von Apoptose durch TRADD-siRNA inhibiert werden konnte (siehe Abschnitt 4.5.3.). Die in diesen Experimenten erhaltenen Ergebnisse stützen die Ergebnisse aus den DG75 TRADD^{-/-} Zellen (siehe Abschnitt 4.4.1. und 4.4.2.).

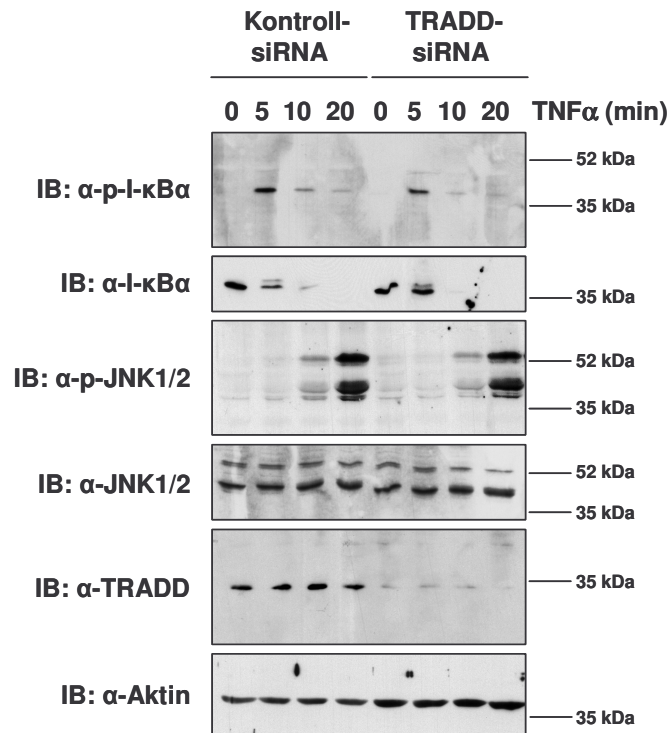


Abb. 4.19: TNF-R1 induzierte Signalwege in HeLa Zellen bei reduzierter TRADD Expression durch TRADD-siRNA. HeLa Zellen wurden mit Kontroll- oder TRADD-siRNA Oligonukleotiden zweimal innerhalb von 24 h transfiziert und 48 h nach der zweiten Transfektion (siehe Abschnitt 3.2.4.) für 0, 5, 10 und 20 min mit 20 ng/ml humanem TNF α stimuliert. Die stimulierten HeLa Zellen wurden daraufhin in TBST-Lysepuffer lysiert und Immunoblot-Analysen durchgeführt. Es wurden die durch TNF α induzierten TNF-R1 Signalwege zu I- κ B α und JNK1/2 mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Nach Inkubation der Immunoblots mit den phosphospezifischen Antikörpern wurden die Antikörper mit einem speziellen „Stripping-Puffer“ wieder entfernt (siehe Abschnitt 3.5.1.) und die Membranen erneut mit Antikörpern gegen die jeweiligen unphosphorylierten Proteine I- κ B α und JNK1/2 (Mischung aus JNK1 (C-17) und JNK2 (FL) Antikörper) inkubiert. Die TRADD Proteinmenge wurde mit einem monoklonalen TRADD Antikörper (Transduction Laboratories) nachgewiesen. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich der zuvor mit TRADD-Antikörper inkubierte Immunoblot mit einem aktinspezifischen Antikörper (I-19) behandelt.

In der Signaltransduktion von Rezeptoren, wie z.B. der des TNF-R1, können die einzelnen induzierten Signalwege nicht als lineare und isolierte Vorgänge betrachtet werden. Es gibt Vernetzungen zwischen Signalwegen und Rückkopplungsmechanismen, die in komplexer Weise die biologische Antwort auf bestimmte Stimuli regulieren. In früheren Arbeiten wurde demonstriert, dass NF- κ B auf indirektem Weg durch Regulation von Zielgenen die Aktivierung von JNK inhibieren kann (De Smaele *et al.*, 2001; Papa *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2001).

Es stellte sich nun die Frage, ob die verminderte NF- κ B Aktivierung nach TNF α Stimulierung der HeLa Zellen, verursacht durch den TRADD „*knock-down*“, ausreichend war, um einen Einfluss auf die JNK Aktivierung zu haben. Da Vorgänge, die durch Neusynthese von Proteinen reguliert werden, eine gewisse Verzögerung in ihrer Wirkung haben, wurde überprüft, ob bei längerer TNF α Stimulierung ein Unterschied in der JNK Phosphorylierung zwischen Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten Zellen zu erkennen ist. HeLa Zellen wurden mit Kontroll- und TRADD-siRNA Oligonukleotiden transfiziert und für 0, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten mit 20 ng/ml TNF α stimuliert (siehe Abb. 4.20).

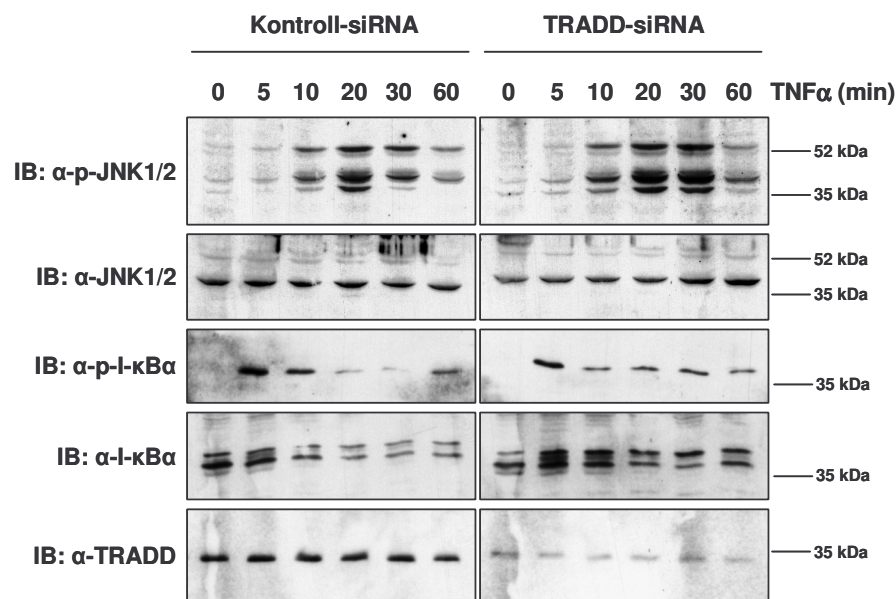


Abb. 4.20: Eine verminderte TRADD Proteinmenge führt zu einer verlängerten JNK Aktivierungskinetik nach TNF α Stimulierung. HeLa Zellen wurden mit Kontroll- oder TRADD-siRNA Oligonukleotiden zweimal innerhalb von 24 h transfiziert und 48 h nach der zweiten Transfektion (siehe Abschnitt 3.2.4.) für 0, 5, 10, 20, 30 und 60 min mit 20 ng/ml humanem TNF α stimuliert. Die Aktivierung der jeweiligen TNF α induzierten Signalwege wurde mit phosphospezifischen Antikörpern im Immunoblot untersucht. Die phosphospezifischen Antikörper wurden von den Immunoblots entfernt (siehe Abschnitt 3.5.1.) und dieselben Blots erneut mit Primärantikörpern gegen die jeweils unphosphorylierten Proteine gefärbt.

Wie in Abb. 4.20 zu erkennen ist, verläuft die Phosphorylierung von JNK1/2 in den ersten 20 min in Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten Zellen vergleichbar. Nach 30 min ist in den Kontrollansätzen eine deutliche Abnahme der JNK1/2 Phosphorylierung zu erkennen. In TRADD „*knock-down*“ Ansätzen ist die JNK1/2

Phosphorylierung nach 30 min TNF α Stimulierung dagegen immer noch auf dem gleichen Niveau wie nach 20 Minuten. Erst nach 60 min Stimulierung ist der JNK Signalweg wieder fast abgeschaltet. Dies zeigt, dass das Aktivierungsniveau von JNK1/2 bei stark reduzierten TRADD Mengen gleich hoch ist wie in den Kontrollansätzen, jedoch eine veränderte Kinetik aufweist. Dies könnte auf eine reduzierte Transkription NF- κ B regulierter Gene zurückzuführen sein.

4.5.3. Die Rolle von TRADD in der Apoptoseinduktion durch den endogenen TNF-Rezeptor 1 in HeLa Zellen

Bei der Untersuchung des TNF-R1 induzierten JNK1/2 und NF- κ B Signalwegs in TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen konnten die Ergebnisse aus den DG75 TRADD^{-/-} Zellen im Prinzip bestätigt werden. Der TNF-R1 induzierte JNK1/2 Signalweg wird durch eine stark reduzierte TRADD Expression nicht beeinträchtigt. Die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs konnte durch Reduktion der TRADD Expression zwar nur teilweise inhibiert werden, ein Effekt war aber trotzdem sichtbar. Möglicherweise sind sehr geringe Mengen an TRADD-Protein in der Zelle ausreichend, um den NF- κ B Signalweg zu aktivieren.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Reduktion der TRADD Expression in TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen ausreichend ist, um den apoptotischen Signalweg des TNF-R1 zu blockieren. Dafür wurden wie im Folgenden beschrieben Apoptoseexperimente mit TNF α Stimulierung von mit Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen durchgeführt (siehe Abb. 4.21 und 4.22).

Um in HeLa Zellen mit TNF α Stimulierung Apoptose zu induzieren, muss gleichzeitig die Expression NF- κ B-regulierter, antiapoptotischer Gene, wie z.B. cIAPs, XIAP, A20, cFLIP, TRAF1, TRAF2 oder auch Proteine der bcl-2 Familie (Chu *et al.*, 1997; Grumont *et al.*, 1999; Micheau *et al.*, 2001; Shu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998; Zong *et al.*, 1999) unterbunden werden. Eine Möglichkeit, die Expression dieser antiapoptotischen Proteine zu verhindern, ist die Zugabe des Peptidyltransferaseinhibitors Cycloheximid (CHX) zum Kulturmedium der Zellen (Deng *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2003). Cycloheximid (0,5 μ g/ml) wurde in den bezeichneten Ansätzen 1 h vor TNF α Stimulierung zugegeben. Als Kontrolle, dass es

sich bei dem beobachteten Zelltod wirklich um Apoptose handelt, wurden in einem Ansatz Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierte Zellen 1 h vor und während der TNF α Stimulierung mit 2 μ M des Pancaspase-Inhibitors z-VAD-fmk (Biocat) inkubiert.

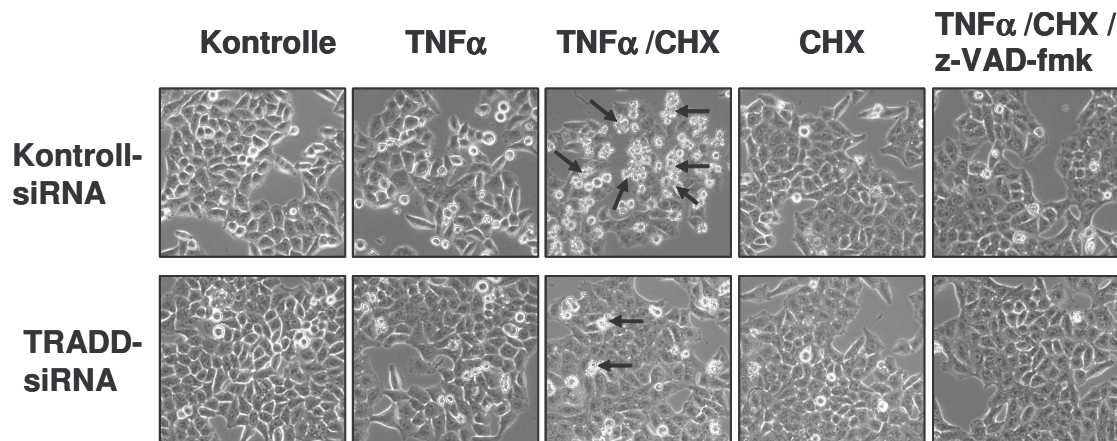


Abb. 4.21: Das apoptotische Potential des TNF-Rezeptors 1 ist abhängig von der TRADD Proteinmenge. Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierte HeLa Zellen wurden für 4 h mit 20 ng/ml humanem TNF α stimuliert. 1 h zuvor wurde in den bezeichneten Ansätzen 0,5 μ g/ml Cycloheximid (CHX) bzw. 2 μ M z-VAD-fmk in das Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden an einem Zeiss Axiovert 200 bei 100-facher Vergrößerung im Durchlicht fotografiert. Die in der Abbildung eingefügten Pfeile markieren einige der apoptotischen Zellen.

Die in Abb. 4.21 gezeigten Ansätze von mit Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen wurden für 4 h mit 20 ng/ml humanem TNF α stimuliert und daraufhin am Mikroskop mit 100-facher Vergrößerung fotografiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die TNF α Stimulierung ohne zusätzliche Zugabe von CHX weder in den Kontrollansätzen noch in TRADD-siRNA transfizierten Zellen Apoptose induzierte. Viele der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen, die zusätzlich mit CHX behandelt wurden, zeigen nach 4 h TNF α Stimulierung einen apoptotischen Phänotyp (ein Teil der apoptotischen Zellen sind mit Pfeilen markiert). In den TRADD-siRNA transfizierten Zellen sind bei gleicher Behandlung kaum apoptotische Zellen zu erkennen. Dies zeigt deutlich, dass man durch Reduktion der TRADD Expression das apoptotische Potential des TNF-R1 fast vollständig inhibieren kann. In den Ansätzen mit z-VAD-fmk sind

kaum apoptotische Zellen zu erkennen, was beweist, dass es sich bei dem durch TNF α Stimulierung induzierten Zelltod um Apoptose handelt.

Zur Quantifizierung der Anzahl apoptotischer Zellen wurden die mit Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen wie oben beschrieben für 4 bzw. 8 h mit 20 ng/ml TNF α stimuliert, anschließend mit Cy5-gekoppelten Annexin V und Propidiumiodid (PI) gefärbt (siehe Abschnitt 3.2.5.) und durchflusszytometrisch quantifiziert. Annexin V erkennt spezifisch Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Koopman *et al.*, 1994; Vermes *et al.*, 1995). Die Exposition von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Plasmamembran von Zellen gilt als das erste und eindeutigste Merkmal von Apoptose. Durch die PI Färbung kann zwischen toten bzw. spätapoptotischen Zellen (AnnexinV+/PI+) und frühapoptotischen Zellen (AnnexinV+/PI-) unterschieden werden (Belloc *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1995).

