

Aus dem Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Speziesunterschiede bei der Rekrutierung TNF-Rezeptor-assoziiierter
Faktoren an CD40 am Beispiel von Maus und Mensch**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martina Bongers

aus

Bad Schwalbach

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H. Engelmann, Ph.D.

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. vet. F. Krombach
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2006

Meinen Eltern
und André

1. INHALTSVERZEICHNIS

1.	Inhaltsverzeichnis	1
2.	Abkürzungen.....	4
3.	Zusammenfassung	8
4.	Einleitung.....	10
4.1.	TNF-Rezeptoren.....	12
4.1.1.	Struktur der Rezeptoren der TNFR-Superfamilie.....	12
4.2.	TRAF-Proteine	15
4.2.1.	Struktur der TRAF-Proteine	15
4.3.	TRAF-vermittelte Signaltransduktionswege.....	16
4.4.	Auswirkungen defekter TRAF-aktivierter Signaltransduktionswege	19
5.	Zielsetzung.....	21
6.	Material und Methoden	23
6.1.	Reagenzien	23
6.1.1.	Zellen und Zellkulturmaterial	23
6.1.2.	Puffer	24
6.1.3.	Antikörper.....	25
6.1.4.	Primer und cDNA-Klone.....	26
6.2.	Methoden.....	28
6.2.1.	Klonierung der Hybridrezeptoren und Plasmidpräparation.....	28
6.2.1.1.	RNA-Isolation	28
6.2.1.2.	cDNA-Synthese.....	28
6.2.1.3.	Präparative PCR.....	29
6.2.1.4.	Präparative Isolierung von DNA mittels DEAE-Zellulose nach gelelektrophoretischer Auftrennung.....	30
6.2.1.5.	Klonierung der humanen CD40-Expressionsplasmide	30

6.2.1.6.	Klonierung des human-murinen Wildtyp-Hybridrezeptors	31
6.2.1.7.	Herstellung der murinen Rezeptormutanten	33
6.2.1.8.	Klonierung der TRAF-Plasmide	34
6.2.1.9.	Schnellpräparation und Überprüfung der Plasmid-DNA	35
6.2.1.10.	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	35
6.2.1.11.	Transformation	36
6.2.1.12.	Großansatz zur Isolierung von Plasmid-DNA	36
6.2.2.	Zellkultur	36
6.2.2.1.	Calcium-Phosphat-Transfektion in 293T-Zellen	36
6.2.2.2.	Lyse	37
6.2.3.	TRAF-Rekrutierungs-ELISA	37
6.2.3.1.	Rekrutierungs-ELISA	37
6.2.3.2.	Bestimmung der CD40-Expression im ELISA	39
6.2.3.3.	Vorteile des verwendeten Transfektionssystems	39
6.2.4.	Reporter-Assay zur Detektion von NF- κ B-Bindung.....	40
6.2.4.1.	Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen.....	40
6.2.4.2.	DEAE/Dextran-Transfektion von A9-Zellen.....	40
6.2.4.3.	Stimulation und Analyse der transfizierten Zellen.....	41
6.2.4.4.	Das Reportersystem	41
7.	Ergebnisse.....	42
7.1.	Adaptation des Testsystems für den Vergleich zweier speziesverschiedener Rezeptoren	42
7.2.	Vergleich der TRAF-Rekrutierung an Maus- und Mensch-CD40.....	43
7.2.1.	Die TRAF1-Rekrutierung zeigt Speziesunterschiede.....	44
7.2.2.	Für TRAF2 ist keine Speziespezifität nachweisbar	46
7.2.3.	Humanes und murines TRAF3 binden schlechter an die murinen Rezeptoren	47
7.2.4.	Speziesunterschiede bei der Rekrutierung von TRAF5.....	48

7.2.5.	Deutliche Speziesunterschiede im Rekrutierungsmuster von TRAF6	50
7.3.	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch TRAFs.....	52
7.3.1.	Ergebnisse der NF- κ B-Aktivierung der humanen Rezeptoren.....	53
7.3.2.	NF- κ B-Aktivierung durch murines CD40.....	54
7.3.3.	Murines CD40 zeigt deutlich schwächere NF- κ B-Aktivierung über TRAF6..	55
8.	Diskussion	57
8.1.	TRAF2A liefert Hinweise auf eine Beteiligung der Ringfingerstruktur an der Rezeptorbindung.....	58
8.2.	Bedeutung des TRAF6-vermittelten Signaltransduktionsweges in der Maus	62
8.3.	Trotz vollständig konserviertem Bindemotiv werden humanes und murines TRAF1 besser an den spezieeigenen Rezeptor rekrutiert	63
8.4.	TRAF6 beeinflusst die TRAF5-Bindung	64
8.5.	Trotz unterschiedlicher Bindungscharakteristiken zeigen Maus und Mensch ähnliche über CD40-vermittelte Krankheitsbilder.....	65
9.	Literaturverzeichnis	67
10.	Anhang.....	77
10.1.	Proteinsequenzvergleich der TRAF-Proteine.....	77
11.	Danksagung	82
12.	Lebenslauf	83

2. ABKÜRZUNGEN

α -	Anti-
Ak	Antikörper
API	activation protein 1 (Aktivierungsprotein 1)
AS	Aminosäure
ATCC	American Tissue Culture Collection (Amerikanische Gewebekultur Sammlung)
BAFF	B-cell activation factor from the Tumor-Necrosis-Factor(TNF)-Family (TNFRSF13C)
BCMA	B-cell maturation (TNFRSF17)
BCR	B-cell antigen receptor
BHK	baby hamster kidney cells (Nierenzellen von Hamsterbabies)
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	complementary desoxy ribonucleic acid (komplementäre Desoxy-ribonukleinsäure)
CED	Caenorhabitis elegans cell death protein
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein (zelluläres Apoptose-hemmendes Protein)
DD	death domain
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDAR	Ectodysplasin-A-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamin tetraacetic acid (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase (durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase)
EZD	Extrazellulärdomäne
FADD	Fas-associated death domain (Fas-assoziierte Todesdomäne)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Fn14	fibroblast growth factor-inducible-14 (Rezeptor für TWEAK)
GITR	Glucocorticoid-induced Tumor-Necrosis-Factor-Receptor-Family-related gene (TNFRSF18)
HeBS	HEPES-bufferd-saline
HEK	human embryonal kidney cells (humane embryonale Nierenepithelzellen)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid) 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-Schwefelsäure
hu	human
HUGO	Human Genome Organisation
HVEM	herpes virus entry mediator (TNFRSF14)
I- κ B	inhibitor of NF- κ B
ICAM1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
Ig	Immunglobulin
ICH-1	Caspase 2
ICE	Interleukin1 β -konvertierendes Enzym (Caspase 1)

IL	Interleukin
IMAGE	Integrated Molecular Analysis of Genoms and their Expression
IZD	Intrazellulärdomäne
JNK	c-jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LMP1	latentes Infektionsmembranprotein 1
LT β R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	Multicloning-site
MMLV	moloney murine leukemia virus
mu	murin
mRNA	messenger-RNA
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
NIK	NF- κ B-induzierende Kinase
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	Rezeptor
RANK	receptor activator of NF- κ B (TNFRSF11A)
RELT	Receptor expressed in lymphoid tissues (TNFRSF19)
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rLE	relative Lichteinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute

TACI	Transmembrane Activator, Calcium Modulator and Cyclophilin Ligand Interactor (TNFRSF13B)
TANK	TRAF-associated NF- κ B-activator
TBS	Tris-buffered saline
TFBI	Transformationspuffer I
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TRADD	TNF-receptor-associated death domain (TNF-Rezeptor-assozierte Todesdomäne)
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierter Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TTRAP	TRAF- and TNF-receptor-associated protein
TWEAK	TNFSF12
U	(unit) Einheit
X	Punktmutation
XEDAR	Ectodysplasin-A2-Rezeptor (EDA2R, TNFRSF27)
WT	Wildtyp

3. ZUSAMMENFASSUNG

Das Immunsystem ist eines der komplexesten Organsysteme des menschlichen Organismus. Es dient der Erhaltung der Individualstruktur durch die Abwehr körperfremder Substanzen und Organismen, sowie der Elimination anomaler Körperzellen. Als einziges Organsystem liegen seine Zellen nicht im Gewebsverbund vor, sondern sind ubiquitär im Körper verteilt. Daher ist die Kommunikation zwischen den Zellen von besonderer Bedeutung für das korrekte Funktionieren von Abwehrmechanismen. Die Verständigung zwischen den Zellen wird unter anderem über Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie gewährleistet. Nach der Aktivierung dieser Rezeptoren durch ihre Liganden kommt es abhängig vom jeweiligen Rezeptor zum programmierten Zelltod (Apoptose) oder zur Aktivierung antiapoptotischer Signalwege und zur Induktion von Entzündungsprozessen. Der antiapoptotische Signalweg wird über sogenannte Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs) vermittelt, welche ihrerseits Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF- κ B und AP1 aktivieren. Treten Defekte innerhalb ihrer Signaltransduktionswege auf, leiden die Patienten, abhängig von der Lokalisation des Defektes, unter Erkrankungen, die meist mit schweren Immundefiziten einhergehen. Eine Störung der Interaktion von CD40-Ligand und CD40, welches zur TNFRSF gehört, liegt beispielsweise der kongenitalen Erkrankung „X-gekoppeltes Hyper-IgM Syndrom“ zugrunde. Diese äußert sich in Defekten beim Immunglobulin-Klassenwechsel und bei der Bildung von B-Zell-Keimzentren sowie in einer gestörten T-Zell-Aktivierung. Zur Untersuchung dieser Erkrankungen und ihrer Ursachen wurden in der Vergangenheit in-vitro-Versuche durchgeführt und später auch „Knockout“-Mäuse generiert. Diese Mäuse stellen derzeit einen wichtigen Forschungsansatz für in-vivo-Untersuchungen dar. Die Signaltransduktionsmechanismen in der Maus sollen besser verstanden werden, um daraus Rückschlüsse auf die biologische Bedeutung der Signalwege im humanen System ziehen zu können. Bei der Betrachtung der Aminosäuresequenzen von humanem und murinem CD40 fallen strukturelle Unterschiede in den Signaldomänen auf. Beide Rezeptoren gleichen sich im Bereich der TRAF6-Bindestelle nur in wenigen Aminosäuren. Darüber hinaus verfügt der murine Rezeptor über elf zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus. Diese Unterschiede lassen vermuten, dass der TRAF-Signalapparat speziesspezifische Unterschiede aufweist, die in vielen der bisher durchgeführten Studien nicht berücksichtigt wurden.

Die folgende Arbeit untersucht das Bindungsverhalten humaner und muriner TRAFs an humanes und murines CD40 auf eine mögliche Speziesabhängigkeit. Vergleichende Untersuchungen zum Bindungsverhalten von humanem und murinem TRAF an humane bzw. murine Rezeptoren wurden bisher nicht durchgeführt. In dieser Studie konnten für TRAF6 gravierende Unterschiede im Rekrutierungsverhalten an die Rezeptoren der verschiedenen Spezies festgestellt werden. Auch für TRAF2 und die nur im murinen System nachgewiesene Spleissvariante TRAF2A zeigten sich unerwartete Bindungscharakteristiken. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass es im humanen und murinen System Unterschiede bei der Signaltransduktion gibt. Ergebnisse, die im murinen System gewonnen werden, sind demnach nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar.

4. EINLEITUNG

Das Immunsystem dient der Erhaltung des Organismus durch die Abwehr körperfremder Organismen und Substanzen sowie der kontinuierlichen Elimination anomaler Körperzellen. An diesen Prozessen sind neben den Organen des lymphatischen Gewebes auch ubiquitär im Körper vorkommende Zellen (z.B. Leukozyten, Monozyten und Makrophagen) und Moleküle (z.B. Immunglobuline und Zytokine) beteiligt. Für das Funktionieren des Immunsystems ist das korrekte Zusammenspiel all dieser Bestandteile notwendig. Da das Immunsystem nicht wie andere Organe als Gewebsverbund existiert, sondern seine Zellen über den gesamten Organismus verteilt sind, ist die Kommunikation zwischen den Zellen enorm wichtig. Dies wird über Zytokine erreicht. Sie beeinflussen ihre Zielzellen, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. Zu den Zytokinen gehören auch Tumor-Nekrose-Faktor und Lymphotoxin, die über TNF-Rezeptoren Einfluss auf ihre Zielzellen nehmen. Die TNF-Rezeptoren sind Bestandteil einer Rezeptorgruppe, die als TNF-Rezeptor-Superfamilie zusammengefasst wird. Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man zwei Arten von Rezeptoren: die Apoptose-induzierenden Rezeptoren, die über eine sogenannte Todesdomäne verfügen und deren Aktivierung zu programmiertem Zelltod führt und die Rezeptoren mit antiapoptotischer Wirkung, die über Rekrutierung sogenannter TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktoren (TRAFs) immunregulatorische Effekte und Entzündungsreaktionen vermitteln.

Diese Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit den letztgenannten Rezeptoren und den durch sie vermittelten Signaltransduktionswegen. Stellvertretend für diese Rezeptoren wurde hier CD40 genauer untersucht, da es sich aufgrund seiner Eigenschaften besonders gut für diese Analysen eignet.

Nach Ligand-induzierter Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es intrazellulär zur Bindung von TRAF-Proteinen. Daraus resultiert über verschiedene Signalkaskaden eine Freisetzung von „c-Jun-N-terminaler Protein-Kinase“ (JNK) und NF- κ B. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B gelangt daraufhin in den Zellkern, führt dort zur Transkription bestimmter Gene und kontrolliert so wichtige genetische Programme, über die angeborene und adaptive Immunantwort gesteuert werden (Bonizzi und Karin, 2004). Außerdem reguliert es über die Suppression von Apoptose den Zellzyklus und greift somit in viele Aspekte der Onkogenese

ein. JNK stellt einen Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP1 dar und führt zur Regulation von Wachstumssignalen und zur Freisetzung von Zytokinen.

Eine wesentliche Voraussetzung für das korrekte Funktionieren der Signalkaskade stellt die Bindung der TRAF-Proteine an die Rezeptoren dar. Unterschiede im Bereich der Aminosäurestruktur von humanem und murinem CD40 warfen die Frage auf, ob diese Differenzen das Rekrutierungsverhalten der TRAF-Proteine beeinflussen. Daher wurden in dieser Arbeit die Bindungscharakteristiken von humanem und murinem TRAF an die spezieverschiedenen Rezeptoren sowie die resultierende NF- κ B-Aktivierung untersucht.

Zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wird in den folgenden Abschnitte ein Überblick über die verschiedenen Rezeptoren der TNFRSF, die sechs bisher bekannten TRAF-Proteine, sowie die TRAF-vermittelten Signaltransduktionswege gegeben.

4.1. TNF-REZEPTOREN

4.1.1. STRUKTUR DER REZEPTOREN DER TNFR-SUPERFAMILIE

Alle Rezeptoren der TNFRSF weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Sie zeichnen sich z.B. durch homologe zysteinreiche Strukturen in ihren Extrazellulärdomänen aus. Basierend auf den zytoplasmatischen Sequenzen und den daraus resultierenden Signalprozessen unterscheidet man zwei Gruppen: die Apoptose-induzierenden, sowie die antiapoptotisch-wirkenden entzündungsfördernden Rezeptoren.