Wie in Abb. 4.22A zu erkennen ist, waren nach 4 h TNF α Stimulierung und gleichzeitiger CHX Inkubation in den Kontroll-siRNA Ansätzen zwischen 30 bis 35 % AnnexinV+/PI- Zellen detektierbar. Wurde in den Zellen die TRADD Proteinexpression mittels TRADD-siRNA reduziert (siehe 4.22C), so war dieser apoptotische Effekt der TNF α Stimulierung fast vollständig inhibiert (Student's T-Test, *** $p < 0,004$). Dieser induzierte Zelltod ließ sich durch z-VAD-fmk vollständig blocken. Dies beweist eindeutig, dass es sich hier um Apoptose handelt.

Nach 8 h (siehe Abb. 4.22B) waren auch in den nur mit TNF α stimulierten Kontroll-siRNA Ansätzen ca. 32 % apoptotische Zellen im Vergleich zu ca. 18 % in den TRADD-siRNA Ansätzen detektierbar (Student's T-Test, ** $p < 0,02$). Bei TNF α Stimulierung und gleichzeitiger CHX Behandlung nimmt die Anzahl apoptotischer Zellen dramatisch zu. In den Kontroll-siRNA Ansätzen waren zwischen 80 bis 85 % der gemessenen Zellen AnnexinV+/PI-. Interessanterweise war nun auch in den TRADD-siRNA Ansätzen mit TNF α Stimulierung eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen detektierbar (ca. 45 bis 48 %). Dennoch ist ein eindeutiger Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten Zellen erkennbar.

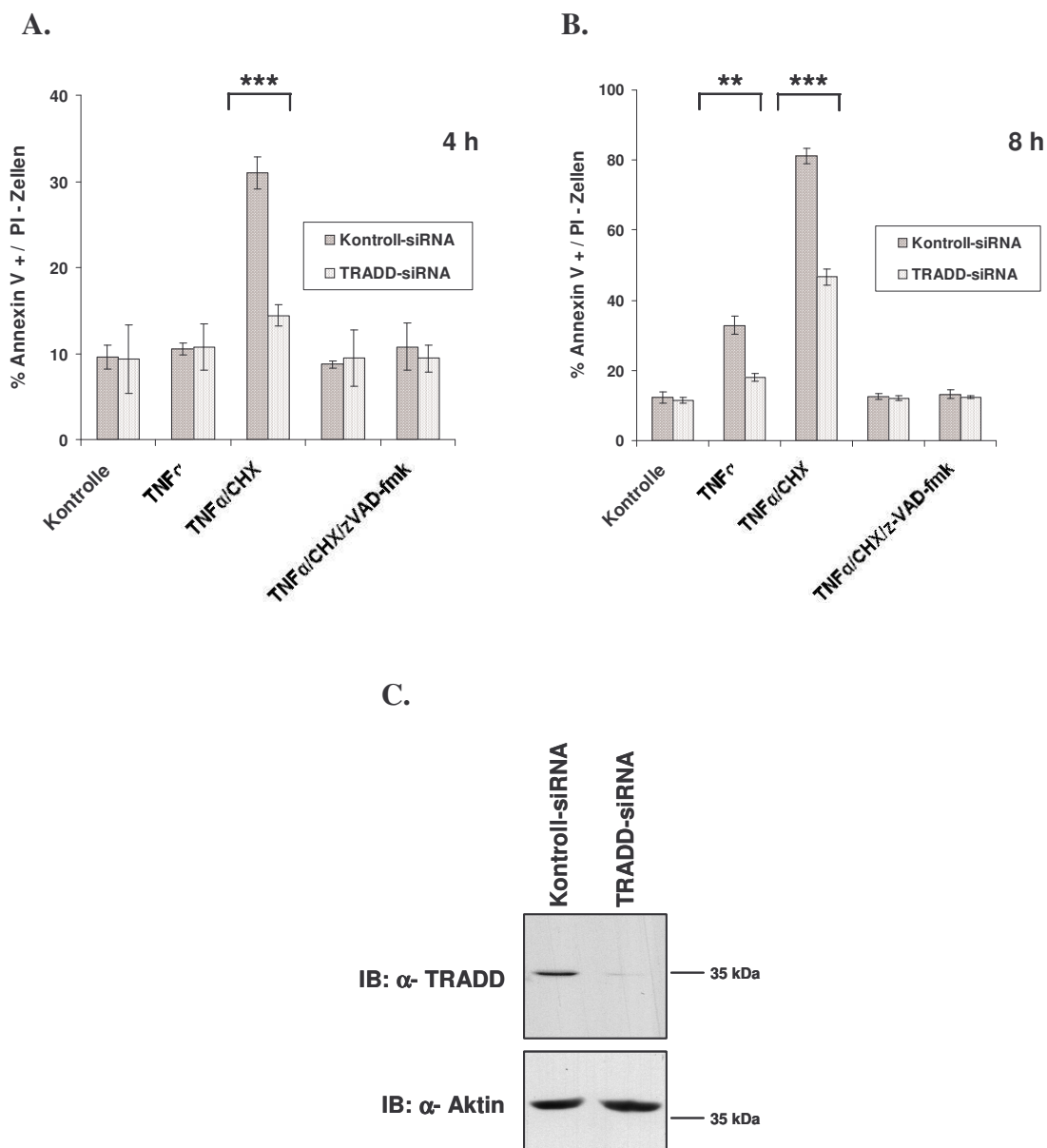


Abb. 4.22: Die TRADD Proteinmenge determiniert das apoptotische Potential von TNF-R1 in HeLa Zellen. Mit Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierte HeLa Zellen wurden für 4 (A) bzw. 8 (B) h in Gegenwart der genannten Inhibitoren mit 20 ng/ml humanem TNF α stimuliert. Nach 4 bzw. 8 h wurden die Zellen mit Cy5 gekoppeltem Annexin V und 0,5 μ g/ml Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Anzahl AnnexinV+/PI- Zellen wurde an einem FACSCalibur (Becton Dickinson) durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Prozentualer Anteil von AnnexinV+/PI- Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen nach 4 h TNF α Stimulierung. (B) Prozentualer Anteil von AnnexinV+/PI- Kontroll- und TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen nach 8 h TNF α Stimulierung. (C) Immunoblot der TRADD- und Aktin-Proteinexpression in Kontroll- und TRADD-siRNA HeLa Zellen aus den Experimenten von Abb. 4.22A und B. Student T-Test, ** $p < 0,02$ und *** $p < 0,004$.

Die zeitlich verzögerte Apoptose in TRADD-siRNA transfizierten Zellen könnte möglicherweise auf TRADD-unabhängige, alternative Signalwege des TNF-R1 zurückzuführen sein, die Apoptose induzieren können. Der Kandidat wäre hier der JNK-Signalweg, der einen alternativen Apoptosesignalweg über Smac/Diablo induzieren kann (Deng *et al.*, 2003) (siehe Abschnitt 1.3.3.). Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass der JNK-Signalweg des TNF-R1 unabhängig von TRADD verläuft, war dieser Signalweg ein potentieller Kandidat für die Induktion von Apoptose durch den TNF-R1 unabhängig von TRADD. In Experimenten, in denen zusätzlich zu den oben beschriebenen Ansätzen der JNK-Inhibitor SP600125 eingesetzt wurde, konnte die Langzeitapoptose in TRADD-siRNA transfizierten Zellen geringfügig, aber erkennbar inhibiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.6. Untersuchungen zur Rolle von TRADD im TNF-Rezeptor 1 Signalkomplex

4.6.1. TRAF2 interagiert unabhängig von TRADD mit dem TNF-Rezeptor 1 Signalkomplex

In Rahmen dieser Doktorarbeit konnte in *TRADD*-defizienten DG75 Zellen (siehe Abb. 4.16) und in HeLa Zellen mit stark reduzierter TRADD Expression (siehe Abb. 4.19 und 4.20) gezeigt werden, dass der TNF-R1 den JNK1/2 Signalweg unabhängig von TRADD aktiviert. In TRAF2-defizienten Mausmodellen wurde demonstriert, dass der JNK1/2 Signalweg von TNF-R1 über TRAF2 verlaufen muss (Natoli *et al.*, 1997; Reinhard *et al.*, 1997). Es stellte sich nun die Frage, welches Molekül die Verbindung vom TNF-R1 zum JNK1/2 Signalweg aufbaut. Nach dem heute gültigen Modell bindet TRAF2 über TRADD an den TNF-R1 (Chen und Goeddel, 2002; Hsu *et al.*, 1996b; Park *et al.*, 2000).

Die im Verlaufe dieser Doktorarbeit erarbeiteten Daten implizieren jedoch, dass TRADD für die Interaktion von TRAF2 mit dem TNF-R1 nicht zwingend benötigt wird. Es musste also geklärt werden, ob TRAF2 tatsächlich ohne TRADD mit dem TNF-R1 Komplex interagieren kann. Aus diesem Grund wurden GST-TNFR1 Kopräzipitationsversuche durchgeführt. Das in diesen Experimenten verwendete GST-

TNFR1 ist ein Fusionsprotein bestehend aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und der intrazellulären Signaldomäne des humanen TNF-Rezeptors 1 (siehe Abschnitt 2.2.). GST und GST-TNFR1 wurden in *E.coli* exprimiert, aufgereinigt und an Glutathion-Sepharose-Kügelchen gekoppelt (siehe Abschnitt 3.5.3.).

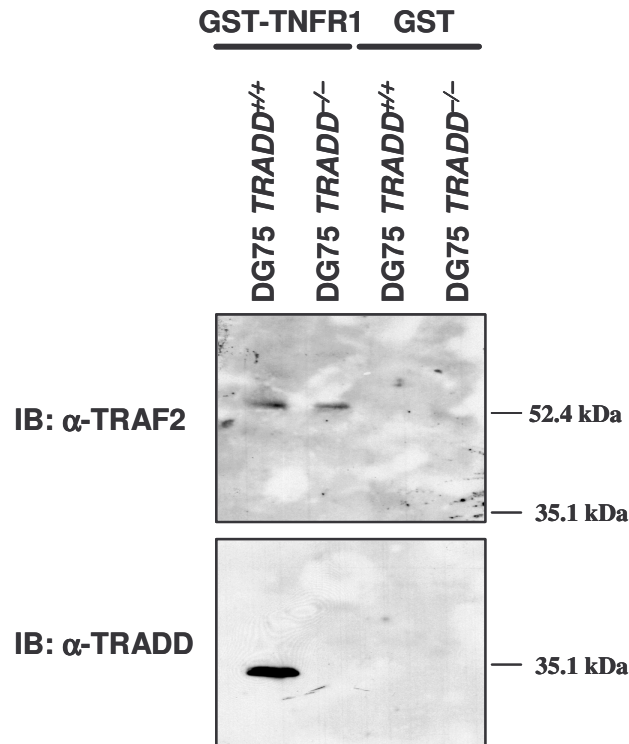


Abb. 4.23: TRAF2 kann mit dem TNF-R1 Signalkomplex in Abwesenheit von TRADD interagieren. Klare Zelllysate aus je 8×10^7 DG75 TRADD^{+/+} bzw. DG75 TRADD^{-/-} Zellen wurden über Nacht mit an Glutathion-Sepharose-Kügelchen immobilisiertem GST bzw. GST-TNFR1 bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden gebundene Proteine präzipitiert und nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden Immunoblot-Analysen mit TRADD- (Transduction Laboratories) und TRAF2- (C-20; Santa Cruz Biotech) spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Immobilisiertes GST bzw. GST-TNFR1 wurde mit klaren Zelllysaten von DG75 TRADD^{+/+} bzw. DG75 TRADD^{-/-} Zellen über Nacht inkubiert und gebundene bzw. interagierende Proteine kopräzipitiert. Die Proteine in den Präzipitaten wurden durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden Immunoblot-Analysen mit TRADD- und TRAF2-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Wie in Abb. 4.23 zu sehen, konnte in den GST Kontrollansätzen weder TRADD noch TRAF2 nachgewiesen werden. Bei der Präzipitation mit dem GST-TNFR1 Fusionsprotein konnten in DG75 TRADD^{+/+} Zelllysaten erwartungsgemäß

TRADD und TRAF2 als mit der TNF-R1 Signaldomäne interagierende Proteine detektiert werden. In DG75 *TRADD*^{-/-} Zelllysaten konnte TRAF2 trotz Abwesenheit von TRADD in den Präzipitaten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis gab einen ersten Hinweis darauf, dass TRAF2 mit dem TNF-R1 Komplex tatsächlich auch ohne TRADD interagieren kann. Um diesen Sachverhalt zu klären, mussten weitere Experimente zur Untersuchung des TNF-R1 Signalkomplexes durchgeführt werden.

4.6.2. TRAF2 wird von TNF-Rezeptor 1 in Abwesenheit von TRADD in „lipid rafts“ rekrutiert

Um mit einer zweiten Methode die Ergebnisse der GST Kopräzipitationsversuche zu verifizieren, wurden „lipid raft“ Rekrutierungsexperimente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der TNF-R1 nach dessen Aktivierung durch TNF α (Cottin *et al.*, 2002; Doan *et al.*, 2004; Legler *et al.*, 2003) und LMP1 konstitutiv (Ardila-Osorio *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2001; Kaykas *et al.*, 2001; Rothenberger *et al.*, 2002) in Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen der Plasmamembran, genannt „lipid rafts“ (Übersichtsartikel: Pierce, 2002; Simons und Toomre, 2000), lokalisiert sind. Diese Plasmamembran-Mikrodomänen dienen als Plattform für den TNF-R1 wie auch für LMP1, um von dort aus aktiv Signale in der Zelle zu setzen. TNF-R1 rekrutiert nach seiner Aktivierung u.a. die Signalmoleküle TRADD und TRAF2 in „lipid rafts“ (Legler *et al.*, 2003).

An dieser Stelle sollte deshalb geklärt werden, ob die TNF-R1 Signaldomäne des LMP1-TNFR1 Fusionsproteins in der Lage ist, in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen das Signalmolekül TRAF2 in „lipid rafts“ zu rekrutieren. Um diese Frage zu klären, wurden die Konstrukte pHEBO-URA (Leervektor), pSV-HA-LMP1(PQT>AAA/Y384G) und pSV-HA-LMP1 als Kontrollen und pSV-HA-LMP1-TNFR1 jeweils zusammen mit pRK5-TRAF2wt in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden „lipid rafts“ isoliert (siehe Abschnitt 3.5.5.). Diese Experimente wurden in Kollaboration mit Cinthia Briseño aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

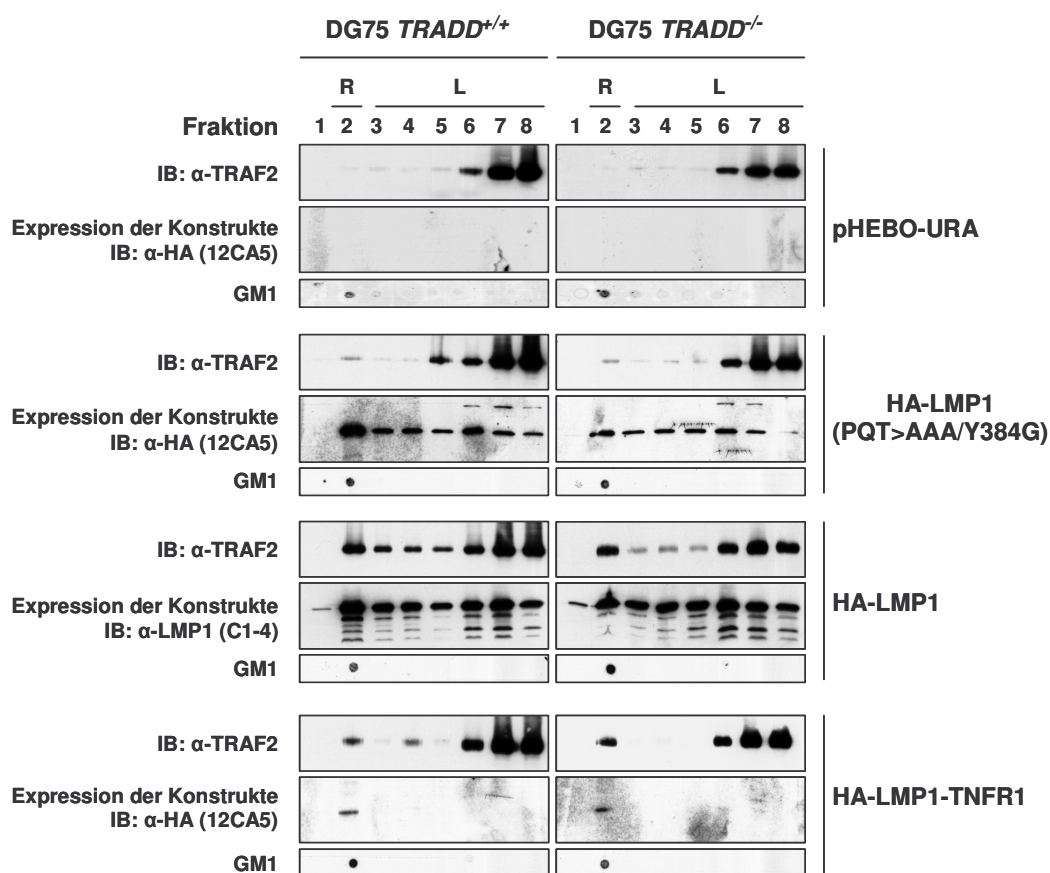


Abb. 4.24: TRAF2 wird von TNF-R1 unabhängig von TRADD in „lipid rafts“ rekrutiert. Es wurden jeweils 5 μ g Expressionsvektoren für die genannten Konstrukte zusammen mit je 3 μ g Expressionsplasmiden für TRAF2 und p35 in je 1×10^7 DG75 *TRADD*^{+/+} oder DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde mit Lachsspermien-DNA auf 15 μ g aufgefüllt. 24 Stunden nach Transfektion wurden, wie in Abschnitt 3.5.5. beschrieben, „lipid rafts“ präpariert. Die Proteine in den acht gewonnenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und es wurden zum Nachweis von TRAF2 in „lipid rafts“ Immunoblot-Analysen mit einem TRAF2-spezifischen Antikörper (C-20) durchgeführt. Zum Nachweis der transfizierten Konstrukte wurden Immunoblot-Analysen mit dem HA-spezifischen Antikörper 12CA5 bzw. dem LMP1-spezifischen Antikörper CS1-4 durchgeführt. GM1 wurde mit der HRP gekoppelten Cholera Toxin Untereinheit B nachgewiesen. R=„Raft“ Fraktion; L=lösliche Fraktionen

24 h nach Transfektion der oben genannten Konstrukte in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen wurden die Zellen in einem speziellen TXNE-Lysepuffer lysiert, und die Zelllysate mittels Gradienten-Ultrazentrifugation in acht Fraktionen aufgeteilt (siehe Abschnitt 3.5.5.). In Fraktion 2 sind die mit „lipid rafts“ (R) assoziierten Proteine und in den Fraktionen 3 bis 8 lösliche (L), d.h. nicht mit „lipid rafts“ assoziierte Proteine

enthalten (siehe Abb. 4.24). Der Leervektor pHEBO-URA wurde als Negativkontrolle transfiziert. Die Doppelmutante LMP1(PQT>AAA/Y384G) kann keine TRAFs oder TRADD mehr binden (Kieser et al., 1999) und dient als Kontrolle für die LMP1 Transmembrandomänen, die auch in LMP1-TNFR1 enthalten sind. Der Expressionsvektor für LMP1 wurde als Positivkontrolle transfiziert, da bekannt ist, dass LMP1 unter anderem TRAF2 in „*lipid rafts*“ rekrutieren kann (Rothenberger et al., 2002).

Betrachtet man in Abb. 4.24 die Fraktionen 2 in den DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen, so sind in dem pHEBO-URA und dem LMP1(PQT>AAA/Y384G) Ansatz sehr schwache TRAF2 Signale zu erkennen. Dieser Hintergrund lässt sich dadurch erklären, dass TRAF2 konstitutiv in „*lipid rafts*“ mit Caveolin-1 assoziiert ist (Cao et al., 2002). LMP1 kann TRAF2 in großen Mengen in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen in „*lipid rafts*“ rekrutieren. Auch LMP1-TNFR1 rekrutiert TRAF2 unabhängig von TRADD, in gleichen Mengen in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen in die „*lipid rafts*“.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass TRAF2 ohne TRADD mit dem TNF-R1 Komplex interagieren und damit wahrscheinlich auch Signale des Rezeptors weiterleiten kann. Diese Erkenntnisse unterstützen die Ergebnisse der GST-TNFR1 Kopräzipitationsexperimente und könnten die TNF-R1 induzierte JNK1/2 Aktivierung in Abwesenheit von TRADD erklären. Wie die Interaktion von TRAF2 mit dem TNF-R1 verläuft, ist an dieser Stelle noch nicht geklärt und bedarf weiterer intensiver Studien des TNF-R1 Komplexes. Da TRAF2 aber nicht direkt mit dem TNF-R1 interagieren kann (Rothe et al., 1995), muss ein anderes, eventuell noch unbekanntes Molekül diese Interaktion vermitteln.

5. Diskussion

Das Adapterprotein TRADD spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 und des viralen LMP1. Im Gegensatz zur Situation am TNF-R1 bindet TRADD an LMP1 nicht über seine Todesdomäne, sondern über seinen N-terminalen Bereich (siehe Einleitung). Betrachtet man die Zusammensetzung der TNF-R1 und LMP1 Signalkomplexe und der von diesen beiden Membranproteinen aktivierten Signalwege, sind ganz offensichtlich viele Gemeinsamkeiten zu erkennen. Dennoch ist die biologische Funktion dieser beiden Membranproteine zum Teil sehr unterschiedlich. Während der TNF-R1 maßgeblich an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt ist (Mannel und Echtenacher, 2000) und in bestimmten Situationen die Zelle in den programmierten Zelltod treiben kann (Übersichtsartikel: Aggarwal, 2003; Chen und Goeddel, 2002; Wajant *et al.*, 2003), ist LMP1 essentiell an der Immortalisierung von B-Lymphozyten durch das Epstein-Barr Virus beteiligt. LMP1 ist ein virales Onkogen, das die Expression mitogener Faktoren induziert und gleichzeitig Apoptose und Seneszenz inhibiert (siehe Abschnitt 1.4.1.). Die Aufklärung der Signaltransduktion dieser beiden Membranproteine auf molekularer Ebene steht seit vielen Jahren im Zentrum intensiver Forschung. Trotz größter Anstrengungen in der Untersuchung TNF-R1- und LMP1-induzierter Signalwege und intensiver klinischer Erforschung TNF-R1 und LMP1 bzw. EBV-assoziiierter Erkrankungen des Menschen, ist das Verständnis der molekularen Zusammenhänge in diesen beiden komplexen Systemen immer noch sehr unvollständig.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 und des viralen LMP1 zu klären. Da das einzig wirklich zuverlässige System zur Klärung der TRADD Proteinfunktion in der TNF-R1 bzw. LMP1 Signaltransduktion ein *TRADD* „knockout“ Zellsystem ist, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals eine *TRADD*-defiziente humane B-Zelllinie hergestellt, und in dieser Zelllinie die Signaltransduktion des TNF-R1 und LMP1 untersucht.

5.1. Die Herstellung einer TRADD-defizienten humanen B-Zelllinie

Ein wesentlicher Teil dieser Doktorarbeit bestand in der Herstellung einer *TRADD*^{-/-} humanen B-Zelllinie (siehe Abschnitt 4.3.). Obwohl heutzutage das Gentergating in

embryonalen Stammzellen der Maus (ES-Zellen) und die darauf folgende Herstellung von „*knockout*“ Mäusen eine etablierte Methode ist (Übersichtsartikel: Capecchi, 1989b; Muller, 1999), haben wir uns für einen somatischen *TRADD* „*knockout*“ in einer etablierten humanen B-Zelllinie entschieden. Die humane B-Zelle stellt ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Signaltransduktion von TNF-R1 bzw. LMP1 dar. Durch die leichte Kultivierbarkeit der B-Zellen in Zellkultur war außerdem gewährleistet, dass immer eine ausreichend große Anzahl von Zellen für biochemische Experimente verfügbar war.

In der Vergangenheit wurde schon versucht ein „*knockout*“ Mausmodell für *TRADD* zu etablieren, was aber an der frühen Letalität der *TRADD*^{-/-} Embryonen scheiterte (Mitteilung von D.V. Goeddel). Diese Embryonen starben bereits vor dem Tag 3 der Embryonalentwicklung, so dass aus diesen Embryonen keine *TRADD*^{-/-} Zelllinie etabliert werden konnte. Dies zeigt deutlich, dass *TRADD* essentiell an der Embryonalentwicklung der Mäuse beteiligt ist. Da *TRADD* in der Regulation apoptotischer Signalwege von einigen Todesrezeptoren (z.B. TNF-R1, DR3, DR6) involviert ist (Übersichtsartikel: Aggarwal, 2003), wäre es möglich, dass *TRADD*^{-/-} Embryonen einen Defekt in der Regulation von Apoptose in der Gewebe- und Organentwicklung haben. Allerdings ist bis heute noch nicht geklärt, welche Rolle *TRADD* in der Embryogenese der Maus spielt. In unserem Ansatz war anzunehmen, dass eine etablierte, schon differenzierte B-Zelllinie auch ohne *TRADD* in Kultur überleben kann und somit ein Erfolg bei der Herstellung einer *TRADD*^{-/-} B-Zelllinie gewährleistet war. Nach dem heutigen Wissensstand ist *TRADD* an keinen lebensnotwendigen Vorgängen des Zellmetabolismus in Zellkulturzellen beteiligt. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da die homozygot *TRADD*-defizienten DG75 Zellen vor der zweiten Cre-Rekombination das gleiche Wachstumsverhalten aufzeigten wie DG75wt Zellen. Die Beobachtung, dass DG75 *TRADD*^{-/-} Klone nach der zweiten Cre-Rekombination bei geringer Zelldichte langsamer wachsen als DG75wt bzw. DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen vor Cre-Rekombination, kann nicht auf das Fehlen von *TRADD* zurückgeführt werden, sondern ist wahrscheinlich auf klonale Effekte zurückzuführen (siehe Abschnitt 4.3.5.).

Um für dieses Vorhaben eine geeignete Kandidatenzelllinie zu finden, wurden einige gängige Zelllinien auf ihren *TRADD* Genotyp mittels FISH-Analyse untersucht (siehe

Abschnitt 4.1.). Es wurden drei humane B-Zelllinien (DG75, BJAB, BL2) als Kandidatenzelllinien für einen somatischen *TRADD* „knockout“ ausgewählt. In diesen drei B-Zelllinien wurden, wie in Abschnitt 4.3. beschrieben, parallel *TRADD*-Gentargetingexperimente durchgeführt.

In den Zelllinien BJAB und BL2 konnten aus den in Abschnitt 4.3.4. genannten Gründen keine heterozygoten *TRADD*^{+/-} Klone generiert werden. Es konnten zwar GFP-exprimierende und Hyg-resistente BJAB Klone selektiert werden, die aber alle nicht homolog rekombiniert waren. Es ist allgemein von somatischen Säugetierzellen bekannt, dass in ihnen die Frequenz der nicht-homologen Rekombination um Potenzen höher ist als die Frequenz der homologen Rekombination (Übersichtsartikel: Sedivy und Dutriaux, 1999). Aus diesem Grund wurden bis heute nur selten somatische Säugetierzellen für ein Gentargeting verwendet. Die hohe Frequenz der homologen Rekombination in Maus ES-Zellen (Gardner und Brook, 1997) oder in der Hühnchenzelllinie DT40 (Buerstedde und Takeda, 1991) wird auf die hohe Expression von Proteinen der RAD Familie (z.B. RAD51, RAD52, RAD54) zurückgeführt. RAD Proteine sind unter anderem an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt, bei denen die homologe Rekombination eine wichtige Rolle spielt. Aus diesem Grunde wurde hier versucht, zusätzlich zur Transfektion der Gentargeting-Vektoren in BJAB Zellen das RAD54B Protein zu exprimieren. RAD54B soll die Frequenz der homologen Rekombination in Säugetierzellen deutlich erhöhen (Miyagawa *et al.*, 2002). Aber auch in diesen Ansätzen konnten keine *TRADD*^{+/-} BJAB Klone generiert werden. Die Expression von RAD54B in BJAB Zellen führte zum Tod der transfizierten Zellen, so dass kein einziger GFP-exprimierender Klon auswuchs.