Zur Gruppe der Apoptose-induzierenden Rezeptoren gehören: TNFRSF1A (TNF-R1), Fas (CD95), TNFRSF25 (DR3) und TNFRSF21 (DR6) sowie TNFRSF10A (TRAIL-R1) und TNFRSF10B (TRAIL-R2) (Nomenklatur nach HUGO; in Klammern sind die ehemaligen Bezeichnungen der Rezeptoren aufgelistet). Sie alle besitzen eine so genannte „Death Domain“ im zytoplasmatischen Rezeptoranteil. Die Aktivierung dieser Rezeptoren durch ihre korrespondierenden Liganden führt zur Rekrutierung intrazellulärer Adaptermoleküle. Zu diesen Adaptermolekülen gehören „TNFRSF1A-associated via death domain“ (TRADD), „Fas-associated via death domain“ (FADD), „Receptor interacting protein (RIP) associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain“ (RAIDD) und „Caspase and RIP adaptor with death domain“ (CRADD). Sie sind in der Lage an die konservierte „Death Domain“ zu binden, besitzen aber keine eigene Enzymaktivität. Die Adaptermoleküle dienen der Rekrutierung weiterer Signalproteine, wie z.B. Caspase 8, einer Cysteinprotease vom Typ der „Interleukin1 β konvertierenden Enzyme“ (ICE) (Boldin et al., 1996). Caspase 8 aktiviert weitere Caspasen und vermittelt über diesen Mechanismus den programmierten Zelltod (Salvesen und Dixit, 1997; Yang et al., 1997).

Die Mitglieder der zweiten Gruppe der TNF-Rezeptoren wirken entzündungsfördernd und schützen die Zellen vor Apoptose. Kennzeichnend für diese Rezeptoren sind konservierte TRAF-Bindungsstellen in den Intrazellulärdomänen, über die sie intrazellulär mit den sogenannten TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs) interagieren. Derzeit sind 19 TNF-Rezeptoren bekannt, die diese Proteine direkt rekrutieren. Hierzu gehören (offizielle Nomenklatur nach HUGO: Wain et al., 2002; Wain et al., 2004): TNFRSF1B (TNF-R2), LT β R (TNFRSF3), TNFRSF4 (OX40), CD40 (TNFRSF5), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB), TNFRSF11A (RANK), TNFRSF12A (FN14), TNFRSF13B

(TACI), TNFRSF13C (BAFF-R), TNFRSF14 (HVEM), p75NGFR (TNFRSF16), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR), TNFRSF19 (TROY), TNFRSF19L (RELT), EDAR, EDA2R (TNFRSF27, XEDAR). Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung einiger Mitglieder der TRAF-bindenden Rezeptoren.

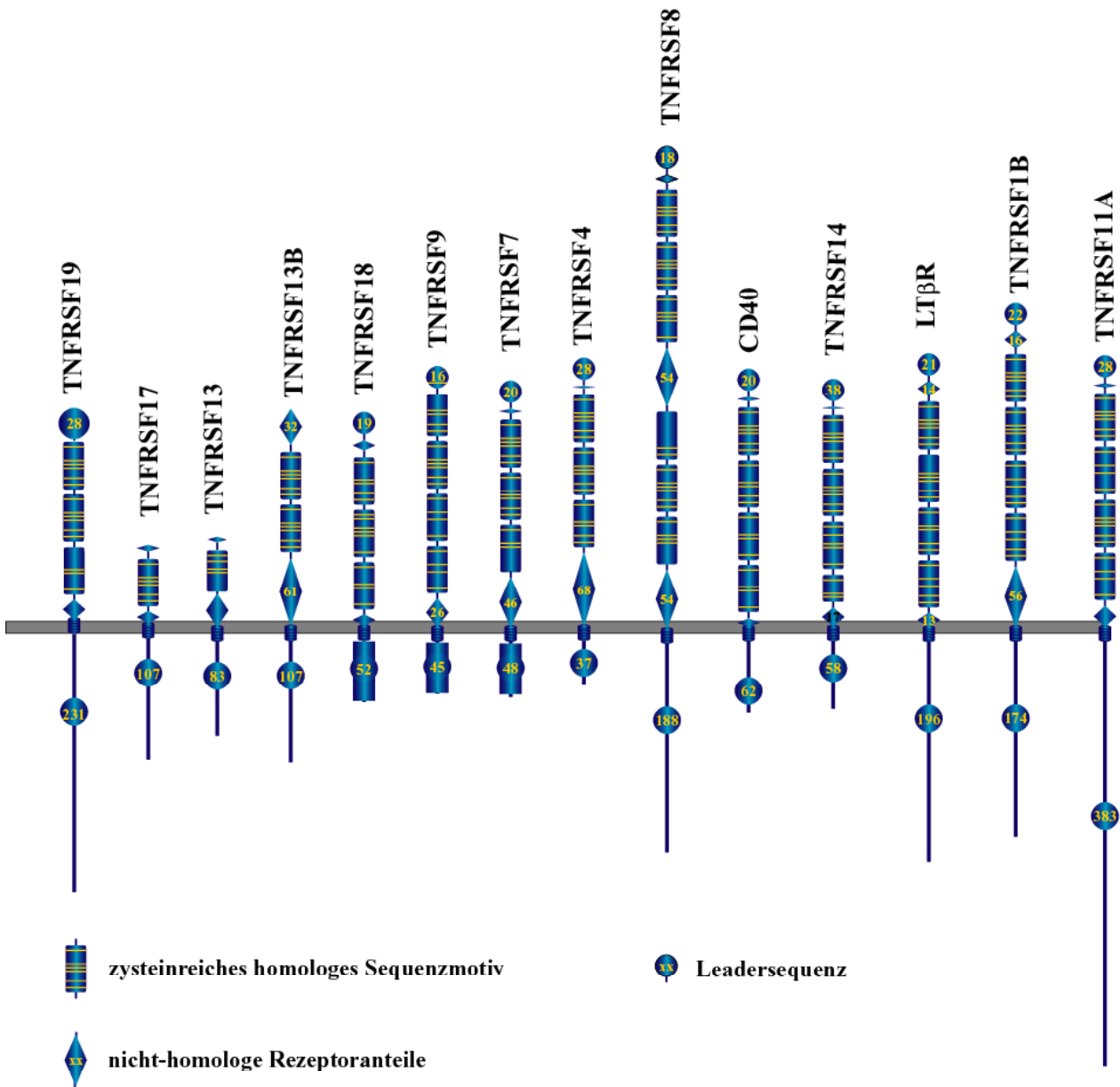


Abbildung 1: Schematische Darstellung einiger Mitglieder der TRAF-bindenden TNFRSF (Nomenklatur nach HUGO)

Bestimmte Aminosäure-Sequenzmotive in den Intrazellulärdomänen der Rezeptoren sind für die Rekrutierung der verschiedenen TRAF-Proteine und somit für die Signalweiterleitung essentiell. Über das Konsensusmotiv PxQxT werden TRAF1, -2 und -3 an die Intrazellulärdomäne rekrutiert (Franken et al., 1996; Park et al., 1999; Pullen et al., 1999; Pullen et al., 1998; Ye et al., 1999a). Humanes TRAF5 kann auch indirekt über TRAF3 rekrutiert werden (Leo et al., 1999; Pullen et al., 1998). TRAF6 bindet an das Aminosäuremotiv QxPxExxF (Pullen et al., 1999; Pullen et al., 1998), das sich im N-terminalen Bereich der CD40-Signaldomäne befindet. Diese Motive konnten mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen bestätigt werden (McWhirter et al., 1999; Ni et al., 2000; Park et al., 1999; Ye et al., 2002; Ye et al., 1999a). Die beiden beschriebenen TRAF-Bindungsmotive kommen in ähnlicher Form in allen TRAF-bindenden Rezeptoren vor (Gedrich et al., 1996; Ye et al., 2002; Ye et al., 1999b).

Ein Sequenzvergleich von humanem und murinem CD40 zeigt, dass auch murines CD40 über zwei TRAF-Bindestellen verfügt. Während das Motiv für TRAF1, -2, -3 und -5 in humanem und murinem Rezeptor sogar vollständig konserviert ist (Grimaldi et al., 1992; Torres und Clark, 1992), sind in der Region, in der sich das TRAF6-Motiv befindet, nur einzelne Aminosäuren erhalten. Neben diesen Differenzen im Bereich der TRAF6-Bindestelle, weist murines CD40 außerdem elf zusätzliche Aminosäuren am äußersten Rezeptor-C-Terminus auf (vergleiche Abbildung 2). Im Rahmen dieser Studie wurde daher untersucht, ob diese strukturellen Unterschiede auch zu Differenzen im Rekrutierungsverhalten der TRAF-Proteine führen.

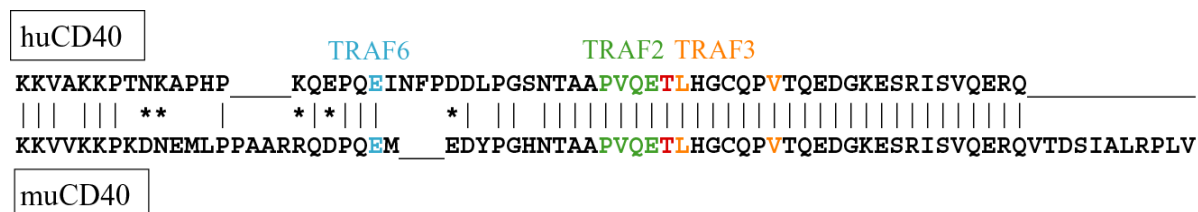


Abbildung 2: Sequenzvergleich von humanem und murinem CD40_{WT} und die postulierten TRAF-Bindemotive nach Tsukamoto et al., 1999. Die als TRAF-Bindestellen beschriebenen Aminosäure-Sequenzmotive der humanen und murinen CD40-Signaldomäne sind farbig hervorgehoben. Während das Motiv für TRAF1, -2 und -3 vollständig konserviert ist, sind im TRAF6-Motiv nur einzelne Aminosäuren erhalten.

Derzeit wird davon ausgegangen, dass die vorbeschriebenen Sequenzen PxQxT und QxPxExxF in allen Fällen die Bindung der TRAF-Proteine vermitteln. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass neben diesen bereits identifizierten Sequenzmotiven weitere Aminosäuren in den Signaldomänen der Rezeptoren die Bindungskinetik der TRAFs beeinflussen können (Pullen et al., 1999). Zur Klärung dieser Frage wurden in diese Arbeit Rezeptormutanten mit zusätzlichen Aminosäuremutationen in den c-terminal gelegenen Rezeptorabschnitten einbezogen.

4.2. TRAF-PROTEINE

4.2.1. STRUKTUR DER TRAF-PROTEINE

Intrazellulär binden die sogenannten TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs) an die verschiedenen Rezeptoren der TNFRSF. Derzeit sind sechs verschiedene TRAFs bekannt. Alle TRAFs zeichnen sich durch eine C-terminal-gelegenen TRAF-Domäne aus. Diese besteht aus ca. 200 Aminosäuren und wird in eine TRAF-C- und eine TRAF-N-Domäne unterteilt (vergleiche Abbildung 3) (Cao et al., 1996; Rothe et al., 1994). Die TRAF-C-Domäne ist zu 60% konserviert und vermittelt die Interaktion zwischen TRAF-Monomeren, die Bindung an den Rezeptor sowie an andere Signalmoleküle wie „NF- κ B-inducing-Kinase“ (NIK) (Malinin et al., 1997) oder TANK (Cheng und Baltimore, 1996). Die TRAF-N-Domänen weisen mit 15% eine deutlich geringere Homologie auf und binden antiapoptotische Moleküle, wie c-IAP1 und c-IAP2 (Rothe et al., 1995a).

Mit Ausnahme von TRAF1, welches lediglich einen Zinkfinger besitzt (Arch und Thompson, 1998; Dempsey et al., 2003; Rothe et al., 1994) verfügen alle TRAFs am N-Terminus über ein Ringfingermotiv sowie fünf bis sieben Zinkfinger (siehe Abbildung 3) (Chung et al., 2002). Zink- und Ringfinger motive vermitteln DNA-Protein- oder Protein-Protein-Interaktionen (Freemont, 1993), sowie rezeptorinduzierte Ubiquitinierung (Freemont, 2000). Über diese wird eine Degradierung der TRAF-Proteine und somit die Regulation TRAF-abhängiger Signalwege ermöglicht (Brown et al., 2002). Ein Isoleuzin-Zipper-Motiv in TRAF3 und

TRAF5 befähigt diese Moleküle außerdem zur Heteromerisierung und ermöglicht somit eine indirekte Rezeptorbindung von TRAF5 über TRAF3 (Pullen et al., 1998).

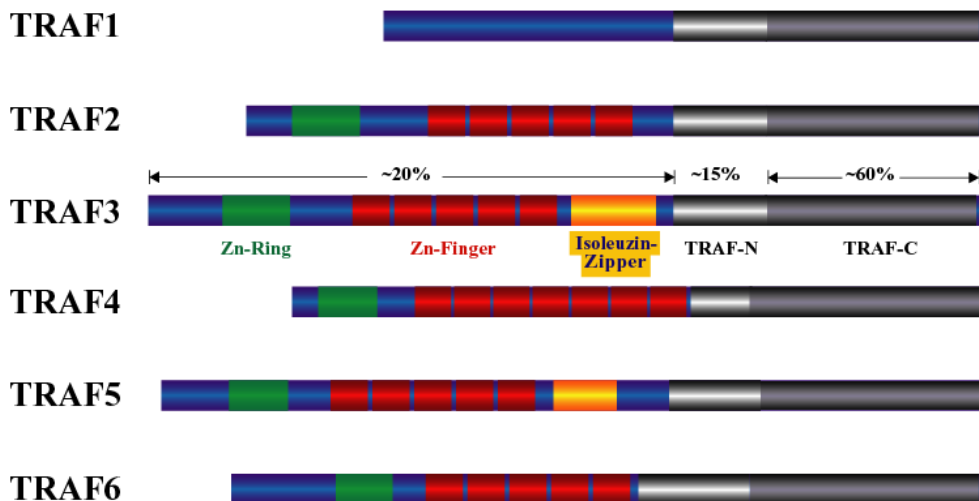


Abbildung 3: Schematische Darstellung der TRAF-Proteine. TRAF-Proteine weisen einen hoch konservierten C-Terminus auf, über den sie an die Rezeptoren binden und mit anderen TRAFs interagieren können. Über den weniger konservierten N-Terminus, bestehend aus Ring- und Zinkfingern, vermitteln sie funktionelle Aufgaben. Für TRAF3 ist der ungefähre Grad der Konservierung in Prozent aufgeführt.

Die N-terminalen Abschnitte der TRAF-Proteine werden als die Funktionsbestimmenden angesehen. Insbesondere wird über diese Region auch die Aktivierung von „c-Jun-N-terminaler Protein-Kinase“ (JNK) und NF- κ B ermöglicht. Beide dienen dem Schutz der Zellen vor Apoptose und vermitteln entzündliche Prozesse.

4.3. TRAF-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE

Als grundsätzlicher Aktivierungsmechanismus der TNF-Rezeptoren wird die Ligand-induzierte Rezeptortrimerisierung angesehen. Erste Anhaltspunkte für diesen Aktivierungsmechanismus, lieferten Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass alle Rezeptoren der TNF-Familie durch agonistische Antikörper, jedoch nicht durch monovalente F(ab)-Fragmente dieser Antikörper aktiviert werden. (Clark und Ledbetter, 1986; Engelmann

et al., 1990; Paulie et al., 1989). Kristallstrukturanalysen des TNF-Rezeptor-Lymphotoxin- α -Komplexes lieferten weitere Beweise für den postulierten Aktivierungsmechanismus (Banner et al., 1993). Nach der Trimerisierung interagieren die Rezeptoren mit TRAF-Proteinen, welche im Zytoplasma ebenfalls in Trimer-Form vorliegen. Die Trimerisierung der TRAF-Proteine ist Voraussetzung für die Bindung an den Rezeptor (Park et al., 1999).