Schließlich konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit zum ersten Mal eine *TRADD*-defiziente B-Zelllinie (DG75 *TRADD*^{-/-}) etabliert werden (siehe Abschnitt 4.3.). Die Frequenz der homologen Rekombination in DG75 Zellen war für eine etablierte humane Zelllinie relativ hoch (ca. ein homolog rekombinierter Klon aus 50 selektierten und im Southern-Blot getesteten Klonen). Warum die homologe Rekombination in DG75 Zellen funktioniert und in BJAB bzw. BL2 nicht funktioniert hat, ist bis heute unklar. Ein Grund dafür könnte der hohe Expressionslevel des RAD51 Proteins in DG75 Zellen sein (persönliche Mitteilung Maren Mireau).

Durch die Verwendung von modifizierten loxP Sequenzen (loxP66/71) (Albert *et al.*, 1995) war es möglich, nach jedem einzelnen *TRADD*-Gentargetingschritt die beiden Selektionsmarker Hyg und GFP mittels Cre-Rekombinasereaktion aus dem Genom der DG75 Zellen zu entfernen. Durch die Besonderheit der modifizierten loxP Sequenzen bleibt keine funktionale loxP Sequenz im Genom der Zellen zurück, wie es bei den klassischen loxP Sequenzen der Fall wäre. Dies hat den Vorteil, dass man in diesen Zellen sowohl die gleichen Selektionsmarker als auch das Cre/loxP-System problemlos erneut für weitere genetische Manipulationen verwenden kann.

Nachdem heute für nahezu alle Signalmoleküle der TNF-R1 bzw. LMP1 Signaltransduktion ein „knockout“ Modell dieser Signalmoleküle existiert, war es nun hier zum ersten Mal gelungen, ein *TRADD*^{-/-} Zellsystem zu etablieren, in dem die Signaltransduktion des zellulären TNF-R1 und des viralen Onkogens LMP1 in Abwesenheit von TRADD studiert werden konnte.

5.2. Die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des TNF-Rezeptors 1

Ein wichtiges Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung der Rolle von TRADD in der TNF-R1 Signaltransduktion in den hergestellten DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen. Da sich DG75 Zellen nur unzureichend mit TNF α stimulieren ließen, wurde zur Analyse der TNF-R1 Signalwege in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen hauptsächlich das chimäre Fusionsprotein LMP1-TNFR1 verwendet. Durch die Fusion der TNF-R1 Signaldomäne mit den Transmembrandomänen des LMP1 hat dieses Molekül die Eigenschaft, nach transienter Expression konstitutiv-aktiv TNF-R1 Signaltransduktion in der Zelle zu induzieren (Dudziak *et al.*, 2003; Schneider und Kieser, 2004). Mischsignale von TNF-R1 und TNF-R2 können dadurch zudem ausgeschlossen werden.

In NF- κ B Luziferase-Reportergen Experimenten und in IKK β Immunkomplex-Kinaseversuchen konnte durch transiente Expression von LMP1-TNFR1 gezeigt werden, dass TRADD für die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs durch die Signaldomäne des TNF-R1 notwendig ist (siehe Abb. 4.13 und 4.14). Diese Resultate konnten durch TNF α Stimulierung der DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen

bestätigt werden (siehe Abb. 4.15). Zum ersten Mal konnte in einem *TRADD*-defizienten Zellsystem das heute gültige Modell der TNF-R1-induzierten NF-κB Aktivierung direkt bestätigt werden (Chen und Goeddel, 2002). Die Tatsache, dass die Überexpression von TRADD bzw. der Todesdomäne von TRADD in HEK293 Zellen zur Aktivierung von NF-κB führte (Hsu *et al.*, 1995), könnte durch eine Oligomerisierung der überexprimierten Proteine mit endogenem Wildtyp TRADD oder anderen Signalmediatoren, wie z.B. RIP1 und/oder TRAF2/5, erklärt werden. Die transiente Expression von TRADD bzw. TRADD Mutanten führte hier nicht zur Erhöhung der NF-κB Aktivität in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen. Dies könnte jedoch durch die schon sehr hohe endogene NF-κB Aktivität in DG75 Zellen begründet sein.

Bei der Charakterisierung des Signalwegs von TNF-R1 zu JNK1 in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen wurde unerwartet festgestellt, dass die Aktivierung von JNK1 durch die Signaldomäne des TNF-R1 unabhängig von TRADD ist (siehe Abb. 4.16). Dieses Ergebnis stellt die bisherige Vorstellung der TNF-R1 vermittelten JNK1 Aktivierung stark in Frage. Es würde allerdings die Feststellung erklären, dass TRADD bei Überexpression, im Gegensatz zu NF-κB oder Apoptose, kein JNK1 aktiviert (Liu *et al.*, 1996). Experimente, bei denen die TNFα-induzierte JNK1 Aktivierung partiell durch die dominant-negative TRADD(1-194) Mutante inhibiert werden konnte (Kieser *et al.*, 1999), müssen heute in Anbetracht der neuen Ergebnisse dieser Arbeit etwas anders interpretiert werden. Da die TRAF2-TRADD Interaktion stärker als die von TRADD mit TNF-R1 ist (Park *et al.*, 2000), könnte es sein, dass die Überexpression dieser TRADD Mutante zu einem Abfangen von endogenem TRAF2 und somit indirekt zur Inhibition der TNF-R1-induzierten JNK1 Aktivierung führt. Dieses Beispiel zeigt, dass Ergebnisse die durch Überexpression von dominant-negativen Mutanten gewonnen werden, mit Vorsicht interpretiert werden müssen und stellt in besonderem Maße die Qualität eines genetischen „*knockout*“ Modellsystems heraus.

Es stellte sich jetzt die Frage, wie der TRAF2-abhängige JNK1 Signalweg durch TNF-R1 ohne TRADD aktiviert werden kann (siehe Modell der TNF-R1 Signaltransduktion in Abb. 1.4). TRAF2 ist essentiell für die TNF-R1-induzierte JNK1 Aktivierung (Natoli *et al.*, 1997; Reinhard *et al.*, 1997). Eine Erklärung hierfür erbrachten GST-TNFR1 Kopräzipitationsversuche und „*lipid raft*“ Rekrutierungsexperimente, die im Rahmen dieser Doktorarbeit in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen durchgeführt

wurden (siehe Abschnitt 4.6.). In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass TRAF2 unabhängig von TRADD mit der TNF-R1 Signaldomäne interagieren kann (siehe Abb. 4.23) und ohne TRADD durch die TNF-R1 Signaldomäne in „*lipid rafts*“ rekrutiert wird (siehe Abb. 4.24). TRAF2 kann allerdings nicht direkt mit der Signaldomäne des TNF-R1 interagieren. Dies wurde in Koimmunpräzipitationsexperimenten und in „*yeast-two-hybrid-screens*“ eindeutig nachgewiesen (Hsu *et al.*, 1996b; Rothe *et al.*, 1995). Da eine vollständige Todesdomäne des TNF-R1 für die JNK Aktivierung notwendig ist (Adam-Klages *et al.*, 1996), muss ein anderes Adapterprotein, welches mit der Todesdomäne des TNF-R1 interagiert, die Verbindung zwischen dem TNF-R1 und TRAF2 herstellen. Zwei potentielle Kandidaten hierfür wären RIP1 und MADD (siehe Abschnitt 1.3.3.).

Für RIP1 wurde gezeigt, dass es direkt mit der Todesdomäne des TNF-R1 interagieren kann (Hsu *et al.*, 1996a; Stanger *et al.*, 1995). Da die Interaktion zwischen RIP1 und dem TNF-R1 allerdings schwächer als zwischen RIP1 und TRADD ist, wurde postuliert, dass RIP1 über TRADD an den TNF-R1 rekrutiert wird. Bis heute wurde darauf die direkte RIP1–TNF-R1 Interaktion und deren mögliche funktionelle Konsequenzen in der Literatur völlig ignoriert. Die Rolle von RIP1 im TNF-R1/JNK1 Signalweg wird zudem sehr kontrovers diskutiert. In einer älteren Arbeit wurde in *RIP1*^{-/-} Mausfibroblasten gezeigt, dass RIP1 nicht essentiell an der Aktivierung von JNK1 durch den TNF-R1 beteiligt ist (Kelliher *et al.*, 1998). Dagegen wurde in zwei neueren Arbeiten in *RIP1*^{-/-} Mausfibroblasten eine RIP1-abhängige JNK1 Aktivierung durch den TNF-R1 demonstriert (Devin *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004). Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung von RIP1 im JNK1 Signalweg ist die Beobachtung, dass die Überexpression von RIP1 zur Aktivierung von JNK1 führt (Liu *et al.*, 1996). An dieser Stelle sind also noch einige Fragen offen, die in Zukunft adressiert werden.

Ein zweites Protein, das direkt mit der Todesdomäne von TNF-R1 interagieren kann, ist das Todesdomänenprotein MADD (siehe Abb. 1.1.). Diese Interaktion wurde in einem „*yeast-two-hybrid-screen*“ demonstriert (Schievella *et al.*, 1997). MADD besitzt ebenfalls eine carboxyterminale Todesdomäne, die essentiell für die Interaktion mit der Todesdomäne des TNF-R1 ist. Da MADD bei Überexpression den ERK und JNK Signalweg aktiviert, wurde eine Rolle von MADD in der TNF-R1-abhängigen JNK Aktivierung bereits diskutiert. Dies konnte allerdings bis heute experimentell nicht

verifiziert werden. Ob MADD der Mediator zwischen dem TNF-R1 und TRAF2 ist und somit für die TNF-R1-induzierte JNK1 Aktivierung verantwortlich ist, soll in Zukunft untersucht werden.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit bewiesen werden, dass TRADD für die TNF-R1-induzierte Apoptose notwendig ist. Da sich in DG75 Zellen durch TNF α Stimulierung keine Apoptose induzieren ließ, wurde die Untersuchung des apoptotischen TNF-R1 Signalwegs ebenfalls durch die transiente Expression des chimären LMP1-TNFR1 Fusionsproteins durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.3.). Zur Quantifizierung des Zelltods nach transienter Expression des LMP1-TNFR1 in DG75 Zellen musste zuvor eine Methode, die den Anforderungen dieser Fragestellung gerecht wurde, entwickelt werden (siehe Abschnitt 4.2.). Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung von Zelltod nach transienter Transfektion apoptotischer Gene in B- und T-Lymphozyten (Schneider und Kieser, 2004). Um die Rolle von TRADD in der LMP1-TNFR1-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurde diese Methode angewendet (siehe Abb. 4.17). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen deutlich, dass TRADD essentiell für die TNF-R1-vermittelte Apoptose ist und stützen damit das bisherige Modell der TNF-R1-induzierten Apoptose (Übersichtsartikel: Chen und Goeddel, 2002).

Die in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen gewonnen Erkenntnisse über die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion des TNF-R1 konnten zusätzlich in TRADD „*knockdown*“ HeLa Zellen im endogenen TNF-R1 Kontext verifiziert werden (siehe Abschnitt 4.5.). In HeLa Zellen wurde die TRADD Proteinexpression durch TRADD-spezifische siRNA Oligonukleotide stark reduziert. Durch TNF α Stimulationsexperimente konnte gezeigt werden, dass die TNF-R1-vermittelte Aktivierung des JNK1/2 Signalwegs nicht durch eine reduzierte TRADD Expression in den Zellen beeinträchtigt wird (siehe Abb. 4.19). Die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs konnte in diesen Experimenten nur leicht reduziert werden. Offensichtlich ist die geringere, in den Zellen verbleibende TRADD Proteinmenge ausreichend, um diesen Signalweg nach TNF α Stimulierung zu induzieren. Bei längerer TNF α Stimulierung (über 20 min) kommt es in HeLa TRADD „*knockdown*“ Zellen zu einer verlängerten Aktivierung des JNK1/2 Signalwegs (siehe Abb. 4.20). Dies könnte auf eine reduzierte Transkription von NF- κ B-regulierten Genen, wie z.B. Gadd45 β oder XIAP, zurückzuführen sein. Die NF- κ B-abhängige

Expression dieser Proteine führt zu einer negativen Regulation des TNF-R1/JNK1/2 Signalwegs (Papa *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2001). Dies würde bedeuten, dass durch die reduzierte TRADD Proteinexpression das Gleichgewicht in der komplexen Signalregulation des TNF-R1 zugunsten des JNK1/2 Signalwegs verschoben ist. Welche biologischen Konsequenzen eine solche Verschiebung des Gleichgewichts am TNF-R1 haben kann, ist noch nicht vollständig verstanden. Erste Hinweise auf solche Konsequenzen ergab jedoch die Betrachtung des TNF-R1 Apoptose-Signalwegs (siehe unten).

In Apoptoseexperimenten, die mit TNF α Stimulierung in HeLa TRADD „*knockdown*“ Zellen durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 4.5.3.), konnte ein klarer Zusammenhang zwischen dem apoptotischen Potential des TNF-R1 und der TRADD Proteinmenge in den Zellen aufgezeigt werden (siehe Abb. 4.21 und 4.22). Bei stark reduzierter TRADD Proteinmenge gehen HeLa Zellen nach TNF α Stimulierung deutlich weniger und langsamer in Apoptose (siehe Abb. 4.22A und B). Dennoch konnte die Apoptose nach längerer TNF α Stimulierung nicht vollständig durch einen TRADD „*knockdown*“ geblockt werden (siehe Abb. 4.22B). Dies könnte daran liegen, dass die geringe TRADD Proteinmenge in den Zellen ausreichend für eine zeitlich verzögerte und abgeschwächte Apoptose nach TNF α Stimulierung ist. Diese Beobachtung würde den Daten von Aggarwal und Kollegen entsprechen, die eine Korrelation zwischen der TNF-R1 bzw. TRADD Proteinmenge und dem apoptotischen Potential von TNF α in Lymphozyten von jungen und älteren Menschen aufzeigen konnten (Aggarwal *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wird deutlich, dass Lymphozyten von älteren Menschen eine höhere TNF-R1 und TRADD Proteinexpression haben und dadurch verstärkt nach TNF α Stimulierung in Apoptose gehen.