Innerhalb der Plasmamembran besitzen die Rezeptoren laterale Mobilität und sind in der Lage sich in Cholesterol- und Glycolipid-reichen Regionen, sogenannten „Lipid rafts“, zu gruppieren. Erfolgt eine Rekrutierung von TRAF-Proteinen, gelangen diese aus dem Zytoplasma an die Zellmembran und somit in die Nähe dieser „Lipid rafts“. Die veränderte subzelluläre Lokalisation der TRAFs führt zur Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalkaskaden. Es wird spekuliert, dass die Ansammlung verschiedener TRAFs im Bereich dieser „rafts“ die Interaktion dieser Proteine miteinander erleichtert und so zur Bildung von TRAF-Heterotrimeren führt (Dykstra et al., 2003).

Durch die Rekrutierung der TRAFs an den Rezeptor kommt es über Enzymkaskaden, die aus Proteasen (z.B. Caspasen), Phospholipasen (z.B. Phospholipase A2) oder Proteinkinasen (z.B. MAPK) bestehen, zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege und somit zur Aktivierung von „jun-N-terminaler Protein-Kinase“ (JNK) und NF- κ B.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch TRAF2 (Rothe et al., 1995b), TRAF5 (Ishida et al., 1996b; Nakano et al., 1996) und TRAF6 (Ishida et al., 1996a) aktiviert. In unstimulierten Zellen befindet sich NF- κ B im Zytoplasma und ist dort an das inhibitorische Protein „Inhibitor of NF- κ B“ (I κ B) gebunden. Eine Stimulation führt über verschiedene Kinasen zur Phosphorylierung und Ubiquitinierung des I κ B und zur sofortigen Degradierung. Vermittelt wird diese Phosphorylierung unter anderem durch die „NF- κ B-induzierende Kinase“ (NIK) (Malinin et al., 1997; Ramakrishnan et al., 2004). Diese bindet über die TRAF-C-Domäne an TRAF1, -2, -3, -5 und TRAF6 (Malinin et al., 1997; Song et al., 1997). Die Aktivierung der Kinase setzt intakte Ring- und Zinkfinger voraus (Song et al., 1997). NF- κ B wird daraufhin freigesetzt, kann in den Zellkern gelangen und dort die Transkription bestimmter Gene induzieren, welche für Proteine mit immunregulatorischem und entzündungsförderndem Effekt kodieren. NF- κ B ist ein dimerer Proteinkomplex, der sich aus fünf Mitgliedern der sogenannten Rel-Familie zusammensetzen kann. Je nach Zusammensetzung beeinflusst NF-

κ B unterschiedliche genetische Programme. Die nukleäre Translokation der unterschiedlichen Rel-Dimere erfolgt auf zumindest zwei verschiedenen Wegen, die als klassischer und alternativer Weg bezeichnet werden. Der klassische Signalweg induziert die Aktivierung der NF- κ B-Komponenten p50/RelA, der alternative Weg die von p52/RelB. TNF-Rezeptoren sind in der Lage beide Signalwege zu aktivieren. Für CD40 wurde zum Beispiel gezeigt, dass es über TRAF6 nur klassisches NF- κ B aktiviert, über TRAF2 und -5 hingegen beide NF- κ B-Signalwege (Coope et al., 2002; Hauer et al., 2005). TRAF3 kommt dabei eine regulatorische Funktion zu. Es ist in der Lage den alternativen Signalweg über TRAF2/5 zu hemmen und die NF- κ B-Aktivierung hin zum klassischen Weg über TRAF6 zu verschieben (Hauer et al., 2005).

JNK wird von TRAF2 (Hostager et al., 2003) und TRAF6 (Hsing und Bishop, 1999; Jalukar et al., 2000) über eine Serin/Threonin-Kinasekaskade aktiviert. Bisher ist nicht genau bekannt wie die TRAF-Proteine in diese Signalkaskade eingreifen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die ersten zwei Zinkfinger für die JNK-Aktivierung von essentieller Bedeutung sind, wohingegen die Ringfingerregion eine bedeutende Rolle bei der NF- κ B-Aktivierung spielt (Chung et al., 2002; Dadgostar und Cheng, 1998; Dadgostar und Cheng, 2000). JNK ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP1 (Lee et al., 1997) und trägt so zur Förderung von Wachstumssignalen und zur Freisetzung von Zytokinen (Karin et al., 1997) bei. Über TRAF6 wird zusätzlich die „Extracellular Signal-regulated Kinase“ (ERK) aktiviert (Kashiwada et al., 1998), wodurch es vermutlich zur Freisetzung von Fos, der zweiten Komponente von AP1, kommt.

Darüber hinaus sind TRAFs auch in der Lage mit unterschiedlichen intrazellulären Molekülen zu interagieren. Hierzu zählen z.B. die „inhibitors of apoptosis protein“ (cIAPs), A20 (Opipari et al., 1990) sowie das „TRAF and TNF-receptor-associated protein“ (TTRAP) (Pype et al., 2000). Während cIAP direkt Caspasen hemmt (Park et al., 2000; Wang et al., 1998), inhibiert A20 die von TRAF- bzw. MAP-Kinasen vermittelte NF- κ B-Aktivierung (Hess et al., 1998; Zetoune et al., 2001). TTRAP gehört zu den Mg^{2+}/Mn^{2+} -abhängigen Phosphodiesterasen und beeinflusst den Signalweg über die Endonukleaseaktivität (Rodrigues-Lima et al., 2001).

TRAFs können direkt oder indirekt mit den Rezeptoren beider TNFRSF-Untergruppen interagieren und dadurch den antiapoptotischen und den Apoptose-induzierenden Signalweg

verknüpfen. Über die direkte Bindung an Rezeptoren ohne Todesdomäne führen TRAFs zur NF- κ B-Aktivierung und verhindern so das Absterben der Zelle. Die indirekte Interaktion mit Rezeptoren mit Todesdomäne, über deren Adaptermoleküle wie zum Beispiel TRADD, führt zu Apoptose. TRAF-Proteine dienen somit als Regulatoren, die über das Überleben oder den Zelltod entscheiden (Baker und Reddy, 1996; Park et al., 2000).

Desweiteren benutzen auch einige virale Proteine TRAF-vermittelte Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel das „latent membran protein1“ (LMP1) des Epstein-Barr-Virus, (Mosialos et al., 1995). LMP1 bindet dabei an TRAF1, -2, -3 und TRAF5 (Bishop, 2004; Xie et al., 2004) und hat transformierende Wirkung. Es ist deshalb davon auszugehen, dass TRAF-Proteine auch eine wesentliche Rolle bei der Onkogenese spielen (Kaye et al., 1993; Kaye et al., 1995).

Bestätigt wird dies auch durch die Beobachtung, dass NF- κ B bei Patienten mit myeloischer Leukämie als wesentlicher Bestandteil der onkologischen Aktivität nachgewiesen werden konnte (Reuther et al., 1998). Bei dem früh-metastasierenden Pankreaskarzinom und in Pankreastumor-Zelllinien führt eine erhöhte NF- κ B-Aktivierung sowie die Resistenz gegenüber Fas-induzierter Apoptose zu der hohen Invasivität dieses Tumors. Trauzold et al. konnten zeigen, dass diese Effekte durch erhöhte TRAF2-Werte in den Tumorzellen hervorgerufen werden (Trauzold et al., 2005).

4.4. AUSWIRKUNGEN DEFEKTER TRAF-AKTIVIERTER SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE

Die von TNFRSF aktivierten Signalwege spielen eine bedeutende Rolle für die fehlerlose Organogenese sowie das korrekte Funktionieren aller Organsysteme im adulten Organismus. Störungen im Bereich der CD40-CD40L-Achse z.B führen zu schweren Immundefekten. Konsequenz ist ein Immunkrankheit, die als „X-gekoppeltes Hyper-IgM-Syndrom“ bekannt ist. Ihr liegt eine Mutation im Bereich der Aminosäuresequenz des CD40-Liganden zugrunde. Als Folge dieses Defektes können die Patienten keine B-Zell-Keimzentren bilden (Allen et al., 1993; Aruffo et al., 1993; Callard et al., 1993; DiSanto et al., 1993; Fuleihan et al., 1993; Korthäuer et al., 1993) und Affinitätsreifung, sowie Ig-Klassenwechsel bleiben aus. Es werden

deshalb fast ausschließlich niedrig affine IgM-Immunglobuline gebildet, die keinen langfristigen Schutz gegen eindringende Pathogene verleihen. Es kommt zu häufigen bakteriellen Infekten. Aufgrund der ebenfalls gestörten T-Zell-Aktivierung erkranken die Patienten außerdem häufiger an nosokomialen Infektionen zum Beispiel mit *Pneumocystis carinii* (Grewal et al., 1995; Wiley und Harmsen, 1995). Im Maus-Modell konnte durch gezielte Inaktivierung (Knockout) des CD40-Liganden bzw. CD40-Gens ein ähnliches Krankheitsbild erzeugt werden (Castigli et al., 1994; Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994).

Auch Defekte der TRAF-Proteine wirken sich auf den Organismus aus. Im Maus-Modell zeigte sich, dass sowohl die Inaktivierung des TRAF2- als auch des TRAF3-Gens letale Konsequenzen hat. TRAF2 „Knockout“ Mäuse sterben perinatal, TRAF3 „Knockout“ Mäuse um den 10. Lebenstag (Xu et al., 1996; Yeh et al., 1997). Die Elimination des TRAF6-Gens ist zwar mit dem Leben vereinbar, führt aber zu schwerer Osteopetrose (Lomaga et al., 1999; Naito et al., 1999). Alle bisherigen Studien zeigen, dass TRAF-Proteine essentiell für die Entwicklung und Funktionsfähigkeit des Individuums sind.

5. ZIELSETZUNG

Für in-vivo-Untersuchungen TNFR-vermittelter Signalkaskaden dient das Mausmodell als wichtige Grundlage. Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollen die Signaltransduktionsmechanismen und deren Bedeutung für den Gesamtorganismus besser verstanden werden, um daraus Rückschlüsse auf das humane System ziehen zu können. Solche Rückschlüsse sind jedoch nur möglich, wenn Maus und Mensch sich in ihren Signaltransduktionswegen vollständig gleichen.

Stellvertretend für die Rezeptoren der TNFRSF wurde in dieser Studie CD40 genauer untersucht. CD40 eignet sich aufgrund seiner Eigenschaften besonders gut für die hier geplanten Analysen. Es verfügt über eine sehr kurze Signaldomäne von nur 62 Aminosäuren, rekrutiert mit Ausnahme von TRAF4 sämtliche TRAF-Proteine und ist hinsichtlich seiner Funktionen sehr gut untersucht. Die Signaltransduktion jedes einzelnen TRAF-Proteins kann somit an diesem Rezeptor modellhaft untersucht werden. Bei der Inspektion der Aminosäuresequenzen fällt auf, dass sich humanes CD40 im Bereich der TRAF6-Bindungsstelle und am äußersten C-Terminus deutlich von murinem CD40 unterscheidet. Die TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle ist dagegen vollständig konserviert. Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede stellte sich die Frage, ob die Signalproteine, die an diese Domänen binden, speziesspezifische Rekrutierungsunterschiede aufweisen würden. Vergleichende Untersuchungen zum Bindungsverhalten von humanem und murinem TRAF an humane bzw. murine Rezeptoren wurden bisher nicht durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die TRAF-Rekrutierung an die verschiedenen Rezeptoren im humanem sowie im murinen System auf Speziesspezifität zu untersuchen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Bindet humanes TRAF an humanes CD40 in gleicher Weise wie murines TRAF an murines CD40?
2. Zeigt sich ein Unterschied bei der Rekrutierung von humanem TRAF an humanes oder murines CD40?

3. Gibt es einen Unterschied bei der Rekrutierung von murinen TRAFs an humanes oder murines CD40?
4. Lassen sich speziesspezifische TRAF-Rekrutierung mit Signaltransduktionsereignissen wie der Aktivierung von NF- κ B korrelieren ?

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. REAGENZIEN

Die Reagenzien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

6.1.1. ZELLEN UND ZELLKULTURMATERIAL

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Quelle
HEK293T	Humane Embryonale Nierenepithelzellen (freundlich überlassen von Dr. D. Wallach Weizmann Institut of Science)
BHKWT	Babyhamster Nierenzellen (ATCC CRL 6281)
BHKCD40L	Stabil mit CD40-Ligand-transfizierte BHK-Zellen (Hess et al., 1995)
A9	Zelllinie aus L-Zellen (ATCC CCL 1.4)
SP2	Mausmyelom (freundlich überlassen von Labor Prof. Dr. Rieber)
P3X63AG8.65	Mausmyelom (freundlich überlassen von Labor Prof. Dr. Rieber)

Das Zellkulturmedium Dulbecco's MEM-Glutamax-I-Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) enthielt 5% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (Boehringer Ingelheim, Ingelheim) und 1 mM Natrium-Pyruvat (alles von Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Das Kulturmedium der transfizierten Zelllinien BHK_{WT} und BHK_{CD40L}, wurde zusätzlich mit 200 µg/ml Geneticin G418 (Invitrogen) versetzt. Alle Zellen wurden in einer H₂O gesättigten Atmosphäre bei 37° C und 8% CO₂ kultiviert.

6.1.2. PUFFER

HeBS:

16,4 g/l NaCl, 11,9 g/l HEPES, 0,21 g/l Na-HPO₄; pH 7,05

TBS:

8 g/l NaCl, 0,38 g/l KCl, 0,2 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l Tris, 0,15 g/l CaCl₂, 0,1 g/l MgCl₂ (pH 7,5)

DEAE-Dextran:

10 mg/ml DEAE-Dextran in TBS

Hochsalzpuffer DEAE:

50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl pH 8,

TFB-Medium:

30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin (v/v)

TFBII-Medium:

10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % Glycerin, (pH 7.0)

Blockpuffer für ELISA:

PBS/0,05 % Tween/1 % BSA/NaN₃

Lysepuffer für Rekrutierungs-ELISA:

1 % Triton X, ca. 100 KIU Aprotinin/ml, 0.16 mM Pefablock, 0,1 % NaAzid, 1 % BSA in PBS

Citratpuffer:

0,1 M Zitronensäure, 196 mM Na₂HPO₄ 2H₂O und 0,006 % (v/v) H₂O₂

Substratpuffer für Reporterassay:

25 mM Glycylglycin, 60 mM DTT, 10 mM MgSO₄, 1 mM ATP und 35 µM Luziferin (P.J.K. Industrievertretung HandelMarketing GmbH, Kleinblittersdorf) pH 7,8

Lysepuffer für Reporterassay:

25 mM Glycylglycin pH 7,8, 10 mM MgSO₄, 0,5 % Triton X 100 und 1 % BSA

6.1.3. ANTIKÖRPER

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Quelle
Maus-IgG ₁ -anti-humanes-CD40 aus Kulturüberständen des Ro1-Hybridoms gereinigt	Ro1 (monoklonal)	Im Labor vorhanden
Kaninchen-anti-TRAF1 (G-20) (SC-983) gegen humanes TRAF1 Peptid, reagiert schlecht mit murinem TRAF1	K α TRAF1	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-TRAF2 (H-249 SC-7187) gegen die AS1-249 des humanen TRAF2	K α TRAF2	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-TRAF3 gegen humanes TRAF3 Peptid (AS5-25)	K α TRAF3	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen-anti-TRAF5 (H-257 SC-7220) gegen die AS1-257 des humanen TRAF5	K α TRAF5	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-TRAF6 (H-274 SC-7221) gegen die AS1-274 des humanen TRAF6	K α TRAF6	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-CD40 gegen den Extrazelluläranteil des humanen CD40	K α CD40	Im Labor vorhanden
Peroxidase-markiertes-Ziege-IgG-anti-Kaninchen-IgG (H+L)	G α RIgG(H+L)	Dianova, Hamburg

6.1.4. PRIMER UND cDNA-KLONE

Alle Primer wurden mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Computerprogramms Oligo 2.0 (National Biosciences Incorporation, Plymouth, MN, USA) ausgewählt und von der Firma Metabion, Martinsried hergestellt.