Eine zweite Möglichkeit, die diese Beobachtung erklären könnte, wäre die Beteiligung des JNK1/2 Signalwegs an der Induktion von Apoptose. Die Beteiligung des JNK-Signalwegs an der TNF-R1-induzierten Apoptose wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert (Deng *et al.*, 2003; Karin *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996; Varfolomeev und Ashkenazi, 2004). Trotzdem konnte in einer neueren Arbeit von Deng und Kollegen ein klarer Zusammenhang zwischen dem TNF-R1-induzierten JNK-Signalweg und der von TNF-R1-induzierten Apoptose aufgezeigt werden (Deng *et al.*, 2003). Da im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden konnte, dass der JNK1/2 Signalweg des TNF-R1

unabhängig von TRADD verläuft, machte es Sinn, sich diesen Zusammenhang genauer anzusehen. Durch gleichzeitige TNF α Stimulierung und Inkubation der mit TRADD-siRNA transfizierten HeLa Zellen mit dem JNK-Inhibitor SP600125 konnte die langsamer verlaufende Apoptose in diesen Zellen etwas, jedoch nicht vollständig, geblockt werden (Daten nicht gezeigt). Da die Effekte des JNK-Inhibitors in den einzelnen Experimenten sehr heterogen waren, kann zum jetzigen Zeitpunkt keine endgültige Aussage über einen Zusammenhang des JNK-Signalwegs mit einer möglichen Langzeitapoptose verursacht durch den TNF-R1, gemacht werden. Diese Experimente gaben allerdings einen ersten Hinweis darauf, dass in einer TRADD „*knockdown*“ Situation der verlängert induzierte JNK1/2 Signalweg einen Einfluss auf die TNF α -induzierte Apoptose haben kann. In DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen konnte jedoch nach 24 h keine Apoptose durch TNF-R1 induziert werden. Dies würde bedeuten, dass eine mögliche Beteiligung des JNK1/2 Signalwegs an der TNF-R1-induzierten Apoptose doch indirekt über einen TRADD-abhängigen Mechanismus verlaufen würde. Dies wurde bereits von *Deng* und Kollegen diskutiert (*Deng et al.*, 2003). Es bedarf an dieser Stelle weiterer Untersuchungen, um diesen Sachverhalt vollständig zu klären.

Betrachtet man die neu gewonnen Erkenntnisse dieser Arbeit, ergibt sich ein völlig neues Bild der TNF-R1 Signaltransduktion (siehe Abb. 5.1). Es ist deutlich geworden, dass TRADD nicht das zentrale Molekül zum Aufbau eines TNF-R1 Signalkomplexes sein kann. Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit sprechen für eine Dualität am TNF-R1, durch die TRADD-abhängige (NF- κ B und Apoptose) und TRADD-unabhängige (JNK1/2) Signalwege induziert werden.

5.3. Die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion von LMP1

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde in den hergestellten DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen auch die Signaltransduktion von LMP1 untersucht. Hierbei wurde die LMP1-induzierte Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs und die Aktivierung von JNK1 studiert.

Der klassische NF- κ B Signalweg wird ausschließlich von der CTAR2 Domäne des LMP1 Moleküls, an die TRADD über seinen N-Terminus bindet, aktiviert (*Kieser et al.*, 1999; *Luftig et al.*, 2003). Da in der Vergangenheit ein *TRADD*-defizientes Zellsystem fehlte, konnte die Rolle von TRADD in dem LMP1-induzierten klassischen

NF- κ B Signalweg nur durch dominant-negative TRADD Mutanten untersucht werden (Kieser *et al.*, 1999). Hierbei zeigte sich, dass sich die LMP1-induzierte NF- κ B Aktivierung durch Koexpression von TRADD(1-194) blockieren lässt, was zu dem Schluss führte, dass TRADD essentiell in diesem Signalweg sein muss. Um die gesamte NF- κ B Aktivierung durch LMP1 zu erfassen, wurden im Rahmen dieser Arbeit als erstes in DG75 TRADD^{+/+} und DG75 TRADD^{-/-} Zellen NF- κ B Luziferasereporter-Genversuche mit transient exprimiertem LMP1 durchgeführt (siehe Abb. 4.13). Es konnte bei diesen Experimenten kein Unterschied in der Aktivierung von NF- κ B in den beiden Zelllinien festgestellt werden. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte darin liegen, dass LMP1 sowohl über seine CTAR1 als auch über CTAR2 den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren kann und damit sich diese beiden Signalwege überlagern. Obwohl gezeigt wurde, dass etwa 70 % der gesamten NF- κ B Aktivierung durch CTAR2 und nur etwa 30 % von CTAR1 induziert werden (Huen *et al.*, 1995; Mitchell und Sugden, 1995), konnte dies in diesen Experimenten nicht differenziert werden. Möglicherweise lässt die hohe endogene NF- κ B Aktivität in DG75 Zellen keine Differenzierung der verschiedenen NF- κ B Signalwege in diesem experimentellen Ansatz zu.

Da die NF- κ B Luziferasereporter-Genversuche keine Aussage über die Rolle von TRADD in diesem Signalweg zuließen, wurden zusätzlich, um spezifisch die CTAR2-induzierte NF- κ B Aktivierung zu untersuchen, *in vitro* IKK β -Immunkomplex-Kinaseversuche durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.1.). Es wurde für diese Experimente IKK β als Zielmolekül gewählt, da in neueren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die NF- κ B Aktivierung von der CTAR2 spezifisch über IKK β verläuft (Luftig *et al.*, 2003). IKK α spielt in diesem Signalweg nur eine untergeordnete Rolle (siehe Abschnitt 1.4.3.). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten IKK β -Immunkomplex-Kinaseversuche zeigen deutlich, dass TRADD für die LMP1-induzierte Aktivierung der IKK β notwendig ist (siehe Abb. 4.14). Damit konnte zum ersten Mal bewiesen werden, dass TRADD tatsächlich an der Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs durch LMP1 beteiligt ist. Dies bestätigt die bisherige Vorstellung der CTAR2-vermittelten NF- κ B Aktivierung (siehe Modell der LMP1 Signaltransduktion in Abb. 1.6). Die Beobachtung, dass dieser Signalweg durch die TRADD(1-194) Mutante geblockt werden kann, lässt vermuten, dass der N-Terminus von TRADD zwar für die Bindung an LMP1 benötigt wird, aber der C-terminale Teil von TRADD mit seiner

Todesdomäne notwendig für die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs ist. Welcher Signalmediator die Verbindung vom an LMP1 gebundenen TRADD hin zu TRAF6/IRAK-1 und damit zu IKK β herstellt, ist noch nicht geklärt. Es konnte bis heute noch keine direkte Bindung eines Signalmoleküls an das an LMP1 gebundene TRADD nachgewiesen werden.

Ein zweiter interessanter Signalweg, der exklusiv von CTAR2 aktiviert wird, ist der JNK1 Signalweg. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die JNK-Aktivierungsregion (As 379 bis 384) von LMP1 mit der TRADD-Binderegion (As 384 bis 386) von LMP1 überlappt (Izumi und Kieff, 1997; Kieser *et al.*, 1999; Kieser *et al.*, 1997). Es stellte sich nun die Frage, ob TRADD an der Aktivierung von JNK1 durch LMP1 beteiligt ist. Um diese Frage zu klären wurden in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen *in vitro* JNK1-Immunkomplex-Kinaseexperimente mit transient exprimiertem LMP1 durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.2.). Bei diesen Experimenten wurde deutlich, dass die JNK1 Aktivierung durch LMP1 unabhängig von TRADD verläuft. Dieses Ergebnis erklärt die Feststellung, dass dominant-negatives TRADD(1-194) nicht den LMP1/JNK1 Signalweg, wie es im NF- κ B Signalweg der Fall ist, blockiert (Kieser *et al.*, 1999). Obwohl bei LMP1 Mutanten, die in den As 384 bzw. 384 und 385 mutiert wurden, sowohl die Bindung von TRADD an LMP1 als auch die JNK Aktivierung verloren geht (Izumi und Kieff, 1997; Kieser *et al.*, 1999), spielt TRADD keine Rolle in diesem Signalweg. Es stellt sich nun die Frage, welches Signalmolekül die Verbindung von LMP1 zum JNK1 Signalweg aufbaut. In neueren Arbeiten wurde berichtet, dass nicht TRAF2 sondern TRAF3 und TRAF6 essentiell für diesen Signalweg sind (Kieser *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004). Bis heute konnte jedoch noch keine direkte Interaktion von TRAF3 bzw. TRAF6 mit der CTAR2 Domäne von LMP1 nachgewiesen werden. Da CTAR2 kein Konsensusmotif zur Bindung von TRAF6 (QxPxExxE/F) besitzt (siehe Abschnitt 1.4.3.), ist eine direkte Bindung von TRAF6 an CTAR2 sehr unwahrscheinlich. Es existiert allerdings ein PxQxS-Motif (As 379 bis 383) in CTAR2, welches dem TRAF-Bindemotif PxQxT sehr ähnlich ist (siehe Abschnitt 1.4.3.) und eine direkte Bindung von TRAF3 an CTAR2 vermitteln könnte. Die Klärung der Frage, welches Molekül die direkte Verbindung zwischen LMP1 und dem JNK1 Signalweg aufbaut, wird Bestandteil zukünftiger Forschung sein, bei der die DG75 *TRADD*^{-/-} Zelllinie von großem Nutzen sein wird.

In Zukunft soll außerdem die Rolle von TRADD bei der Aktivierung des p38 MAPK und des JAK-STAT Signalwegs durch LMP1 in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen untersucht werden. Da eine Interaktion von TRADD mit STAT1 gezeigt werden konnte (Wang *et al.*, 2000; Wesemann *et al.*, 2004), ist es auch vorstellbar, dass die Bindung von TRADD an LMP1 nicht nur zur Signalweiterleitung und der Aktivierung des NF-κB Signalwegs notwendig ist, sondern auch regulatorische Funktionen bei Signalwegen wie dem JAK-STAT Signalweg hat. Diese Fragen können zukünftig in dem etablierten *TRADD*-defizienten DG75 Zellsystem bearbeitet werden.

5.4. Vergleichende Betrachtung der Rolle von TRADD in der Signaltransduktion von TNF-Rezeptor 1 und LMP1

Durch intensive Erforschung der LMP1-induzierten Signalwege und des LMP1 Signalkomplexes konnten in den letzten Jahren viele Gemeinsamkeiten zwischen LMP1 und Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie aufgezeigt werden. Funktionell ist LMP1 dem CD40-Rezeptor sehr ähnlich. Deshalb wird LMP1 auch als das virale Analogon von CD40 bezeichnet (Übersichtsartikel: Lam und Sugden, 2003). Es gibt aber offensichtlich Eigenschaften von LMP1, die einen Vergleich mit dem zellulären TNF-R1 nahe legen (siehe Abschnitt 1.3. und 1.4.). LMP1 bindet z.B. die mit TNF-R1 interagierenden Moleküle TRADD und RIP1 (Izumi *et al.*, 1999b; Izumi und Kieff, 1997; Kieser *et al.*, 1999), die keine Rolle in der Signaltransduktion von CD40 spielen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit war es durch die Herstellung der DG75 *TRADD*^{-/-} Zelllinie zum ersten Mal möglich, eine vergleichende Studie der TNF-R1 und LMP1 Signaltransduktion abhängig von TRADD durchzuführen. Es wurden vergleichend der NF-κB, JNK1 und apoptotische Signalweg von TNF-R1 und von LMP1 untersucht (siehe Abschnitt 4.4.). Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl von TNF-R1 als von LMP1 der klassische NF-κB Signalweg über TRADD aktiviert wird (siehe Abb.4.14). Bei der Aktivierung des JNK1 Signalwegs spielt TRADD weder beim TNF-R1 noch bei LMP1 eine Rolle (siehe Abb. 4.16). Diese Befunde zeigen deutlich, dass LMP1 das zelluläre TRADD zur Induktion der gleichen Transkriptionsfaktoren wie der TNF-R1 verwendet. Jedoch verlaufen die Signalwege unterhalb von TNF-R1 und LMP1 unterschiedlich. Während die Induktion von JNK1 durch TNF-R1 über einen TRAF2- und p21 Rho-ähnliche GTPasen-abhängigen Signalweg verläuft, sind TRAF3

und TRAF6, die beim TNF-R1 keine Rolle spielen, essentiell in der LMP1-induzierten JNK1 Aktivierung (Kieser *et al.*, 1999; Natoli *et al.*, 1997; Reinhard *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2004). Eine Ausnahme ist die Induktion des apoptotischen Signalwegs durch den TNF-R1. Während TRADD für die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs durch den TNF-R1 essentiell ist, kann LMP1 diesen Signalweg trotz Bindung von TRADD nicht aktivieren (siehe Abb. 4.17). Die Art der Bindung von TRADD an den TNF-R1 bzw. LMP1 scheint entscheidend für das apoptotische Potential dieser beiden Membranproteine zu sein. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass gerade durch die Art der Bindung von TRADD an LMP1 die Ausbildung eines apoptotischen Signalkomplexes mit FADD und Procaspase-8/10, analog dem Komplex 2 des TNF-R1 (Micheau und Tschopp, 2003), verhindert wird. Diese offenen Fragen müssen dringend in der Zukunft adressiert werden, um ein noch besseres Verständnis der Regulation am TNF-R1 und LMP1 zu bekommen.

Unter Einbeziehung der in dieser Doktorarbeit gewonnenen neuen Ergebnisse lässt sich das in Abb. 5.1 dargestellte, neue Modell der TNF-R1 und LMP1 Signaltransduktion aufstellen.

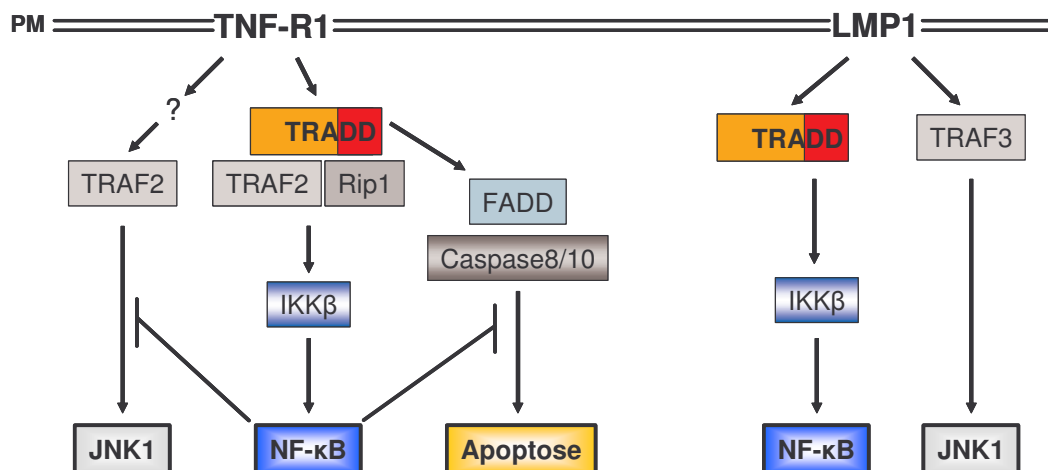


Abb. 5.1: Neues Modell der TNF-Rezeptor 1 und LMP1 Signaltransduktion. Der zelluläre TNF-R1 aktiviert den klassischen NF-κB sowie den apoptotischen Signalweg über TRADD. Die Induktion des JNK1 Signalwegs ist TRADD-unabhängig. TRAF2 kann ohne TRADD mit dem TNF-R1 interagieren. Das virale LMP1 aktiviert den klassischen NF-κB Signalweg über TRADD. Der JNK1 Signalweg verläuft wie auch beim TNF-R1 unabhängig von TRADD.