Die IMAGE cDNA-Klone der getesteten Rezeptoren wurden von der Firma UK HGMP Resource centre, Hinxton, Cambridge bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Primer

muT3 5'UTR EcoRI	5'GGCACAGAATTCCAGTTTCCTAAGA3'
muT3 3' 1923	5' CCCATGACGGCCTCCTGCTT 3'
muT6 5'UTR203 5'	5' CCCATGACGGCCTCCTGCTT 3'
muT6 3'1184	5' TCTTACTAGGCGACTCTCCA ACTG 3'
muCD40 902 Sall 3	5' TTCAAAGGTCGACAAGCAGC CAT 3'
muCD40 570MLUI 5'	5' TTAAAGTCACGCGTGCGAGC CCT 3'
muCD401-221MutPrimerAS	5' CAGGGGGTAACATCTCATTATGAATTCATT TCTTGACCACC 3'
muCD401-221MutPrimerSe	5' CAGGGGGTAACATCTCATTATGAATTCATT TCTTGACCACC 3'
muCD401-246mutPrimerAS	5' TCCTGCACTGGAGCGGCCGTTTAATGACCG GGA 3'
muCD401-246mutPrimerSE	5' TCCCGGTCATTAAACGGCCGCTCCAGTGCA GGA 3'
muCD40P237GE239AmutPrimerAS	5' TAATCTTCCA TGGCCTGGCC ATCTTGCCGT CGA 3'
muCD40P237GE239AmutPrimerSE	5' TCGACGGCAAGATGGCCAGGCCATGGAAGA TTA 3'

Tabelle 4

TRAF	IMAGE/ PCR	Benutzte Genbank- Sequenz Von – bis bp	Schnitt- stellen
muTRAF1	IMAGE 636225 (1547-c10)	NM_009421: 199 - 1838	5' Eco R I 3' Not I
muTRAF2	IMAGE 3985041 (9188-a10)	L35303: 2 - 2114	5' Sal I 3' Not I
muTRAF2A	IMAGE 2812602 (6961-m19)	L35303: 2 - 2114, nach bp 235 wurde AF02570 190-210 eingefügt	5' Sal I 3' Not I
muTRAF3	PCR A9 5'Primer: mT3 5'UTREcoRI 3'Primer: mT3 3' 1923	NM_011632: 632 - 1852	5' Eco RI 3' Xho I
	IMAGE 3156815 (7647-c24)	NM_011632: 1852 - 2717	5' XhoI 3' NotI
muTRAF5	IMAGE 568002 (1369-h19)	NM_011633: 196 - 2136	5' BamHI 3' BamHI
muTRAF6	PCR mit SP2cDNA 5'Primer: mT6 5'UTR203 3'Primer: mT63' 1184	D84655: 228 - 1141	5' BamHI 3' SmaI
	IMAGE 3417715 (8343-j20)	D84655: 1142 - 2312	5' SmaI 3' NotI

6.2. METHODEN

6.2.1. KLONIERUNG DER HYBRIDREZEPTOREN UND PLASMIDPRÄPARATION

6.2.1.1. RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde die saure Phenolmethode verwendet (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierbei wurden 1×10^7 Zellen in 1 ml Guanidinthiocyanat- Puffer lysiert. Die Isolierung erfolgte wie bei Kingston et al., 1991 beschrieben (Kingston et al., 1993). Folgende Reagenzien wurden verwendet: 2 M Natriumazetat pH 4,0 wassergesättigtes Phenol (Roth), Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) (ReadyRead, Appligene, Heidelberg). Vom Protokoll abweichend wurde aqua ad injectabilia (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) statt DEPC H₂O verwendet. Die gewonnene RNA wurde in 50 µl H₂O gelöst, mit 1 µl Rnase Inhibitor RNaseOUT (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) versetzt, spektrophotometrisch (Spektrophotometer U-3200, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) quantifiziert und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.2.1.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit MMLV-Reverse-Transkriptase (200 U/µl) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Vorschrift des Herstellers. 5 µg RNA wurden mit 1 µl 10 mM dNTP (Pharmacia) und 0,1 µl verdünnte 10x „random-hexamer“-Primer (Boehringer Mannheim, Mannheim) umgeschrieben. Die entstandene cDNA wurde mit H₂O auf 200 µl Endvolumen aufgefüllt und bei -20° C gelagert.

6.2.1.3. Präparative PCR

Jede PCR-Reaktion wurde jeweils fünffach angesetzt. Jeder Ansatz wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) in einem UNO-40-Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit folgendem Ansatz durchgeführt:

5 µl verdünnte cDNA, jeweils 250 ng 5'- und 3'-Primer, 5 µl dNTP (2 mM) (Pharmacia), 3 µl 10x pfu-Puffer, 1 U-pfu-DNA-Polymerase (Stratagen), H₂O ad 30 µl und 30 µl Mineralöl (Sigma).

Tabelle 5

PCR-Programm:	mT3	MT6 1184 3'	mCD40MLUI-SalI
Denaturieren	95° C, 2 min		
Denaturieren	95° C, 40 s		
Primerbindung	54° C, 40 s Zyklenzahl 10	54° C, 40 s Zyklenzahl 10	60° C, 40 s Zyklenzahl 30
Synthese	72° C, 3,5 min	72° C, 3 min	72° C, 2 min
Denaturieren	95° C, 40 s		
Primerbindung	58° C, 40 s Zyklenzahl 28	58° C, 40 s Zyklenzahl 21	
Synthese	72° C, 3,5 min	72° C, 3 min	
Synthese	72° C, 10 min		

Die PCR-Produkte wurden phenolisiert, gefällt, mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen MluI und SalI (jeweils 10 U) (Boehringer Mannheim) verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Produkte mit über 300 bp (bzw.

unter 300 bp) wurden in 1,5% (bzw. 3%) Agarosegelen (Pharmacia) mit 5 µg/ml Ethidiumbromid gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluß wurden sie mit Hilfe von DEAE-Zellulose präparativ isoliert.

6.2.1.4. Präparative Isolierung von DNA mittels DEAE-Zellulose nach gelelektrophoretischer Auftrennung

Zur Aktivierung wurde die DEAE-Zellulose (NA45, Schleicher & Schuell, Dassel) in geeignete, ca. 0,5 cm breite Streifen geschnitten, danach für 10 min in 10 mM NaEDTA pH 8, 5 min in 0,5 M NaOH getränkt und daraufhin mehrmals mit H₂O gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei 4° C in 0,1 mM NaEDTA. Zur DNA-Isolierung wurde das Agarosegel nach der Gelelektrophorese auf der anodalen Seite des zu isolierenden DNA-Fragmentes geschlitzt, und in den Spalt ein Streifen der aktivierten DEAE-Zellulose plaziert. Die DNA wurde ca. 5 min bei 100 V weiter elektrophoretisch aufgetrennt, um die Bindung der DNA an die Membran zu ermöglichen. Der DNA-haltige Zellulosestreifen wurde aus dem Gel herausgenommen, und die DNA wurde in 500 µl Hochsalzpuffer bei 65° C 30 min eluiert. Die DNA wurde nach Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989) mit Isopropanol gefällt und gewaschen. Die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgte mit Hilfe eines DNA-Standards im 3% bzw 1,5% Agarosegel.

6.2.1.5. Klonierung der humanen CD40-Expressionsplasmide

Der verwendete CD40-Klon, sowie die CD40-Mutanten huCD40ΔT2/6, huCD40T6X, huCD40ΔT2, huCD40T2X und huCD40T2XX waren bereits im Labor vorhanden und standen zur Verfügung. Sie wurden ebenfalls durch PCR-vermittelte Mutagenese mit Hilfe des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits“ von Stratagene generiert und nach dem bekannten Protokoll in den Vektor pEFBos inkloniert.

Zur Herstellung der Rezeptoren huCD40 Δ T2/6 und huCD40 Δ T2 wurde der humane Wildtyp-Rezeptor so mutiert, dass an Aminosäureposition 245 bzw. 222 ein Stopcodon entstand.

In humanem CD40T6X-Rezeptor wurde die Glutaminsäure in der Position 235 zu Alanin mutiert. Diese Mutation befindet sich im Bereich der postulierten TRAF6-Bindungsstelle und führt zu komplettem Funktionsverlust.

Für humanes CD40T2X wurde eine Mutation in der vermuteten TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle eingefügt. Hierfür wurde die Aminosäure an der Position 254 von Threonin zu Alanin (T254A) verändert. Die Mutante huCD40T2XX enthält zusätzliche Aminosäureaustausche an der Position 263 Glutamin und 264 Glutaminsäure (Q₂₆₃AE₂₆₄A), sowie an den Positionen 271 Isoleucin und 272 Serin (I₂₇₁AS₂₇₂A) zu Alanin.

6.2.1.6. Klonierung des human-murinen Wildtyp-Hybridrezeptors

Zur Klonierung der Hybridrezeptoren wurde der eukaryontische Expressionsvektor pEFBosASMCS benutzt. Dieser Vektor ist ein Derivat des ursprünglichen pEFBos-Vektors (Mizushima und Nagata, 1990) in den weitere Schnittstellen mit Hilfe eines NheI-XbaI Fragmentes des kommerziell erhältlichen pEGFP-N1-Plasmids eingefügt wurden. Die huCD40EZDmuCD40TM-IZD-Hybride wurden aus der humanen CD40-Extrazellulärdomäne (huCD40EZD) und der murinen Rezeptor-Transmembran- (TM) mit Intrazellulärdomäne (IZD) an der eingefügten MluI-Schnittstelle am Übergang der Extrazellulärdomäne zur Transmembrandomäne der humanen CD40-cDNA zusammenkloniert. Die MluI-Schnittstelle in der humanen CD40-cDNA wurde durch PCR-vermittelte Mutagenese mit dem „QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene eingefügt. Hieraus resultierte eine Mutation von Asparaginsäure zu Glutaminsäure an Position 190 (D190E) in der Aminosäuresequenz des humanen CD40-Rezeptors. Der murine CD40TM-IZD Anteil wurde mit Hilfe einer PCR mit X63cDNA und den Primern muCD40 570 MLUI und muCD40 902 Sall hergestellt. Die zum Umklonieren benötigten Schnittstellen wurden dabei durch PCR-vermittelte Mutagenese eingefügt. Hieraus resultiert eine Mutation der Aminosäure Methionin zu Valin an der Position 192 (M192V). Anschließend wurden die cDNA-Fragmente, die für

den transmembran- und intrazytoplasmatischen Bereich des murinen CD40-Rezeptors kodieren (MLUI/Sall) zusammen mit der für die Extrazellulärdomäne von humanem CD40-kodierenden cDNA (XbaI/MluI) in den pEGFPBos AS MCS einkloniert (vergleiche Abbildung 4).

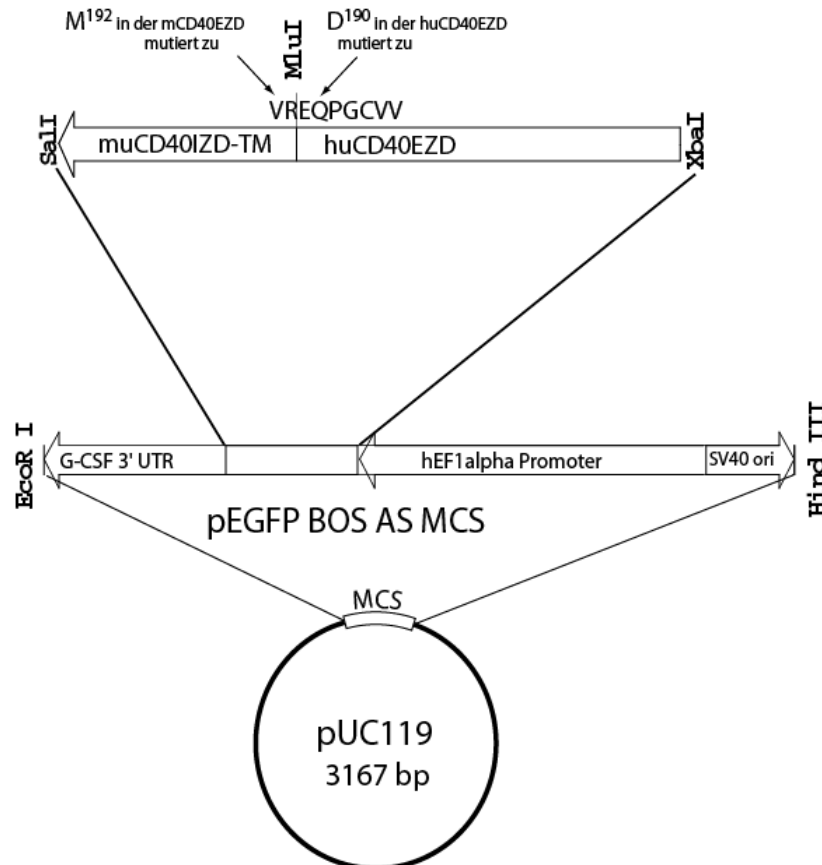


Abbildung 4: Klonierungskarte der Hybridrezeptoren. Dargestellt ist der Vektor pEGFPBos AS MCS, in den die Rezeptorhybrid-Sequenz (huCD40EZDmuCD40TM-IZD) einligiert wurde.

Der Plasmidvektor pEGFPBos AS MCS wurde hierfür mit den Restriktionsenzymen XbaI und SalI nach Vorschrift geschnitten und um eine Vektorreligation zu vermeiden mit 1 µl alkalischer Phosphatase 30 min bei 37° C (1U/µl Roche) dephosphoryliert. Jeweils 100 ng und 20 ng geschnittenes und gereinigtes huCD40EZD und muCD40TM-IZD PCR-Fragment wurden mit jeweils 20 ng verdautem und dephosphoryliertem Vektor, 1 µl 10x Ligasepuffer (Roche), 1 U T4 DNA-Ligase (Roche) und H₂O ad 10 µl für 24 h bei 16° C ligiert

6.2.1.7. Herstellung der murinen Rezeptormutanten

Die Mutationen im intrazytoplasmatischen Anteil von murinem CD40 wurden ebenfalls durch PCR-vermittelte Mutagenese mit dem „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene eingefügt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

Den humanen Rezeptoren entsprechend, wurden für die Deletionsmutanten muCD40 Δ T2/6 und muCD40 Δ T2 an der Position 222 bzw. 247 die Nukleotidsequenzen so verändert, dass ein Stopkodon entstand.

Die Mutante muCD40T6X entstand durch Mutationen der Aminosäuren Prolin zu Glycin an Position 237 (P237G) und Glutaminsäure zu Alanin an Position 239 (E239A).