Welche Konsequenzen diese neuen Erkenntnisse auf zukünftige Forschungsarbeiten und Entwicklungen haben wird, ist noch nicht abzusehen. Da aber gerade der TNF-R1 und auch zum Teil LMP1 im Mittelpunkt intensiver biomedizinischer Forschung und Entwicklung stehen, müssen diese neuen Erkenntnisse in die Planung zukünftiger Forschungsarbeiten einbezogen werden.

6. Zusammenfassung

Das Adapterprotein TRADD spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion des zellulären TNF-Rezeptors 1 (TNF-R1) und des Latenten Membranproteins 1 (LMP1) vom Epstein-Barr-Virus. Im Gegensatz zur Situation am TNF-R1 bindet TRADD an LMP1 nicht über seine Todesdomäne, sondern über seinen N-terminalen Bereich. Betrachtet man die Zusammensetzung der TNF-R1 und LMP1 Signalkomplexe und der von diesen beiden Membranproteinen aktivierten Signalwege, sind ganz offensichtlich viele Gemeinsamkeiten zu erkennen. Dennoch ist die biologische Funktion dieser beiden Membranproteine zum Teil sehr unterschiedlich. Während der TNF-R1 maßgeblich an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt ist und in bestimmten Situationen die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) treiben kann, ist LMP1 essentiell an der Immortalisierung von B-Lymphozyten durch das Epstein-Barr-Virus beteiligt. LMP1 ist ein virales Onkogen, das die Expression mitogener Faktoren induziert und gleichzeitig Apoptose und Seneszenz inhibiert. Die Aufklärung der Signaltransduktion dieser beiden Membranproteine auf molekularer Ebene steht seit vielen Jahren im Zentrum intensiver Forschung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von TRADD in der Signaltransduktion von TNF-R1 und LMP1 zu klären. Da das einzig wirklich zuverlässige System zur Untersuchung der TRADD Proteinfunktionen ein *TRADD* „knockout“ Zellsystem ist, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals ein *TRADD*-defizientes Zellsystem mittels homologer Rekombination in humanen B-Lymphozyten (DG75) hergestellt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion von TNF-R1 und LMP1 in DG75 *TRADD*^{+/+} und DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen untersucht. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass TRADD für die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs sowohl durch die TNF-R1 Signaldomäne als auch durch LMP1 notwendig ist. Zusätzlich konnte durch die Entwicklung einer neuen, auf FACS-basierenden Methode zur Zelltodanalyse nach transienter Transfektion apoptotischer Gene, in DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen nachgewiesen werden, dass TRADD an der Induktion von Apoptose durch TNF-R1 essentiell beteiligt ist. Diese beiden Ergebnisse stützen das derzeitige Modell der TNF-R1 bzw. LMP1 Signaltransduktion.

Dagegen konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit festgestellt werden, dass TRADD weder für die Aktivierung des JNK1 Signalwegs durch die TNF-R1 Signaldomäne noch durch LMP1 benötigt wird. Im Fall von TNF-R1 stellt dieses Ergebnis das bis heute gültige Modell der TNF-R1 Signaltransduktion in Frage und zeigt, dass TRADD nicht das zentrale Adapterprotein zur Induktion aller wichtigen TNF-R1 Signalwege sein kann. Diese Ergebnisse konnten durch Experimente mit TRADD-siRNA in HeLa Zellen bestätigt werden.

Abschließend konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass TRAF2 unabhängig von TRADD mit dem TNF-R1 interagieren kann und von der TNF-R1 Signaldomäne in Abwesenheit von TRADD in „*lipid rafts*“ rekrutiert wird. Da TRAF2 für die TNF-R1-vermittelte JNK1 Aktivierung essentiell ist, könnte dies eine Erklärung für die TRADD-unabhängige Induktion des JNK1 Signalwegs durch TNF-R1 sein. Welches Molekül die Bindung von TRAF2 an TNF-R1 vermittelt, ist noch unklar und wird in Zukunft experimentell adressiert werden. Hierfür stellen die DG75 *TRADD*^{-/-} Zellen ein wertvolles experimentelles System dar.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP-1	<u>A</u> ktivierungsprotein- <u>1</u>
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodi <u>s</u> ulfat
As	<u>A</u> minosäure
ATF-2	aktivierter <u>T</u> ranskriptionsfaktor <u>2</u>
ATP	<u>A</u> denosin-5'-triphosphat
bp	<u>B</u> asenpaare
bcl-2	<u>b</u> <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma- <u>2</u>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Zell-Differenzierungsmarker („ <i>cell differentiation marker</i> “)
Ci	Curie
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
CRM1	<i>chromosomal region maintenance protein 1</i>
cl.	clone (Klon)
CTB	<u>C</u> holera <u>T</u> oxin Untereinheit <u>B</u>
CTAR	<u>c</u> arboxyterminale <u>A</u> ktivierungs <u>r</u> egion
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	<i>Sodium Deoxycholate</i>
DTT	Dithiothreitol
EBNA	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr Virus <u>n</u> ukleäres <u>A</u> ntigen
EBV	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extra-cellular regulated kinase</i>
F	Farad
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FLICE	<i>FADD-homologous ICE/CED-3-like protease</i>
FLIP	FLICE-Inhibitor Protein
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>Green fluorescent protein</i>)
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetan-sulfonsäure

HRP	<i>horse redish peroxidase</i>
ICE	<i>Interleukin-1 beta converting enzyme</i>
IFN- γ	Interferon- γ
I- κ B	Inhibitor von NF- κ B
IKK	I- κ B Kinase
IL	Interleukin
IRAK-1	<i>interleukin-1-receptor associated kinase-1</i>
IRAK-2	<i>interleukin-1-receptor associated kinase-2</i>
JAK3	Janus Kinase 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP1	Latentes Membranprotein 1
mA	Milliampere
MADD	Mitogen aktivierendes Todesdomainen Protein (<i>mitogen activating death domain protein</i>)
ml	Milliliter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NES	Nukleäre Exportsequenz
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PML	Promyelozytisches Leukemie Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP1	Rezeptor-interagierendes Protein 1
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAPK	<i>stress activated protein kinase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
SV40	Simian Virus 40

Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNF-R1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNF-R2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TRADD	TNF-Rezeptor 1 assoziiertes Todesdomänen Protein
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan
TUNEL	<i>TdT-dependent dUPT-biotin nick end labeling assay</i>
tRNA	Transfer-RNA
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
vs.	Versus
w/v	weight/volume
z.B.	zum Beispiel

8. Literatur

- Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J. and Kronke, M. (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell*, **86**, 937-947.
- Aggarwal, B.B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, **3**, 745-756.
- Aggarwal, S., Gollapudi, S. and Gupta, S. (1999) Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases. *J Immunol*, **162**, 2154-2161.
- Aizawa, S., Nakano, H., Ishida, T., Horie, R., Nagai, M., Ito, K., Yagita, H., Okumura, K., Inoue, J. and Watanabe, T. (1997) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J Biol Chem*, **272**, 2042-2045.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 499-511.
- Albert, H., Dale, E.C., Lee, E. and Ow, D.W. (1995) Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J*, **7**, 649-659.
- Ardila-Osorio, H., Pioche-Durieu, C., Puvion-Dutilleul, F., Clause, B., Wiels, J., Miller, W., Raab-Traub, N. and Busson, P. (2005) TRAF interactions with raft-like buoyant complexes, better than TRAF rates of degradation, differentiate signaling by CD40 and EBV latent membrane protein 1. *Int J Cancer*, **113**, 267-275.
- Ashkenazi, A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, **2**, 420-430.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. and Ciechanover, A. (2000) Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem*, **275**, 23491-23499.
- Baichwal, V.R. and Sugden, B. (1987) Posttranslational processing of an Epstein-Barr virus-encoded membrane protein expressed in cells transformed by Epstein-Barr virus. *J Virol*, **61**, 866-875.
- Baichwal, V.R. and Sugden, B. (1988) Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene*, **2**, 461-467.
- Baker, E., Chen, L.Z., Smith, C.A., Callen, D.F., Goodwin, R. and Sutherland, G.R. (1991) Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenet Cell Genet*, **57**, 117-118.
- Beg, A.A. and Baltimore, D. (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, **274**, 782-784.
- Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M.R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P. and Lacombe, F. (1994) A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*, **17**, 59-65.
- Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J.M., Cohen, M.M., Bentwich, Z., Ramot, B., Klein, E. and Klein, G. (1977) Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer*, **19**, 27-33.

- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.C., Mathison, J., Ulevitch, R. and Cerami, A. (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, **316**, 552-554.
- Bishop, G.A. (2004) The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol*, **4**, 775-786.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. and Cerretti, D.P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, **385**, 729-733.
- Blam, M.E., Stein, R.B. and Lichtenstein, G.R. (2001) Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol*, **96**, 1977-1997.
- Boldin, M.P., Mett, I.L. and Wallach, D. (1995a) A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. *FEBS Lett*, **367**, 39-44.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. and Wallach, D. (1995b) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, **270**, 7795-7798.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, **25**, 280-288.
- Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W. (2001) Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 437-459.
- Boucher, L.M., Marengere, L.E., Lu, Y., Thukral, S. and Mak, T.W. (1997) Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 592-600.
- Bourteele, S., Hausser, A., Doppler, H., Horn-Muller, J., Ropke, C., Schwarzmann, G., Pfizenmaier, K. and Muller, G. (1998) Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *J Biol Chem*, **273**, 31245-31251.
- Brielmeier, M., Bechet, J.M., Falk, M.H., Pawlita, M., Polack, A. and Bornkamm, G.W. (1998) Improving stable transfection efficiency: antioxidants dramatically improve the outgrowth of clones under dominant marker selection. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2082-2085.
- Brimmell, M., Mendiola, R., Mangion, J. and Packham, G. (1998) BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene*, **16**, 1803-1812.
- Brodeur, S.R., Cheng, G., Baltimore, D. and Thorley-Lawson, D.A. (1997) Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem*, **272**, 19777-19784.
- Brown, K.D., Hostager, B.S. and Bishop, G.A. (2001) Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *J Exp Med*, **193**, 943-954.

- Brown, T.L. and Howe, P.H. (1998) MADD is highly homologous to a Rab3 guanine-nucleotide exchange protein (Rab3-GEP). *Curr Biol*, **8**, R191.
- Browning, J.L., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E.P., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, S.F. and Ware, C.F. (1993) Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*, **72**, 847-856.
- Buerstedde, J.M. and Takeda, S. (1991) Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell*, **67**, 179-188.
- Burkitt, D., Hutt, M.S. and Wright, D.H. (1965) The African Lymphoma: Preliminary Observations on Response to Therapy. *Cancer*, **18**, 399-410.
- Cao, H., Courchesne, W.E. and Mastick, C.C. (2002) A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem*, **277**, 8771-8774.
- Capecchi, M.R. (1989a) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-1292.
- Capecchi, M.R. (1989b) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*, **5**, 70-76.
- Carpentier, I., Declercq, W., Malinin, N.L., Wallach, D., Fiers, W. and Beyaert, R. (1998) TRAF2 plays a dual role in NF-kappaB-dependent gene activation by mediating the TNF-induced activation of p38 MAPK and IkappaB kinase pathways. *FEBS Lett*, **425**, 195-198.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 3666-3670.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. and Jove, R. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, **10**, 105-115.
- Chadee, D.N., Yuasa, T. and Kyriakis, J.M. (2002) Direct activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase MEKK1 by the Ste20p homologue GCK and the adapter protein TRAF2. *Mol Cell Biol*, **22**, 737-749.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L. and Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**, 2351-2354.
- Chan, F.K. and Lenardo, M.J. (2000) A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **30**, 652-660.
- Chandel, N.S., Schumacker, P.T. and Arch, R.H. (2001) Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, **276**, 42728-42736.
- Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Chen, G. and Goeddel, D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, **296**, 1634-1635.

- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**, 505-512.
- Chow, V.T. and Lee, S.S. (1996) DENN, a novel human gene differentially expressed in normal and neoplastic cells. *DNA Seq*, **6**, 263-273.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H. and Ballard, D.W. (1997) Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10057-10062.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1991-1995.
- Clements, G.B., Klein, G. and Povey, S. (1975) Production by EBV infection of an EBNA-positive subline from an EBNA-negative human lymphoma cell line without detectable EBV DNA. *Int J Cancer*, **16**, 125-133.
- Coffin, W.F., 3rd, Erickson, K.D., Hoedt-Miller, M. and Martin, J.M. (2001) The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene*, **20**, 5313-5330.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
- Cottin, V., Doan, J.E. and Riches, D.W. (2002) Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain. *J Immunol*, **168**, 4095-4102.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. and Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, **27**, 1-20.
- Dawson, C.W., Rickinson, A.B. and Young, L.S. (1990) Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature*, **344**, 777-780.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D.U., Jin, R., Jones, J., Cong, R. and Franzoso, G. (2001) Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature*, **414**, 308-313.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q. and Cheng, G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*, **14**, 193-209.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. and Wu, X. (2003) A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell*, **115**, 61-70.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E. and Mosialos, G. (1996) Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, **16**, 7098-7108.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. and Liu, Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, **12**, 419-429.
- Devin, A., Lin, Y. and Liu, Z.G. (2003) The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep*, **4**, 623-627.

- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, **388**, 548-554.
- Diener, K., Wang, X.S., Chen, C., Meyer, C.F., Keesler, G., Zukowski, M., Tan, T.H. and Yao, Z. (1997) Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9687-9692.
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B. and Hammerschmidt, W. (2005) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene*, **22**, 1711-1717.
- Doan, J.E., Windmiller, D.A. and Riches, D.W. (2004) Differential regulation of TNF-R1 signaling: lipid raft dependency of p42mapk/erk2 activation, but not NF- κ B activation. *J Immunol*, **172**, 7654-7660.
- D'Souza, B., Rowe, M. and Walls, D. (2000) The bfl-1 gene is transcriptionally upregulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Virol*, **74**, 6652-6658.
- Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Nimmerjahn, F., Berchtold, S., Steinkasserer, A., Marschall, G., Hammerschmidt, W., Laux, G. and Bornkamm, G.W. (2003) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF- κ B signaling pathway. *J Virol*, **77**, 8290-8298.
- Dunbar, J.D., Song, H.Y., Guo, D., Wu, L.W. and Donner, D.B. (1997) Two-hybrid cloning of a gene encoding TNF receptor-associated protein 2, a protein that interacts with the intracellular domain of the type 1 TNF receptor: identity with subunit 2 of the 26S protease. *J Immunol*, **158**, 4252-4259.
- Eliopoulos, A.G., Caamano, J.H., Flavell, J., Reynolds, G.M., Murray, P.G., Poyet, J.L. and Young, L.S. (2003) Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF- κ B2 to p52 via an IKK γ /NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene*, **22**, 7557-7569.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W. and Young, L.S. (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem*, **274**, 16085-16096.
- Eliopoulos, A.G., Stack, M., Dawson, C.W., Kaye, K.M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M. and Young, L.S. (1997) Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene*, **14**, 2899-2916.
- Eliopoulos, A.G. and Young, L.S. (2001) LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol*, **11**, 435-444.
- Emanuel, B.S., Nowell, P.C., McKeon, C., Croce, C.M. and Israel, M.A. (1986) Translocation breakpoint mapping: molecular and cytogenetic studies of chromosome 22. *Cancer Genet Cytogenet*, **19**, 81-92.
- Fahraeus, R., Rymo, L., Rhim, J.S. and Klein, G. (1990) Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*, **345**, 447-449.

- Faili, A., Aoufouchi, S., Gueranger, Q., Zober, C., Leon, A., Bertocci, B., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (2002) AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat Immunol*, **3**, 815-821.
- Feederle, R., Delecluse, H.J., Rouault, J.P., Schepers, A. and Hammerschmidt, W. (2004) Efficient somatic gene targeting in the lymphoid human cell line DG75. *Gene*, **343**, 91-97.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Floettmann, J.E. and Rowe, M. (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene*, **15**, 1851-1858.
- Floettmann, J.E., Ward, K., Rickinson, A.B. and Rowe, M. (1996) Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology*, **223**, 29-40.
- Fotin-Mleczeck, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A. and Wajant, H. (2002) Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci*, **115**, 2757-2770.
- Fuchs, P., Strehl, S., Dworzak, M., Himmler, A. and Ambros, P.F. (1992) Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected]. *Genomics*, **13**, 219-224.
- Galon, J., Aksentijevich, I., McDermott, M.F., O'Shea, J.J. and Kastner, D.L. (2000) TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol*, **12**, 479-486.
- Gardner, R.L. and Brook, F.A. (1997) Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol*, **41**, 235-243.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M. and Hammerschmidt, W. (1999) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J*, **18**, 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J*, **16**, 6131-6140.
- Gorczyca, W., Gong, J. and Darzynkiewicz, Z. (1993) Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*, **53**, 1945-1951.
- Gotoh, Y. and Cooper, J.A. (1998) Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem*, **273**, 17477-17482.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.

- Graves, J.D., Draves, K.E., Craxton, A., Krebs, E.G. and Clark, E.A. (1998) A comparison of signaling requirements for apoptosis of human B lymphocytes induced by the B cell receptor and CD95/Fas. *J Immunol*, **161**, 168-174.
- Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P. and et al. (1984) Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, **312**, 721-724.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. and et al. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **83**, 793-802.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G. and Scheurich, P. (1998) The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 570-575.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T.F., Morris, C.A. and Sturzl, M. (2004) EBV latent membrane protein-1 protects B-cells from apoptosis by inhibition of bax. *Blood*.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J. and Gerondakis, S. (1999) Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 400-411.
- Hammariskjold, M.L. and Simurda, M.C. (1992) Epstein-Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF-kappa B activity. *J Virol*, **66**, 6496-6501.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B. and Baichwal, V.R. (1989) The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol*, **63**, 2469-2475.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M. and Cohen, G.M. (2003) Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 25534-25541.
- Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K., Shirane, M., Matsumoto, M., Hattori, K., Higashi, H., Nakano, H., Okumura, K., Onoe, K. and Good, R.A. (1999) Ubiquitin-dependent degradation of IkappaBalpha is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul1/F-box protein FWD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3859-3863.
- Henderson, B.R. and Eleftheriou, A. (2000) A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res*, **256**, 213-224.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E. and Rickinson, A. (1991) Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, **65**, 1107-1115.
- Higuchi, M. and Aggarwal, B.B. (1994) TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J Immunol*, **152**, 3550-3558.

- Hoeflich, K.P., Yeh, W.C., Yao, Z., Mak, T.W. and Woodgett, J.R. (1999) Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1). *Oncogene*, **18**, 5814-5820.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B. and Tschopp, J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, **1**, 489-495.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, **114**, 193-197.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. and Goeddel, D.V. (1996a) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, **4**, 387-396.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V. (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**, 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, **81**, 495-504.
- Hu, L.F., Zabarovsky, E.R., Chen, F., Cao, S.L., Ernberg, I., Klein, G. and Winberg, G. (1991) Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol*, **72** (Pt 10), 2399-2409.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*, **284**, 316-320.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. and Fesik, S.W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, **384**, 638-641.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D. and Rowe, M. (1995) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene*, **10**, 549-560.
- Hummel, M., Ziemann, K., Lammert, H., Pileri, S., Sabattini, E. and Stein, H. (1995) Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells. *N Engl J Med*, **333**, 901-906.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, **275**, 90-94.
- Inada, H., Izawa, I., Nishizawa, M., Fujita, E., Kiyono, T., Takahashi, T., Momoi, T. and Inagaki, M. (2001) Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol*, **155**, 415-426.
- Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S. and Yamamoto, T. (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res*, **254**, 14-24.
- Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T. and Inoue, J. (1996)

- Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem*, **271**, 28745-28748.
- Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Riley, E.A., Rizzo, D., Chen, Y. and Kieff, E. (1999a) The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, **73**, 9908-9916.
- Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B. and Kieff, E.D. (1999b) The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, **19**, 5759-5767.
- Izumi, K.M., Kaye, K.M. and Kieff, E.D. (1994) Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, **68**, 4369-4376.
- Izumi, K.M., Kaye, K.M. and Kieff, E.D. (1997) The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1447-1452.
- Izumi, K.M. and Kieff, E.D. (1997) The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12592-12597.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W. and Goeddel, D.V. (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*, **283**, 543-546.
- Jupp, O.J., McFarlane, S.M., Anderson, H.M., Littlejohn, A.F., Mohamed, A.A., MacKay, R.H., Vandenabeele, P. and MacEwan, D.J. (2001) Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem J*, **359**, 525-535.
- Karin, M. and Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-227.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.
- Kaye, K.M., Devergne, O., Harada, J.N., Izumi, K.M., Yalamanchili, R., Kieff, E. and Mosialos, G. (1996) Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11085-11090.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R. and Kieff, E. (1999) An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, **73**, 10525-10530.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., Mosialos, G. and Kieff, E. (1995) The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol*, **69**, 675-683.

- Kaykas, A. and Sugden, B. (2000) The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene*, **19**, 1400-1410.
- Kaykas, A., Worringer, K. and Sugden, B. (2001) CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *Embo J*, **20**, 2641-2654.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z. and Leder, P. (1998) The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*, **8**, 297-303.
- Kieser, A. (2001) Assaying the activity of kinases regulated by LMP1. *Methods Mol Biol*, **174**, 325-336.
- Kieser, A., Kaiser, C. and Hammerschmidt, W. (1999) LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *Embo J*, **18**, 2511-2521.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W. and Hammerschmidt, W. (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *Embo J*, **16**, 6478-6485.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W. (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J*, **17**, 1700-1709.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J. and Ashkenazi, A. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, **12**, 611-620.
- Klein, G. (1979) Lymphoma development in mice and humans: diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2442-2446.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T. and van Oers, M.H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-1420.
- Kreder, D., Krut, O., Adam-Klages, S., Wiegmann, K., Scherer, G., Plitz, T., Jensen, J.M., Proksch, E., Steinmann, J., Pfeffer, K. and Kronke, M. (1999) Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *Embo J*, **18**, 2472-2479.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. and Lu, S.D. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, **53**, 45-53.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V. and Raab-Traub, N. (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11963-11968.
- Laherty, C.D., Hu, H.M., Opipari, A.W., Wang, F. and Dixit, V.M. (1992) The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*, **267**, 24157-24160.
- Lam, N. and Sugden, B. (2003) CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal*, **15**, 9-16.

- Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C. and Choi, Y. (1997) TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity*, **7**, 703-713.
- Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J. and Bron, C. (2003) Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*, **18**, 655-664.
- Lenoir, G.M., Vuillaume, M. and Bonnardel, C. (1985) The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci Publ*, 309-318.
- Leonard, W.J. and O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, **16**, 293-322.
- Li, Q., Estepa, G., Memet, S., Israel, A. and Verma, I.M. (2000) Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev*, **14**, 1729-1733.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F. and Verma, I.M. (1999) Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*, **284**, 321-325.
- Li, X., Yang, Y. and Ashwell, J.D. (2002) TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature*, **416**, 345-347.
- Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J. and Kieff, E. (1987) An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol Cell Biol*, **7**, 2299-2308.
- Liebowitz, D., Wang, D. and Kieff, E. (1986) Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol*, **58**, 233-237.
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G. and Ibanez, C.F. (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J*, **16**, 4999-5005.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. and Karin, M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576.
- Loetscher, H., Pan, Y.C., Lahm, H.W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. and Lesslauer, W. (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **61**, 351-359.
- Luftig, M., Prinarakis, E., Yasui, T., Tschritzis, T., Cahir-McFarland, E., Inoue, J., Nakano, H., Mak, T.W., Yeh, W.C., Li, X., Akira, S., Suzuki, N., Suzuki, S., Mosialos, G. and Kieff, E. (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15595-15600.
- Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M.S., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B. and Kieff, E. (2004) Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 141-146.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Macchi, P., Villa, A., Giliani, S., Sacco, M.G., Frattini, A., Porta, F., Ugazio, A.G., Johnston, J.A., Candotti, F., O'Shea, J.J. and et al. (1995) Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*, **377**, 65-68.

- Mann, K.P. and Thorley-Lawson, D. (1987) Posttranslational processing of the Epstein-Barr virus-encoded p63/LMP protein. *J Virol*, **61**, 2100-2108.
- Mannel, D.N. and Echtenacher, B. (2000) TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol*, **74**, 141-161.
- Martin, J. and Sugden, B. (1991) The latent membrane protein oncoprotein resembles growth factor receptors in the properties of its turnover. *Cell Growth Differ*, **2**, 653-600.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. and Green, D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, **182**, 1545-1556.
- McDermott, M.F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E.M., Ogunkolade, B.W., Centola, M., Mansfield, E., Gadina, M., Karenko, L., Pettersson, T., McCarthy, J., Frucht, D.M., Aringer, M., Torosyan, Y., Teppo, A.M., Wilson, M., Karaarslan, H.M., Wan, Y., Todd, I., Wood, G., Schlimgen, R., Kumarajeewa, T.R., Cooper, S.M., Vella, J.P., Kastner, D.L. and et al. (1999) Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, **97**, 133-144.
- McFarlane, S.M., Pashmi, G., Connell, M.C., Littlejohn, A.F., Tucker, S.J., Vandenamee, P. and MacEwan, D.J. (2002) Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett*, **515**, 119-126.
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, **431**, 343-349.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. and Tschopp, J. (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol*, **21**, 5299-5305.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, **114**, 181-190.
- Milatovich, A., Song, K., Heller, R.A. and Francke, U. (1991) Tumor necrosis factor receptor genes, TNFR1 and TNFR2, on human chromosomes 12 and 1. *Somat Cell Mol Genet*, **17**, 519-523.
- Miller, W.E., Mosialos, G., Kieff, E. and Raab-Traub, N. (1997) Epstein-Barr virus LMP1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF-kappaB activation. *J Virol*, **71**, 586-594.
- Mitchell, T. and Sugden, B. (1995) Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **69**, 2968-2976.
- Miura, M., Friedlander, R.M. and Yuan, J. (1995) Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8318-8322.
- Miyagawa, K., Tsuruga, T., Kinomura, A., Usui, K., Katsura, M., Tashiro, S., Mishima, H. and Tanaka, K. (2002) A role for RAD54B in homologous recombination in human cells. *Embo J*, **21**, 175-180.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, 11-24.

- Morgan, M., Thorburn, J., Pandolfi, P.P. and Thorburn, A. (2002) Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *J Cell Biol*, **157**, 975-984.
- Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1997) A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF α and cellular stresses. *Embo J*, **16**, 7045-7053.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E. (1995) The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, **80**, 389-399.
- Mosselmans, R., Hepburn, A., Dumont, J.E., Fiers, W. and Galand, P. (1988) Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L-929 cells. *J Immunol*, **141**, 3096-3100.
- Muller, U. (1999) Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*, **82**, 3-21.
- Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M.T., Pisa, P., Kiessling, R. and Masucci, M.G. (1994) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*, **57**, 240-244.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C. and Levrero, M. (1997) Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science*, **275**, 200-203.
- Nicholls, J., Hahn, P., Kremmer, E., Frohlich, T., Arnold, G.J., Sham, J., Kwong, D. and Grasser, F.A. (2004) Detection of wild type and deleted latent membrane protein 1 (LMP1) of Epstein-Barr virus in clinical biopsy material. *J Virol Methods*, **116**, 79-88.
- Niedobitek, G., Meru, N. and Delecluse, H.J. (2001) Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol*, **82**, 149-170.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*, **2**, 389-395.
- Nitta, T., Chiba, A., Yamamoto, N. and Yamaoka, S. (2004) Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal*, **16**, 1071-1081.
- Nitta, T., Chiba, A., Yamashita, A., Rowe, M., Israel, A., Reth, M., Yamamoto, N. and Yamaoka, S. (2003) NF-kappaB is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cell Signal*, **15**, 423-433.
- Nophar, Y., Kemper, O., Brakebusch, C., Englemann, H., Zwang, R., Aderka, D., Holtmann, H. and Wallach, D. (1990) Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *Embo J*, **9**, 3269-3278.
- O'Malley, W.E., Achinstein, B. and Shear, M.J. (1963) Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. Iii. Repeated Response of Sarcoma 37, in Tolerant Mice, to Serratia Marcescens Endotoxin. *Cancer Res*, **23**, 890-895.
- O'Neill, L.A. (2004a) Immunology. After the toll rush. *Science*, **303**, 1481-1482.
- O'Neill, L.A. (2004b) TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol*, **25**, 687-693.