Sowohl der Wildtyp-Hybridrezeptor als auch alle Rezeptormutanten mit humaner EZD und muriner TM-IZD werden im Folgenden nur noch als murine Rezeptoren bezeichnet.

Alle in dieser Studie verwendeten Rezeptoren und Rezeptormutanten sind in Abbildung 5 dargestellt.

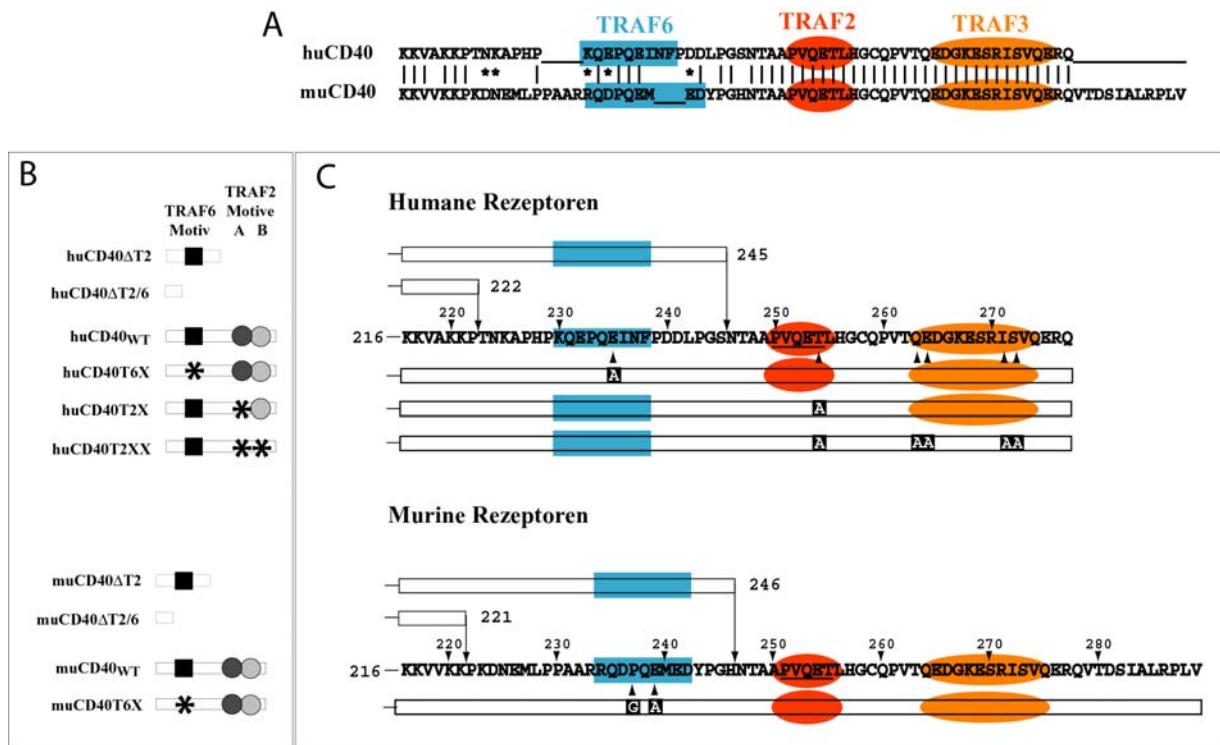


Abbildung 5: Sequenzvergleich der Intrazellulärdomänen von humanem und murinem CD40_{WT} sowie Darstellung der benutzten Konstrukte mit den eingefügten Mutationen und Deletionen. A: Sequenzvergleich von humanen und murinen CD40 mit den farblich hervorgehobenen TRAF-Bindemotiven. B zeigt die schematische Darstellung der Rezeptoren, die bei den Abbildungen im Ergebnisteil verwendet wurden. C zeigt die Rezeptorvarianten in Bezug zur Aminosäuresequenz und die darin eingefügten Mutationen und Deletionen

6.2.1.8. Klonierung der TRAF-Plasmide

Zur Klonierung der TRAF-Moleküle wurde in der Genbank nach den bereits bekannten Sequenzen gesucht. Mit Hilfe weiterer Genbanksequenzvergleiche wurden den Molekülen entsprechende EST-Sequenzen ermittelt, deren Plasmide beim IMAGE-Konsortium (siehe Tabelle 4, Spalte 2) erhältlich waren. Diese Plasmide wurden als Ausgang für die Klonierungen benutzt. Bei TRAF3 und TRAF6 waren nur Sequenzanteile als IMAGE-Klone erhältlich. Die fehlenden Teile wurden per PCR mit den in Tabelle 3 angegebenen Primern hergestellt. Die benutzten Genbank-Sequenzen sind in Tabelle 4 in Spalte 3 aufgelistet.

Alle DNS-Abschnitte wurden mit Hilfe der angegebenen Schnittstellen in den pCDNA3-Vektor ligiert. Die benutzten Schnittstellen waren im Gen oder im Ausgangsvektor vorhanden oder wurden mit PCR-vermittelter Mutagenese eingefügt. Alle Gene wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit geprüft.

Expressionsplasmide für humanes TRAF1, -2, -3, -5, und TRAF6 standen bereits aus früheren Arbeiten zur Verfügung (Hauer et al., 2005; Mullinax et al., 1996). Alle TRAFs waren in voller Länge in den pCDNA3-Vektor (Invitrogen GmbH) inkloniert.

6.2.1.9. Schnellpräparation und Überprüfung der Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Engbrecht et al., 1991). Vor der Fällung der DNA wurde eine zusätzliche Phenolextraktion durchgeführt. Mittels Restriktionsverdau und anschließender Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) wurde die Insertion der genspezifischen DNA und deren Sequenz verifiziert.

6.2.1.10. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Escherichia coli, DH5 α -Bakterien wurden in 500 ml TYM-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1 M NaCl, 10 mM MgSO₄) im Bakterienschüttler bei 37° C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei λ 550 nm kultiviert. Zur Kompetenzinduktion wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt, mit 2800 g und bei 4° C für 15 min zentrifugiert (Sorvall RC-5B Zentrifuge, Du Pont Instruments, Bad Homburg) und in 100ml eiskaltem, sterilfiltriertem TFB1-Medium vorsichtig resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Bakterien wiederum abzentrifugiert und in 20 ml eiskaltem TFB2-Medium aufgenommen. Diese Suspension wurde aliquotiert und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Dagert und Ehrlich, 1979).

6.2.1.11. Transformation

100 µl kompetente DH5α-Bakterien wurden mit 10 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 1-2-minütigen Hitzeschock von 42° C wurde das Gemisch wieder auf Eis gestellt und mit 1-2 ml LB-Medium verdünnt. Die Bakterien wurden eine Stunde lang bei 37° C im Bakterienschüttler kultiviert und anschließend auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausplattiert. Von jeweils 10 Einzelkolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert.

6.2.1.12. Großansatz zur Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Reinigung von größeren Mengen Plasmid DNA wurde nach der Methode des „Current Protocols in Molecular Biology“ das Prinzip der Alkalischen Lyse mit anschließender PEG-Präzipitation verwendet. Zusätzlich wurden die Plasmide über HPLC aufgereinigt.

6.2.2. ZELLKULTUR

6.2.2.1. Calcium-Phosphat-Transfektion in 293T-Zellen

3×10^5 Zellen wurden am Vortag in 6-well Zellkulturplatten in 2ml des verwendeten Zellkulturmediums ausgesät und über Nacht bei 37° C und 8% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die TRAF- und Rezeptor-kodierenden Plasmide wurden im Verhältnis von 4 µg:1 µg in 225 µl H₂O mit 25 µl 2,5 M CaCl₂ gemischt. Nach kurzer Inkubation bei 37° C wurden unter Vortexen 250 µl HeBS hinzugefügt. Nach erneuter 5-20-minütiger Inkubation im Wasserbad wurde die Mischung auf die Zellen getropft. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 6 Stunden.

6.2.2.2. Lyse

Die Lyse erfolgte aufgrund des Expressionsmaximums der Proteine nach ca. 30h. Die semiadhärenten Zellen wurden von den Zellkulturplatten abgelöst und in 1,5ml Eppendorf Gefäßen bei 2600 rpm in der Zentrifuge abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und auf Eis für 30 min in 180 µl Lysepuffer lysiert. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 3500 rpm wurden die Überstände gewonnen und bei -80° C aufbewahrt.

6.2.3. TRAF-REKRUTIERUNGS-ELISA

6.2.3.1. Rekrutierungs-ELISA

Eine ELISA-Mikrotiterplatte (Maxisorb von Greiner) wurde mit 5 µg/ml (bei TRAF2, TRAF3 und humanem TRAF1) oder mit 50 µg/ml (bei TRAF5, TRAF6 und murinem TRAF1) monoklonalem Antikörper gegen die CD40-Extrazellulärdomäne (Ro1) (Schwabe et al., 1997) in Coating-Puffer über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Proteine mit PBS/0,05% Tween/1% entfernt und noch freie unspezifische Bindungsstellen mit PBS/0,05% Tween/1% BSA/ NaN_3 geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurde die Platte mit je 50 µl der Probenverdünnungen beschickt. Der gebundene Rezeptor-TRAF-Komplex wurde mit den oben genannten anti-TRAF-Antikörpern (1:1000) und anschließend mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Immunglobulin nachgewiesen. Eine schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs ist in Abbildung 6 zu sehen. Als Substrat der Peroxidase dienten 1 mg in DMSO gelöstes TMB (Fluka, Buchs, Schweiz) und 2 µl H_2O_2 in 10 ml Substratpuffer. Nach 2-5 min wurde die Farbreaktion mit 1 M H_2SO_4 gestoppt, und die Absorption an einem ELISA-Reader (SLT, Crailsheim) bei der Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Menge des durch die Peroxidase umgesetzten Farbsubstrates entsprach der Menge des im Lysat vorhandenen Rezeptor-TRAF-Komplexes.

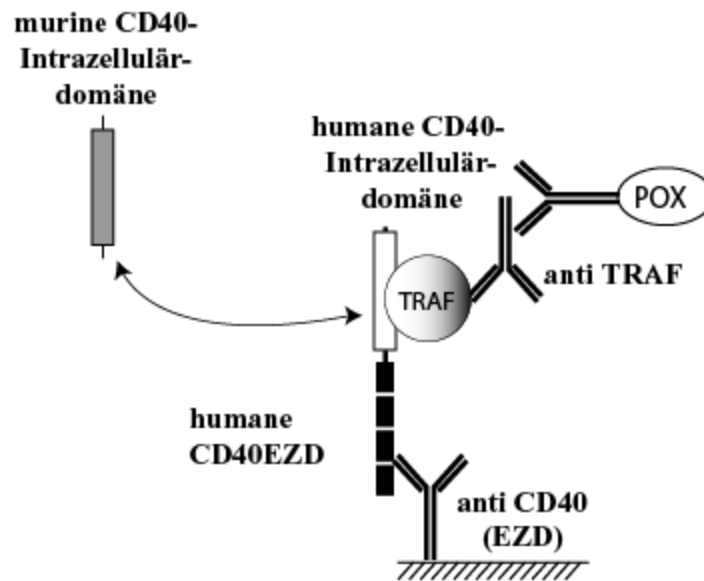


Abbildung 6: Schematisch Darstellung des TRAF-Nachweises an den Hybridrezeptoren im ELISA. Der Festphase-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die Extrazellulärdomäne des CD40-Rezeptors gerichtet ist. Der Nachweisantikörper erkennt das TRAF-Protein, das an die unterschiedlichen Intrazellulärdomänen gebunden ist. Der mit Peroxidase (POX) markierte Antikörper dient zum Nachweis der TRAF-Rezeptor Interaktion.

Als Standard wurde jeweils das Lysat des humanen Wildtyp-Rezeptors benutzt. Dieser wurde als 1000 Units/ml definiert. Die Rekrutierung der unterschiedlichen TRAFs an die Rezeptoren ist ausschließlich von der CD40-Expression abhängig, da die TRAFs stets im Überschuß vorhanden sind. Pilotexperimente mit unterschiedlichen Plasmidmengen zeigten, dass bei genügend großem TRAF-Überschuß das Ergebnis des Rekrutierungs-ELISAs nur allein von der CD40-Expression abhängig ist. Daher wurde ein 4:1-Überschuß des TRAF-Plasmids zur Rezeptor-cDNA benutzt. Um systematische Fehler, Zellverluste, Pipettierungenauigkeiten und unterschiedliche Transfektionseffizienzen auszugleichen, wurde zusätzlich die CD40-Konzentration in jedem Lysat bestimmt. Die Normierung wurde entsprechend der dargestellten Formel durchgeführt.

$$\frac{\text{CD40-TRAF-Komplex (arb. Units/ml)}}{\text{CD40-Konzentration (ng/ml)}} = \text{CD40-TRAF-Komplex pro CD40 (arb Units/ng)}$$

Zudem wurden TRAF-Rekrutierungsergebnisse relativ zur entsprechenden CD40_{WT}-TRAF-Rekrutierung dargestellt. Die TRAF-Bindung an CD40_{WT} wurde jeweils mit 100% gleichgesetzt.

6.2.3.2. Bestimmung der CD40-Expression im ELISA

Für die Bestimmung der CD40-Gesamtexpression wurde analog zu den oben beschriebenen ELISAs als Festphase-Antikörper der anti-CD40-Antikörper Ro1 (Schwabe et al., 1997) verwendet. Als Nachweisantikörper diente ein polyklonales Kaninchen-Immunglobulin, das gegen die Extrazellulärdomäne des CD40-Moleküls gerichtet ist. Das Peroxidase-konjugierte Ziege-IgG-anti-Kaninchen-IgG wurde verwendet um den ELISA zu entwickeln. Als Standard diente gereinigtes lösliches CD40 (Püschner, 2000)

6.2.3.3. Vorteile des verwendeten Transfektionssystems

Zur Messung der TRAF-Rekrutierung an die unterschiedlichen Rezeptoren wurden TRAF und Rezeptor in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Der bedeutende Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die TRAF-Rezeptor-Komplexbildung in einer intakten Zelle, unter der Voraussetzung einer intakten Zellarchitektur stattfindet. Püschner et al. konnten zeigen, dass die Rekrutierung der TRAFs an die Rezeptoren unter diesen Bedingungen wesentlich effizienter ist, als unter in-vitro-Bedingungen.

6.2.4. REPORTER-ASSAY ZUR DETEKTION VON NF- κ B-BINDUNG

6.2.4.1. Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in Flachbodenmikrotiterplatten in einer Dichte von 5000 Zellen pro well in 100 μ l DMEM mit 25 mM HEPES ausgesät. Nach Übernachtskultivierung bei 37° C in einer 8% CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen mit einem DNA-Plasmid-Mix transfiziert. Diese Mischung enthielt 180 ng/well des Luziferasereporters pIC277 Δ AP2pGL3Enh (Jahnke und Johnson, 1994; Jahnke et al., 1995) und verschiedene Mengen (20-0.6ng/well) der CD40-Hybridrezeptoren. Unterschiede in der DNA-Menge wurden mit leerem pEFBos-Vektor ausgeglichen. Die Transfektion wurde so durchgeführt wie früher beschrieben (Kingston et al., 1993). Die Plasmid-cDNA/CaCl₂-Lösung wurde mit vorgewärmtem HEPES-buffered-saline (HeBS) gemischt und anschließend für 20 min bei 37° C inkubiert. Die Präzipitate wurden mit Medium verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden weitere 15 Stunden bei 37° C und 8% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

6.2.4.2. DEAE/Dextran-Transfektion von A9-Zellen

A9-Zellen wurden in Flachbodenmikrotiterplatten in einer Dichte von 15000 Zellen pro well in 100 μ l DMEM mit 25 mM HEPES ausgesät. Nach Übernachtskultivierung bei 37° C in einer 8% CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen mit einem DNA-Plasmid-Mix transfiziert. Diese Mischung enthielt 180 ng/well des Luziferasereporters pIC277 Δ AP2pGL3Enh und verschiedene Mengen (20-0.6 ng/well) der CD40-Rezeptoren. Die Unterschiede in der DNA-Menge wurden mit leerem pEFBos-Vektor ausgeglichen. Hierfür wurden 500 ng CD40pEFBos und 4,5 μ g pIC277 Δ AP2pGL3Enh in 48 μ l TBS verdünnt und mit 80 μ l vorgewärmten DEAE-Dextran gemischt. Nach einer Verdünnung dieser Lösung mit 240 μ l Optimum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden 15 μ l/well auf die Zellen mit 50 μ l vorgelegtem Optimum gegeben. Nach 2 Stunden bei 37° C und 8% CO₂-Atmosphäre wurde 26 μ l/well 0,25 mM Chloroquin zugegeben und nach weiteren 1,5 h wurden die Zellen einem DMSO-Schock (1 min 10% DMSO in Ringerlösung) unterzogen. Die Zellen wurden weitere 16 h inkubiert.

6.2.4.3. Stimulation und Analyse der transfizierten Zellen

Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit in Formaldehyd fixierten BHK_{CD40L} oder BHK_{Neo} Zellen als Negativkontrolle stimuliert. Drei Stunden später wurden die Zellen in 100µl Lysepuffer lysiert. 50 µl von jedem Lysat wurden sofort auf 96-well-Lumineszenzplatten (Greiner) übertragen und mit 100 µl Luziferasesubstrat gemischt. Die Platten wurden im VictorTM –1420 MULTILABLE COUNTER analysiert.

Um die Luziferaseaktivität pro Rezeptor bestimmen zu können, wurde ebenfalls von jedem Lysat die CD40-Expression bestimmt.

Die dargestellten Titrationskurven der NF-κB-Aktivierung der getesteten Rezeptoren zeigen relative Lichteinheiten (rLE) korrespondierend zur Expression des Rezeptors von Interesse.

6.2.4.4. Das Reportersystem

Das Testsystem, welches für die Detektion von NF-κB in unserem Labor entwickelt wurde, ist ein Reporter-Assay mit Luziferase als Reporteragen. Der Promoteranteil des Reporterkonstruktes stammt aus dem ICAM1-Promoter. Die Promotersequenz enthält zwei Bindungsstellen für NF-κB. Durch Mutationsstudien wurde bestätigt, dass die Transkription des Luciferasegens ausschließlich von den NF-κB-Bindungsstellen abhängig ist. Mit diesem System ist es möglich die NF-κB-Aktivierung in Abhängigkeit zur Rezeptorexpression darzustellen (Jahnke und Johnson, 1994)

7. ERGEBNISSE

7.1. ADAPTATION DES TESTSYSTEMS FÜR DEN VERGLEICH ZWEIER SPEZIESVERSCHIEDENER REZEPTOREN

Das Testsystem, das in unserem Labor zur Messung der TRAF-Rekrutierung an TNF-Rezeptoren entwickelt wurde, beruht auf dem Prinzip eines ELISAs (vergleiche Abbildung 7) (Püschner, 2000).

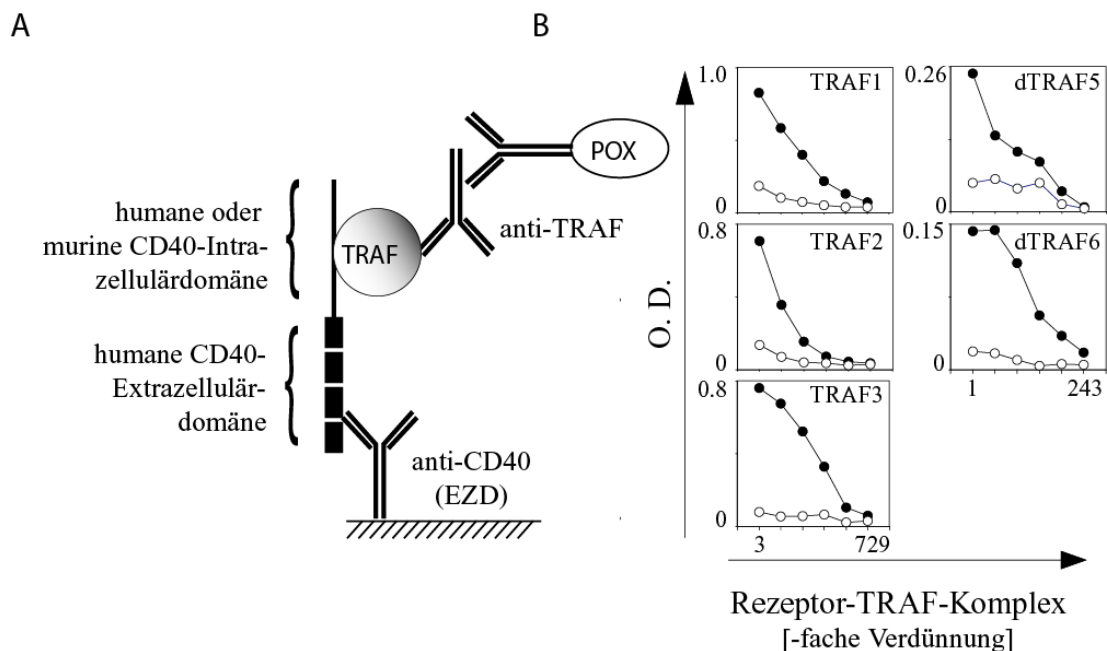


Abbildung 7: ELISA-Testsystem zur Detektion der TRAF-Rekrutierung an die Rezeptoren. A: Schematische Darstellung eines ELISAs zur vergleichenden Messung der TRAF-Rekrutierung an verschiedenen TNF-Rezeptoren. Die Verwendung von Receptorhybriden erlaubt die Messung der TRAF-Rekrutierung verschiedener intrazellulärer Rezeptorsignaldomänen mit dem gleichen anti-CD40-Antikörper. Dies ermöglicht den Vergleich der TRAF-Rekrutierung verschiedener Rezeptoren. **B** zeigt die Sensitivität des Testsystems für die TRAF-Rekrutierung der verschiedenen TRAFs an die Rezeptoren. Beispielhaft wird humanes CD40 (●) im Vergleich zu humanem CD40ΔT2/6 (○), der Negativkontrolle ohne Signaldomäne, dargestellt. Gezeigt ist die OD abhängig von der Rezeptor-TRAF-Konzentration (Püschner, 2000).

In dieser Studie wurde dieses System derart modifiziert, dass ein Vergleich verschiedener Rezeptorsignaldomänen hinsichtlich ihrer TRAF-Rekrutierungsfähigkeit möglich ist. Die intrazelluläre Rezeptorsignaldomäne sollte die einzige Variable in diesem System darstellen. Deshalb wurde ein Hybridrezeptor konstruiert, der die humane CD40-Extrazellulärdomäne

und die murine CD40-Intrazellulärdomäne enthielt (siehe Abbildung 4). Dies ermöglichte die vergleichende Messung der TRAF-Rekrutierung an die humane und murine CD40-Signaldomäne mit den gleichen Antikörperkombinationen. Ein technisch nicht vermeidbarer Nachteil dieses Meßsystems ergibt sich aus den verwendeten Nachweisantikörpern gegen die TRAF-Moleküle. Diese Antikörper wurden gegen Epitope humaner bzw. muriner TRAFs hergestellt. Ihre Kreuzreaktivität ermöglicht auch die Erkennung speziesunterschiedlicher TRAFs. Trotzdem ist, aufgrund geringfügiger struktureller Unterschiede zwischen humanen und murinen TRAFs, mit Bindungsunterschieden der Antikörper gegenüber dem Protein der jeweils anderen Spezies zu rechnen. Deshalb ist nur der Vergleich der Bindungsfähigkeit von murinem bzw. humanem TRAF an die verschiedenen Rezeptoren möglich. Die Rekrutierung von humanem und murinem TRAF an denselben Rezeptor kann nicht miteinander verglichen werden.

7.2. VERGLEICH DER TRAF-REKRUTIERUNG AN MAUS- UND MENSCH-CD40

Zur vergleichenden Bestimmung der TRAF-Rekrutierungsmuster wurden humane bzw. murine CD40-Transmembran- und CD40-Intrazellulärdomäne an die humane CD40-Extrazellulärdomäne fusioniert. Die Rezeptorhybride wurden in HEK293T-Zellen mit humanem bzw. murinem TRAF kotransfiziert. Dreißig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die TRAF-Rekrutierung gemessen. In den folgenden Abbildungen ist die Rekrutierung von humanem bzw. murinem TRAF an Wildtyp-CD40 sowie Rezeptormutanten beider Spezies gezeigt. Die TRAF-Rekrutierung an den humanen CD40_{WT}-Rezeptor wurde als 100% angenommen und dient als Referenzwert. Die TRAF-Rekrutierung an die getesteten Rezeptoren ist jeweils in Relation zu der Rekrutierung an CD40_{WT} dargestellt.

7.2.1. DIE TRAF1-REKRUTIERUNG ZEIGT SPEZIESUNTERSCHIEDE

Da die TRAF1-Bindestelle im humanen und murinen Rezeptor identisch ist, war anzunehmen, dass sich keine Speziespezifität zeigen würde. Die in Abbildung 8 gezeigten Ergebnisse konnten diese Erwartung jedoch nicht bestätigen.

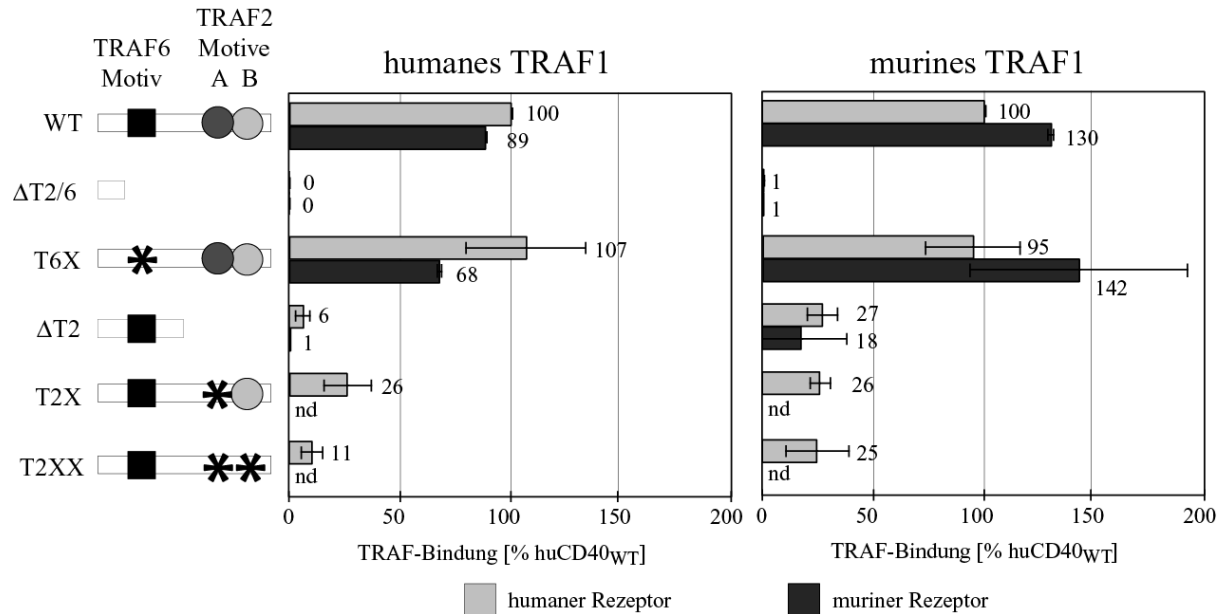


Abbildung 8: Rekrutierung von humanem und murinem TRAF1 an die korrespondierenden Rezeptoren: Zur vergleichenden Messung der TRAF-Rekrutierungsmuster wurden humane bzw. murine CD40-Transmembran- und CD40-Intrazellulärdomäne an die humane CD40-Extrazellulärdomäne fusioniert. Die Rezeptorhybride wurden in HEK293T-Zellen mit humanem bzw. murinem TRAF1 kotransfiziert. Dreißig Stunden nach Transfektion wurde die Zellen lysiert und die TRAF-Rekrutierung gemessen. Dargestellt ist die humane und murine TRAF1-Rekrutierung an den CD40-Wildtyp-Rezeptor sowie die Mutationsrezeptoren beider Spezies. Die TRAF-Rekrutierung an den humanen CD40-Wildtyp-Rezeptor wurde mit 100 % gleichgesetzt und dient als Referenz. Die Balkendiagramme zeigen die relative TRAF1-Rekrutierung als Mittelwerte von 2 Einzelmessungen. Die Rekrutierung an murines CD40T2X und muCD40T2XX wurde nicht durchgeführt und ist mit nd vermerkt.

Bei dem Vergleich der Rekrutierung von humanem und murinem TRAF1 an humanes bzw. murines CD40_{WT} wurde deutlich, dass sowohl humanes als auch murines TRAF besser an den jeweils spezieeigenen Rezeptor binden. Die Inaktivierung der TRAF6-Bindestelle (CD40T6X) beeinflusste weder die Rekrutierung von humanem noch die Rekrutierung von murinem TRAF1 an die korrespondierenden Rezeptoren. Wie bei den Wildtyp-Rezeptoren zeigte sich eine eindeutig nachweisbare Präferenz von murinem TRAF1 für die murine CD40-

Mutante und von humanem TRAF1 für die humane Mutante. Dies bedeutet, dass die Speziespräferenzen von TRAF1 nicht von einer gleichzeitigen TRAF6-Bindung abhängen. Da sich die beiden CD40-Rezeptoren nur im Bereich der TRAF6-Bindestelle, sowie dem äußersten C-Terminus unterscheiden, ist davon auszugehen, dass diese Abschnitte für die Speziesunterschiede verantwortlich sind. Bei der Austestung der CD40-Mutanten in denen die C-terminalen Anteile der Signaldomänen komplett deletiert waren (CD40 Δ T2) zeigte sich, dass die Sequenzen, die das TRAF6-Motiv umgeben, auch eine Rolle bei der TRAF1-Rekrutierung zu spielen scheinen. Sowohl murines als auch humanes TRAF1 waren in ihrer Bindung an diese Mutanten zwar deutlich eingeschränkt, aber nicht komplett blockiert. Interessanterweise wurde für humanes TRAF1 eine Speziespräferenz für die humane Mutante deutlich, die für murines TRAF1 nicht nachweisbar war. Humanes TRAF1 wies eine Restbindung von 6% an der humanen CD40-Mutante und keine nachweisbare Bindung an der murinen Mutante auf. Im Gegensatz dazu war für murines TRAF1 eine Restbindung von ca. 20% an den Rezeptormutanten beider Spezies nachweisbar. Die beiden CD40-Mutanten, in denen die postulierte TRAF1-Bindestelle einfach (CD40T2X) oder mehrfach (CD40T2XX) mutiert war, zeigte sowohl für humanes TRAF1 als auch für murines TRAF1 die erwarteten Bindungseinschränkungen. CD40T2X wies eine Restbindung von etwa 25% für TRAF1 beider Spezies auf. CD40T2XX zeigte eine Restbindung im Bereich von 11 bis 25% (vergleiche Abbildung 8). Die Spezifität der Bindungsassays ließ sich mit Hilfe der beiden Kontrollmutanten humanes und murines CD40 Δ T2/6 nachweisen. Keines der untersuchten TRAFs zeigt eine nachweisbare Bindung an diese Kontrollkonstrukte.