- Oshima, R.G., Baribault, H. and Caulin, C. (1996) Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev*, **15**, 445-471.
- Panagopoulos, D., Victoratos, P., Alexiou, M., Kollias, G. and Mosialos, G. (2004) Comparative analysis of signal transduction by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 in vivo. *J Virol*, **78**, 13253-13261.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D.U., Pham, C.G., Nelsbach, A.H., Melis, T., De Smaele, E., Tang, W.J., D'Adamio, L. and Franzoso, G. (2004) Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol*, **6**, 146-153.
- Park, A. and Baichwal, V.R. (1996) Systematic mutational analysis of the death domain of the tumor necrosis factor receptor 1-associated protein TRADD. *J Biol Chem*, **271**, 9858-9862.
- Park, Y.C., Ye, H., Hsia, C., Segal, D., Rich, R.L., Liou, H.C., Myszka, D.G. and Wu, H. (2000) A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell*, **101**, 777-787.
- Peng, M. and Lundgren, E. (1992) Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene*, **7**, 1775-1782.
- Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B. and Goeddel, D.V. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, **312**, 724-729.
- Pierce, S.K. (2002) Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol*, **2**, 96-105.
- Pullen, S.S., Dang, T.T., Crute, J.J. and Kehry, M.R. (1999) CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem*, **274**, 14246-14254.
- Pulvertaft, R.J. and Humble, J.G. (1962) Intracellular phase of existence of lymphocytes during remission of acute lymphatic leukaemia. *Nature*, **194**, 194-195.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S. and Pickup, D.J. (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, **69**, 597-604.
- Reed, J.C. (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, **157**, 1415-1430.
- Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V. and Williams, L.T. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *Embo J*, **16**, 1080-1092.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. and Goeddel, D.V. (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*, **269**, 1424-1427.
- Rothenberger, S., Rousseaux, M., Knecht, H., Bender, F.C., Legler, D.F. and Bron, C. (2002) Association of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with lipid rafts is mediated through its N-terminal region. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 171-180.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D.S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E. and Rickinson, A.B. (1994) Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent

- membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol*, **68**, 5602-5612.
- Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J. and Mak, T.W. (2000) Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*, **14**, 854-862.
- Russell, S.M., Tayebi, N., Nakajima, H., Riedy, M.C., Roberts, J.L., Aman, M.J., Migone, T.S., Noguchi, M., Markert, M.L., Buckley, R.H. and et al. (1995) Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science*, **270**, 797-800.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandberg, M., Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1997) Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol*, **71**, 4649-4656.
- Sauer, B. and Henderson, N. (1990) Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol*, **2**, 441-449.
- Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.J., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R., Raab, H. and et al. (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, **61**, 361-370.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, **97**, 695-710.
- Scheuерpflug, C.G., Lichter, P., Debatin, K.M. and Mincheva, A. (2001) Assignment of TRADD to human chromosome band 16q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **92**, 347-348.
- Schievella, A.R., Chen, J.H., Graham, J.R. and Lin, L.L. (1997) MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 12069-12075.
- Schneider, F. and Kieser, A. (2004) A novel assay to quantify cell death after transient expression of apoptotic genes in B- and T-lymphocytes. *J Immunol Methods*, **292**, 165-174.
- Schneider, U., Schwenk, H.U. and Bornkamm, G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, **19**, 621-626.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D. and Schutze, S. (2004) Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling; Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity*, **21**, 415-428.
- Schultheiss, U., Puschner, S., Kremmer, E., Mak, T.W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W. and Kieser, A. (2001) TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *Embo J*, **20**, 5678-5691.
- Schutze, S., Machleidt, T., Adam, D., Schwandner, R., Wiegmann, K., Kruse, M.L., Heinrich, M., Wickel, M. and Kronke, M. (1999) Inhibition of receptor internalization by

- monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J Biol Chem*, **274**, 10203-10212.
- Sedivy, J.M. and Dutriaux, A. (1999) Gene targeting and somatic cell genetics--a rebirth or a coming of age? *Trends Genet*, **15**, 88-90.
- Seshagiri, S. and Miller, L.K. (1997a) Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13606-13611.
- Seshagiri, S. and Miller, L.K. (1997b) *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr Biol*, **7**, 455-460.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4**, E131-136.
- Shimizu, N., Tanabe-Tochikura, A., Kuroiwa, Y. and Takada, K. (1994) Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol*, **68**, 6069-6073.
- Shiraki, K., Takase, K. and Nakano, T. (2002) The emerging role of caspase inhibitors in gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol*, **37**, 323-331.
- Shu, H.B., Takeuchi, M. and Goeddel, D.V. (1996) The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13973-13978.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Slee, E.A., Zhu, H., Chow, S.C., MacFarlane, M., Nicholson, D.W. and Cohen, G.M. (1996) Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J*, **315** (Pt 1), 21-24.
- Solomon, K.A., Pesti, N., Wu, G. and Newton, R.C. (1999) Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J Immunol*, **163**, 4105-4108.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H. and Walczak, H. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, **12**, 599-609.
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E. and Seed, B. (1995) RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, **81**, 513-523.
- Strebel, A., Harr, T., Bachmann, F., Wernli, M. and Erb, P. (2001) Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*, **43**, 126-133.
- Sugden, B., Marsh, K. and Yates, J. (1985) A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol*, **5**, 410-413.
- Sun, Y., Mochizuki, Y. and Majerus, P.W. (2003) Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase inhibits tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 43645-43653.

- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobarai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., Yeh, W.C. and Nakano, H. (2001) Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem*, **276**, 36530-36534.
- Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, W.E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J.S. and Raab-Traub, N. (1999) Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol*, **73**, 5548-5555.
- Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L. and Goeddel, D.V. (1999) Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity*, **10**, 421-429.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N.H., Li, Z., Karin, M. and Lin, A. (2001) Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*, **414**, 313-317.
- Tang, P., Hung, M.C. and Klostergaard, J. (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, **35**, 8216-8225.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. and Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, **74**, 845-853.
- Taylor, P.C., Peters, A.M., Glass, D.M. and Maini, R.N. (1999) Effects of treatment of rheumatoid arthritis patients with an antibody against tumour necrosis factor alpha on reticuloendothelial and intrapulmonary granulocyte traffic. *Clin Sci (Lond)*, **97**, 85-89.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, **2**, 222-228.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A. and Davis, R.J. (2001) MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev*, **15**, 1419-1426.
- Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. and Baeuerle, P.A. (1995) Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J*, **14**, 2876-2883.
- Tsurumi, C., Shimizu, Y., Saeki, M., Kato, S., Demartino, G.N., Slaughter, C.A., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Yamasaki, M., Hendil, K.B., Toh-e, A., Tanahashi, N. and Tanaka, K. (1996) cDNA cloning and functional analysis of the p97 subunit of the 26S proteasome, a polypeptide identical to the type-1 tumor-necrosis-factor-receptor-associated protein-2/55.11. *Eur J Biochem*, **239**, 912-921.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N. and Kikutani, H. (1999) Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, **286**, 300-303.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. and Verma, I.M. (1996) Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*, **274**, 787-789.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Verma, I.M. and Green, D.R. (1998) Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol*, **8**, 107-111.
- Varfolomeev, E.E. and Ashkenazi, A. (2004) Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell*, **116**, 491-497.

- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, **184**, 39-51.
- Vezina, J., Grossmuller, F. and Muller, K. (2001) Influence of a transiently transfected gene on apoptosis, measurements guided by cotransfected GFP. *J Immunol Methods*, **252**, 163-169.
- Vockerodt, M., Haier, B., Buttgereit, P., Tesch, H. and Kube, D. (2001) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology*, **280**, 183-198.
- Wajant, H., Grell, M. and Scheurich, P. (1999) TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, **10**, 15-26.
- Wajant, H., Henkler, F. and Scheurich, P. (2001) The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal*, **13**, 389-400.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, **10**, 45-65.
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, J.W., Chui, Y.L., Huang, D.P., Chen, Z.J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.C., Akira, S., Matsumoto, K., Liu, Z.G. and Wu, Z. (2004) Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol*, **24**, 192-199.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S., Jr. (1996a) TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, **274**, 784-787.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. and Baldwin, A.S., Jr. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, **281**, 1680-1683.
- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, **43**, 831-840.
- Wang, S., Rowe, M. and Lundgren, E. (1996b) Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res*, **56**, 4610-4613.
- Wang, Y., Wu, T.R., Cai, S., Welte, T. and Chin, Y.E. (2000) Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, **20**, 4505-4512.
- Weiss, T., Grell, M., Hessabi, B., Bourteele, S., Muller, G., Scheurich, P. and Wajant, H. (1997) Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol*, **158**, 2398-2404.
- Weiss, T., Grell, M., Sieminski, K., Muhlenbeck, F., Durkop, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. and Wajant, H. (1998) TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J Immunol*, **161**, 3136-3142.
- Wesemann, D.R., Qin, H., Kokorina, N. and Benveniste, E.N. (2004) TRADD interacts with STAT1-alpha and influences interferon-gamma signaling. *Nat Immunol*, **5**, 199-207.

- Wysk, M., Yang, D.D., Lu, H.T., Flavell, R.A. and Davis, R.J. (1999) Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3763-3768.
- Xie, P. and Bishop, G.A. (2004) Roles of TNF receptor-associated factor 3 in signaling to B lymphocytes by carboxyl-terminal activating regions 1 and 2 of the EBV-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *J Immunol*, **173**, 5546-5555.
- Xie, P., Hostager, B.S. and Bishop, G.A. (2004) Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med*, **199**, 661-671.
- Yang, J., Deng, X., Deng, L., Gu, H., Fan, W. and Cao, Y. (2004) Telomerase activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is associated with c-Myc expression in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Exp Clin Cancer Res*, **23**, 495-506.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B. (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol*, **2**, 620-624.
- Yang, X., He, Z., Xin, B. and Cao, L. (2000) LMP1 of Epstein-Barr virus suppresses cellular senescence associated with the inhibition of p16INK4a expression. *Oncogene*, **19**, 2002-2013.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V. and Mak, T.W. (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, **279**, 1954-1958.
- Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D.V. and Mak, T.W. (1997) Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*, **7**, 715-725.
- Yoshizaki, T., Sato, H., Furukawa, M. and Pagano, J.S. (1998) The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3621-3626.
- Yoshizaki, T., Sato, H., Murono, S., Pagano, J.S. and Furukawa, M. (1999) Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator. *Clin Exp Metastasis*, **17**, 431-436.
- Young, L.S., Dawson, C.W. and Eliopoulos, A.G. (2000) The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol*, **53**, 238-247.
- Yuasa, T., Ohno, S., Kehrl, J.H. and Kyriakis, J.M. (1998) Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J Biol Chem*, **273**, 22681-22692.
- Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitso, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., Fanger, G.R., Henson, P. and Johnson, G.L. (2000) MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7272-7277.

-
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, **91**, 243-252.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H. and Winoto, A. (1998) Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*, **392**, 296-300.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J. and Gelinas, C. (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 382-387.
- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P. and Santesson, L. (1970) EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, **228**, 1056-1058.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Arnd Kieser für die stets hervorragende wissenschaftliche Betreuung, dafür dass er immer für Fragen und Probleme ein offenes Ohr hatte, für die besonders gründliche Korrektur dieser schriftlichen Arbeit und vor allem dafür, dass er mir als „Quereinsteiger“ die Chance gegeben hat, mich in dieses Gebiet einzuarbeiten,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen und für hilfreiche Diskussionen und Hilfestellungen,

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick dafür, dass er die Aufgaben und Pflichten des offiziellen Betreuers der Arbeit an der Fakultät für Biologie übernommen hat,

der gesamten Arbeitsgruppe „Signaltransduktion“ (Cinthia, Helmi, Julia, Janin, Thomas) und den Ehemaligen (Barbara, Ferdi, Nicola, Tom, Ute) für eine hervorragende Zusammenarbeit, allen Leuten in der Abteilung Genvektoren für die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima, allen Leuten im Hämatologikum die mit Rat zur Seite standen, speziell meinen lieb gewonnenen „Indern“ (Ani, Baboo, Deepakino, Farid, Nag, Naidoo und „*second last*“ aus Nepal), Markus Conrad und Sabine Meier für hilfreiche Diskussionen über „*Knockout-Strategien*“, Frau Dr. Schoch für die FISH-Analysen, Gilbert für die Einweisung in die hohe Kunst der Durchflusszytometrie, Markus Altmann für die Beantwortung vieler Fragen und nochmals Cinthia, für die hervorragende Zusammenarbeit in Sachen „*lipid rafts*“ und bei Helmi für die Hilfe bei Klonierungen,

meinen Eltern, meinem Bruder Thomas, sowie Karin, die immer alle für mich da waren, mich unterstützt haben und mich bestärkt haben dieses Projekt zu einem guten Ende zu bringen. Zuletzt möchte ich mich noch besonders bei „Natalia aus Italia“ bedanken, die es mit mir die letzten drei Jahre ausgehalten hat, mir immer zur Seite stand und oft den Frust nach den zahlreichen „erfolgreichen“ Labortagen ertragen musste.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Frank Schneider
Geburtsdatum: 25.02.1972
Geburtsort: Garmisch-Partenkirchen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1978-1982 Grundschule Mittenwald
1982-1991 Werdenfels-Gymnasium Garmisch-Partenkirchen
Juni 1991 Abitur

Studium

1993-1994 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien, Universität Bayreuth
1994-2000 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien, Ludwig-Maximilians-Universität München
Juli 2000 1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in Biologie und Chemie
1996-2000 Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
September 2000 Abschluss des Studiums der Biologie (Diplom)
September 2001-März 2005 Promotion in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion, Abt. Genvektoren, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München und der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 2005 Mündliche Doktorprüfung in der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (summa cum laude)