7.2.2. FÜR TRAF2 IST KEINE SPEZIESSPEZIFITÄT NACHWEISBAR

Neben humanem und murinem TRAF2 wurde auch die nur im Maussystem vorhandene „Spleiss“-Variante TRAF2A untersucht. TRAF2 interagiert, wie auch TRAF1, mit der zu 100% konservierten Domäne des CD40-Rezeptors. Unterschiede im Rekrutierungsmuster an die speziesverschiedenen Rezeptoren waren deshalb nicht zu erwarten. Dies bestätigte sich in den durchgeführten Untersuchungen. Alle drei TRAF2-Proteine binden ebenso gut an den murinen wie an den humanen Wildtyprezeptor (siehe Abbildung 9). Genauso verhielt es sich bei der Rekrutierung der Rezeptoren mit defekter TRAF6- aber noch intakter TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle. Auch hier banden die untersuchten TRAF2-Proteine an beide Mutanten gleich gut wie an den humanen Wildtyp-Rezeptor. Der Befund, dass die Deletion der TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindungsstelle (CD40 Δ T2) zu einem Bindungsausfall der TRAF2-Proteine führt (siehe Abbildung 9), war ebenfalls erwartet und demonstriert die Wichtigkeit der TRAF2-Bindestelle für die Rekrutierung dieser TRAFs.

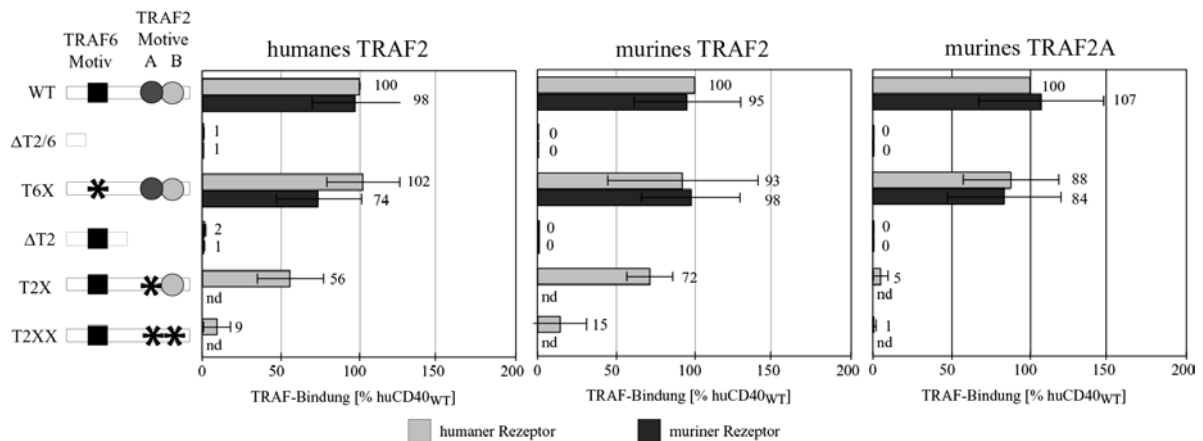


Abbildung 9: Rekrutierung von humanem und murinem TRAF2, sowie der murinen Spleissvariante TRAF2A an die korrespondierenden Rezeptoren: Dargestellt ist die humane und murine TRAF2- bzw. TRAF2A-Rekrutierung an den CD40-Wildtyp-Rezeptor sowie Mutationsrezeptoren beider Spezies. Die TRAF-Rekrutierung an den humanen CD40-Wildtyp-Rezeptor wurde mit 100 % gleichgesetzt und dient als Referenz. Die Balkendiagramme zeigen die relative TRAF2-Rekrutierung als Mittelwerte von 4 (muTRAF2) bzw. 5 (huTRAF2; muTRAF2A) Einzelmessungen. nd steht für Messungen, die nicht durchgeführt wurden.

Betrachtet man die Bindung an den humanen Rezeptor mit punktmutierter TRAF1-, -2-, -3-, -5-Stelle (CD40T2X), so stellt man eine leichte Rekrutierungsverminderung für humanes und

murines TRAF2 fest. Im Gegensatz dazu reduziert sich die Rekrutierung von murinem TRAF2A erheblich. CD40T2X wies für humanes und murines TRAF2 eine Restbindung um 60% auf. TRAF2A hingegen reagierte auf diese Mutation mit einer Verminderung der Rekrutierung auf 5% (siehe Abbildung 9). Entgegen der Erwartung sind also humanes und murines TRAF2 trotz defekter TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle noch deutlich in der Lage an diese CD40-Mutante zu binden, murines TRAF2A hingegen kaum noch. Ein vergleichbares Bindungsmuster zeigt sich auch für die CD40-Mutante mit weiteren Punktmutationen (CD40T2XX). Die Rekrutierung aller drei TRAF2-Proteine war weiter vermindert bzw. nicht mehr nachweisbar. Das Kontrollexperiment mit humanem und murinem CD40ΔT2/6 demonstrierte, wie schon für TRAF1, die Spezifität des hier verwendeten TRAF-Bindungstests.

7.2.3. HUMANES UND MURINES TRAF3 BINDEN SCHLECHTER AN DIE MURINEN REZEPTOREN

Auch für TRAF3 ist bekannt, dass es an das PxQxT-Motiv bindet, welches in beiden Rezeptoren identisch ist. Von einer Speziesspezifität war also nicht auszugehen. Der Vergleich des Rekrutierungsverhaltens von humanem und murinem TRAF3 ergab jedoch ein unerwartetes Ergebnis. Sowohl humanes als auch murines TRAF3 zeigten eine schlechtere Bindung an den murinen Rezeptor. Die Rekrutierung reduzierte sich jeweils auf ca. 2/3 des Ausgangswertes (siehe Abbildung 10). Die Mutation an der TRAF6-Bindestelle (huCD40T6X) hatte darauf keinen Einfluss. Murines TRAF3 wurde von der humanen Rezeptorvariante etwas besser rekrutiert als von der korrespondierenden Mausmutante. Wie erwartet, führte die Deletion der TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindungsstelle zu komplettem Bindungsausfall. Dies galt sowohl für humanes als auch für murines CD40. Eine Mutation im TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindemotiv PxQxT führte dagegen nicht zur Abschwächung der Rekrutierung. Humanes und murines TRAF3 binden an diese Mutante ebenso stark, wie an den humanen Wildtyp-Rezeptor. Erst zusätzliche Mutationen in den IS- und QE- Motiven des humanen CD40-Rezeptors reduzierten die Rekrutierung von humanem TRAF3 auf 1/10 des Ausgangswertes und blockierten die Bindung von murinem TRAF3 sogar komplett

(vergleiche Abbildung 10). Die Kontrollrezeptoren humanes und murines CD40 Δ T2/6 zeigten keine Rekrutierung von TRAF3.

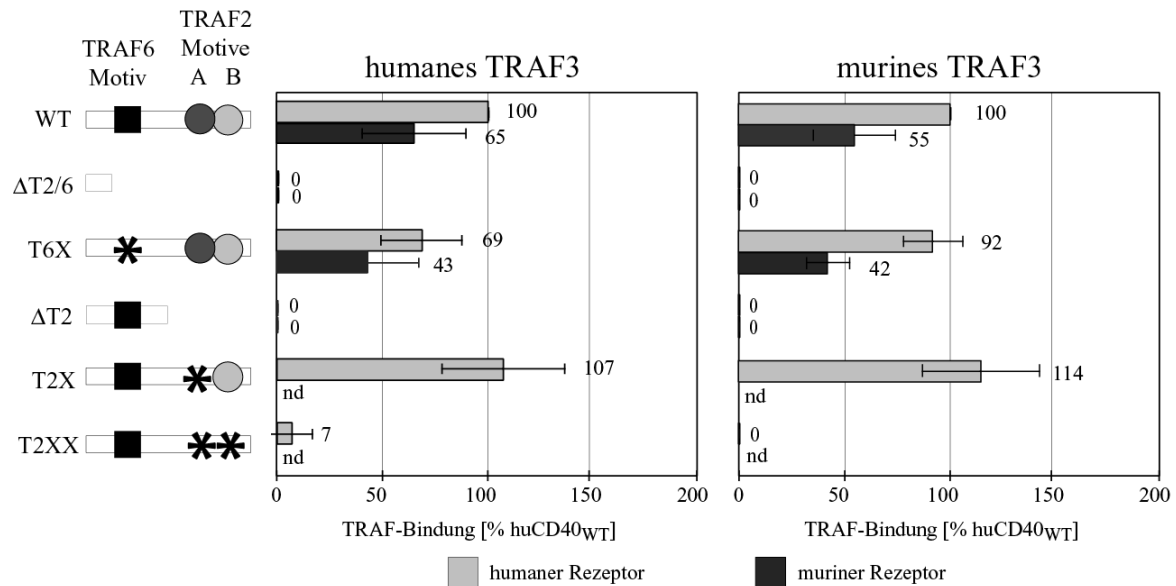


Abbildung 10: Rekrutierung von humanem und murinem TRAF3 an die korrespondierenden Rezeptoren: Dargestellt ist die humane und murine TRAF3-Rekrutierung an den CD40-Wildtyp-Rezeptor sowie Rezeptormutanten beider Spezies. Die TRAF-Rekrutierung an den humanen CD40-Wildtyp-Rezeptor wurde mit 100 % gleichgesetzt und dient als Referenz. Die Balkendiagramme zeigen die relative TRAF3-Rekrutierung als Mittelwerte von 4 (huTRAF3) bzw. 3 (muTRAF3) Einzelmessungen. nd = Messung wurde nicht durchgeführt.

7.2.4. SPEZIESUNTERSCHIEDE BEI DER REKRUTIERUNG VON TRAF5

Beim Rekrutierungsvergleich von TRAF5 an die beiden Wildtyp-Rezeptoren wird deutlich, dass sowohl humanes als auch murines TRAF5 etwa gleich gut mit beiden Rezeptoren interagieren (siehe Abbildung 11). Nachdem auch TRAF5 an die konservierten Rezeptorbereiche bindet und von keiner Speziespezifität auszugehen ist, war dies das erwartete Ergebnis. Es zeigte sich jedoch speziesspezifisches Bindungsverhalten durch eine Mutation in der TRAF6-Bindestelle. Rezeptoren mit dieser Mutation binden TRAF6 nicht mehr. Für TRAF5 resultierte daraus eine auf 150% gesteigerten Rekrutierung an den humanen Rezeptor. Die gleichzeitige Bindung von TRAF6 verschlechterte also die

Rekrutierung von TRAF5 an den humanen Rezeptor. TRAF5 und TRAF6 scheinen um die Bindung zu konkurrieren. Im Gegensatz dazu ist die TRAF-Bindung an die entsprechende murine Mutante deutlich reduziert (huTRAF5: 76%, muTRAF5: 51%). Im Vergleich zu seinem humanen Pendant war die Bindungskapazität für humanes TRAF5 auf die Hälfte vermindert, für murines TRAF5 betrug sie sogar nur 1/3 (Abbildung 11). TRAF6-Rekrutierung verbessert also die Bindung von TRAF5 an den murinen Rezeptor. Somit beeinflusst die TRAF6-Bindung die TRAF5-Rekrutierung abhängig von der Spezieszugehörigkeit des Rezeptors. Da sich humanes und murines CD40 nur durch die Sequenzen im Bereich der TRAF6-Bindestelle und am äußersten C-Terminus unterscheiden, ist davon auszugehen, dass diese strukturellen Unterschiede in Anwesenheit von TRAF6 zu gegenläufigem, speziesspezifischem Bindungsverhalten von TRAF5 führen.

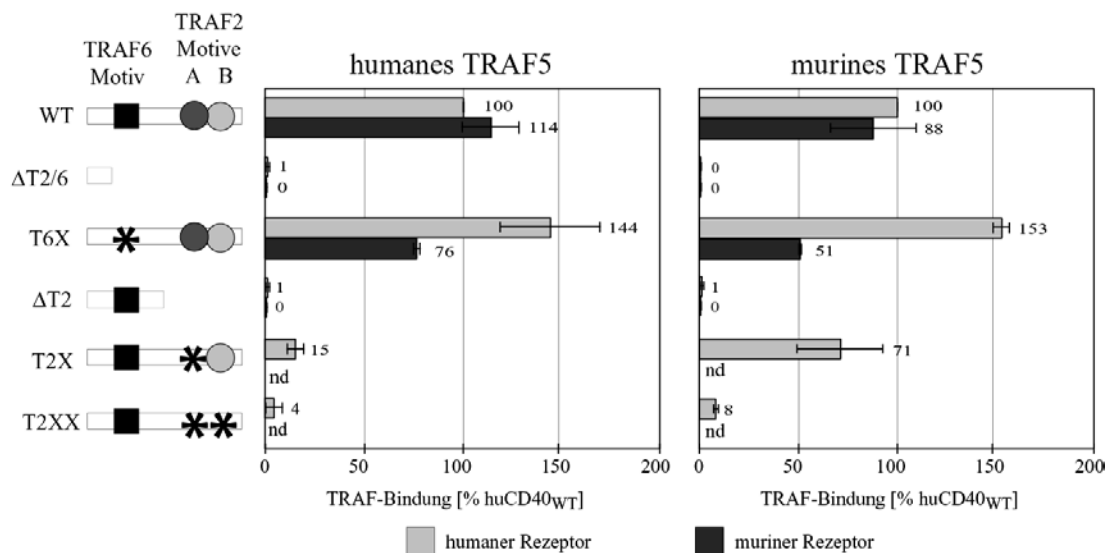


Abbildung 11: Rekrutierung von humanem und murinem TRAF5 an die korrespondierenden Rezeptoren: Dargestellt ist die humane und murine TRAF5-Rekrutierung an den CD40-Wildtyp-Rezeptor sowie Mutationsrezeptoren beider Spezies. Die TRAF-Rekrutierung an den humanen CD40-Wildtyp-Rezeptor wurde mit 100 % gleichgesetzt und dient als Referenz. Die Balkendiagramme zeigen die relative TRAF5-Rekrutierung als Mittelwerte von 3 (huTRAF 5) bzw. 4 (muTRAF5) Einzelmessungen.

An die CD40ΔT2 Mutanten, die eine Deletion der TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle aufweisen, war weder für humanes noch für murines TRAF5 eine Bindung festzustellen. Dies entsprach der Erwartung. Eine Mutation in der TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle (CD40T2X) führte

jedoch nicht zu einem kompletten Bindungsausfall (siehe Abbildung 11). Murines TRAF5 war sogar in der Lage noch sehr gut an diesen Rezeptor zu binden (70%), während sich die Rekrutierung von humanem TRAF5 deutlicher verminderte (15%). Eine drastische Bindungseinschränkung zeigte sich erst nach Mutation weiter distal gelegener Motive (CD40T2XX). Die Restbindung belief sich auf 4-8%. Verglichen mit dem einfach mutierten Rezeptor betrug sie also für humanes TRAF5 nur noch 1/3, für murines sogar nur noch 1/10. Auch humanes und murines TRAF5 zeigten keine nachweisbare Bindung an die Kontrollrezeptoren CD40ΔT2/6.

7.2.5. DEUTLICHE SPEZIESUNTERSCHIEDE IM REKRUTIERUNGSMUSTER VON TRAF6

Aus der Literatur war bekannt, dass die TRAF6-Bindestelle des humanen und murinen CD40-Rezeptors nur schwach konserviert ist. Deshalb erhob sich die Frage, ob sich auch das Bindungsmuster von TRAF6 an diese Rezeptoren unterscheiden würde. Bei der TRAF6-Rekrutierungsstudie (Abbildung 12) zeigte sich eine deutlich verminderte Rekrutierung beider TRAFs an die murinen Rezeptoren. Murines Wildtyp-CD40 band nur halb so viel humanes TRAF6, wie der korrespondierende humane Rezeptor. Paradoxerweise zeigte auch murines TRAF6 eine Präferenz für den humanen Rezeptor. Die Interaktion von murinem TRAF6 mit murinem CD40 war deutlich schlechter. Im Vergleich zu humanem CD40 rekrutierte der murine Rezeptor etwa 16-fach weniger murines TRAF6 (Abbildung 12). Wie erwartet verhinderte die Inaktivierung der TRAF6-Bindestelle die Rekrutierung beider TRAF6-Proteine an CD40. Das Fehlen der TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle (CD40ΔT2) führte trotz intaktem TRAF6-Bindemotiv jedoch ebenfalls zu erheblichen Bindungseinschränkungen. Während an den humanen Rezeptor weiterhin eine schwache Bindung beider TRAFs möglich war (11% bzw. 5%), war eine Rekrutierung an die murine Rezeptormutante nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 11). Da das korrespondierende Signal des murinen Wildtyp-Rezeptors mit TRAF6 bereits sehr niedrig war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Rezeptor muCD40ΔT2 TRAF6 noch sehr schwach binden kann, dies jedoch mangels Sensitivität des Testsystems nicht zu ermitteln war. Diese Ergebnisse zeigen, dass das

TRAF6-Motiv die TRAF6-Rekrutierung nicht alleine vermittelt, sondern die C-terminalen Abschnitte der CD40-Intrazellulärdomäne ebenfalls von Bedeutung sind.

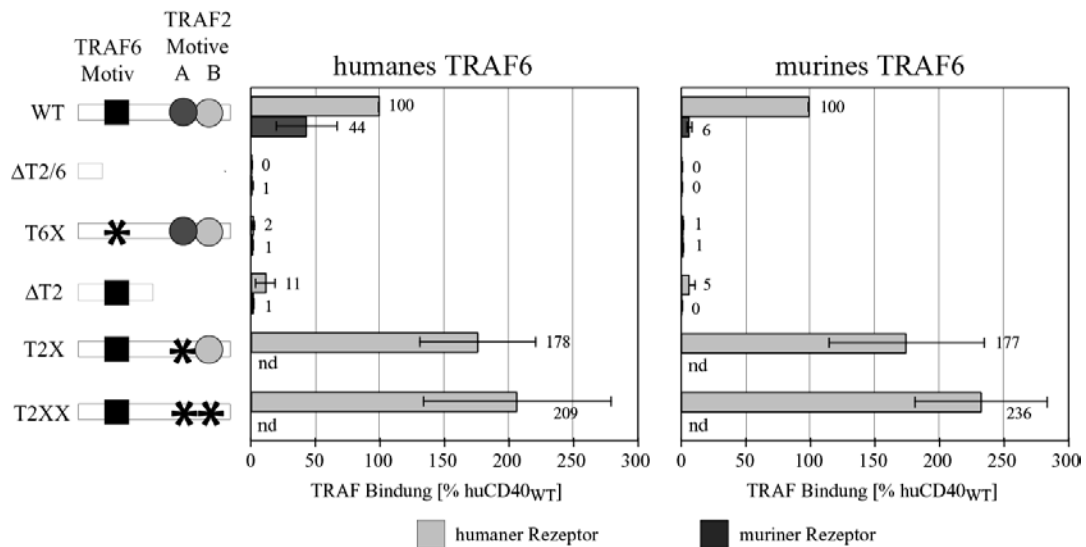


Abbildung 12: Rekrutierung von humanem und murinem TRAF6 an die korrespondierenden Rezeptoren in HEK293T-Zellen: Dargestellt ist die humane und murine TRAF6-Rekrutierung an den CD40-Wildtyp-Rezeptor sowie Mutationsrezeptoren beider Spezies in der humanen Zelllinie HEK293T. Die TRAF-Rekrutierung an den humanen CD40-Wildtyp-Rezeptor wurde mit 100 % gleichgesetzt und dient als Referenz. Die Balkendiagramme zeigen die relative TRAF6-Rekrutierung als Mittelwerte von 3 Einzelmessungen.

Dies bestätigt sich auch in Versuchen mit der CD40-Mutante deren TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle (CD40T2X) punktmutiert war. Im Vergleich zum humanen Wildtyp-Rezeptor war die Rekrutierung an diese Mutante sowohl für humanes als auch für murines TRAF6 auf 180 % gesteigert. Eine gleichzeitige Bindung von TRAF1, -2, -3 oder TRAF5 scheint also die Bindung von TRAF6 zu behindern. Deutlich wurde dies auch bei der Untersuchung des dreifach punktmutierten Rezeptors CD40T2XX. Die TRAF6-Rekrutierung stieg im Vergleich zum einfach mutierten Rezeptor nochmals an. Verglichen mit dem humanen Wildtyp-Rezeptor erreichte sie etwa doppelt so hohe Werte (vergleiche Abbildung 12). Humanes und murines TRAF6 zeigten keine Bindung an die Kontrollrezeptoren.

Die hier benutzte humane Zelllinie HEK293T weist relative hohe endogene TRAF6-Spiegel auf. Da der im Testsystem benutzte Nachweis-Antikörper Kaninchen-anti-TRAF6 gegen das humane TRAF6-Protein generiert wurde, war nicht auszuschließen, dass dieser vor allem das

rekrutierte endogene humane TRAF6 detektieren würde. Deshalb wäre es vorstellbar, dass der murine Rezeptor gut an murines TRAF6 bindet und die scheinbar verminderte Rekrutierungsfähigkeit des murinen Wildtyp-Rezeptors nur aufgrund der schlechten Sensitivität des verwendeten Testsystems suggeriert wird. Um dies auszuschließen, wurden die TRAF6-Rekrutierungsuntersuchungen zudem in murinen Zellen wiederholt, in denen ausschließlich murines TRAF6 vorhanden war. Diese Experimente bestätigten die in humanen Zellen erhobenen Ergebnisse.

7.3. AKTIVIERUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NF- κ B DURCH TRAFs

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Signalfunktionen der Rezeptoren mit den beobachteten Rekrutierungsmustern zu korrelieren. Hierzu wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Aktivierung von NF- κ B über TRAF2, -5 und TRAF6 vermittelt wird. Somit kann angenommen werden, dass alle Rezeptoren, die diese TRAF-Proteine rekrutieren können, auch NF- κ B aktivieren. Um dies zu testen wurde ein Reportergen benutzt, in dem die Expression des Luziferaseproteins unter der alleinigen Kontrolle der beiden NF- κ B-Bindestellen des ICAM1-Promotors stand (Jahnke und Johnson, 1994). Getestet wurden jeweils humaner und muriner CD40_{WT}-Rezeptor, der ein Mischsignal aus TRAF2, -5 und -6 hervorruft, CD40 Δ T2, eine Mutante die nur noch TRAF6 bindet und CD40T6X, welches nur noch TRAF2 und TRAF5 rekrutiert. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die gefundenen Rekrutierungsunterschiede auch zu Unterschieden in der NF- κ B-Aktivierung führen. Als Negativkontrolle wurde erneut die bereits bekannte CD40 Δ T2/6 Mutante verwendet, die keine Signaldomäne mehr besitzt

7.3.1. ERGEBNISSE DER NF- κ B-AKTIVIERUNG DER HUMANEN REZEPTOREN

Sowohl humaner als auch muriner CD40_{WT}-Rezeptor induzierten eine starke NF- κ B-Aktivierung (Abbildung 13). Diese war bereits ab einer Rezeptorexpression von 15.000 Rezeptoren/Zelle mit einer Luziferaseaktivität von 100.000 rLE messbar. Mit ansteigender Rezeptorexpression stieg auch das NF- κ B-Signal an. Bei einer Rezeptorexpression von 2×10^6 Rezeptoren/Zelle und einer Luziferaseaktivität von 550.000 rLE wurde schließlich ein Plateau erreicht und es wurde keine weitere Zunahme der Luziferaseaktivität trotz steigender Rezeptorexpression beobachtet. Die Mutante huCD40 Δ T2, die nur noch über TRAF6 signalisiert, benötigte eine 10-fach höhere Rezeptorexpression um ein dem Wildtyp vergleichbares Signal zu induzieren. Wie beim Wildtyp-Rezeptor war die Signalaktivität der Mutante expressionsabhängig (siehe Abbildung 13). Der über TRAF2 und TRAF5 signalisierende Mutationsrezeptor „CD40T6X“ bewirkte bei niedrigem Expressionsspiegel die gleiche NF- κ B-Aktivierung wie der humane Wildtyp-Rezeptor. Allerdings erreichte die Signalaktivität dieser Mutante bereits bei wesentlich geringerer Expression ein Plateau (320.000 rLE). Als Negativkontrolle diente wieder der humane CD40 Δ T2/6-Rezeptor, der weder TRAF2 oder TRAF5 noch TRAF6 bindet. Diese Mutante zeigte keine NF- κ B-Aktivierung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass huCD40 Δ T2 eine deutlich schwächer NF- κ B-Signalkapazität besitzt als hu CD40_{WT}. Die CD40-Mutante CD40T6X dagegen signalisierte bei niedriger Rezeptorkonzentration ähnlich gut wie der hu CD40_{WT}-Rezeptor, erreichte bei hoher Rezeptorkonzentration jedoch eine deutlich schwächere Signalamplitude. TRAF2 und TRAF5 scheinen somit sensitiver zu sein und eine frühere NF- κ B-Aktivierung zu bewirken, während TRAF6 die Höhe des Signals bestimmt. Fehlende TRAF6-Rekrutierung scheint sich also insbesondere auf die NF- κ B-Signalamplitude auszuwirken.

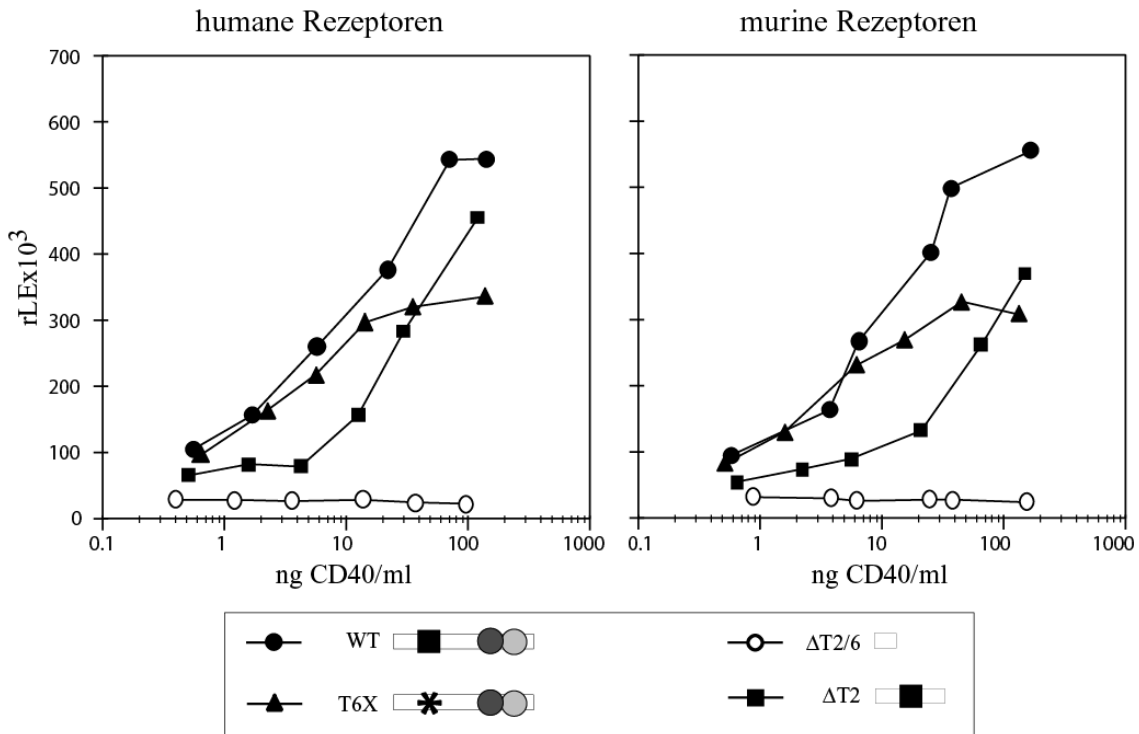


Abbildung 13: Vergleich der NF- κ B-Aktivierung der humanen und murinen CD40-Rezeptorhybride in der Zelllinie HEK293T. Rezeptorhybride bestehend aus humaner Extrazellulärdomäne sowie humaner bzw. muriner CD40-Transmembran- und Intrazellulärdomäne wurden transient in HEK293T-Zellen transfiziert. 15 Stunden nach Transfektion wurden die Rezeptorhybride mit CD40L stimuliert. Drei Stunden später erfolgte die Lyse der Zellen und Messung der Luziferaseaktivität. Gezeigt ist die gemessene Luziferaseaktivität als „relative Lichteinheiten“ (rLE) in Relation zur Expression der getesteten CD40-Rezeptorhybride.

7.3.2. NF- κ B-AKTIVIERUNG DURCH MURINES CD40

In Abbildung 13 ist auch die NF- κ B-Aktivierung durch murines CD40 gezeigt. Das NF- κ B-Aktivierungsmuster entsprach dem der humanen Rezeptoren. Auch beim murinen CD40_{WT} war ein Signal von 100.000 rLE ab einer Rezeptorkonzentration von 15.000 Rezeptoren/Zelle sichtbar, die mit steigender Rezeptorexpression anstieg. Wie beim humanen CD40 Δ T2 war auch bei dem entsprechenden murinen Rezeptor muCD40 Δ T2 im Bereich niedriger Expressionsspiegel kaum NF- κ B-Aktivierung nachweisbar. Das Signalpotential stieg erst bei einer Rezeptorkonzentration von 36.000 Rezeptoren/Zelle signifikant an und erreichte auch bei den höchsten getesteten Rezeptorspiegeln kein Plateau. Die maximale gemessene Luziferase-Aktivität von 400.000 rLE wurde bei einer CD40 Δ T2-Expression von 3×10^6 pro

Zelle gemessen. Um ein Luziferasesignal der selben Stärke wie der des murinen Wildtyp-Rezeptors zu induzieren, benötigte der muCD40 Δ T2 also eine höhere Rezeptorexpression (siehe Abbildung 13). Die Kurve von muCD40T6X verlief im Bereich niedriger Expressionsspiegel parallel zu der Kurve des murinen Wildtyp-Rezeptors. Beide Rezeptoren waren also wieder in der Lage bei niedrigen Rezeptorexpressionen gleich viel Luziferase zu aktivieren. Die murine CD40T6X Rezeptormutante erreichte das Maximum der Luziferase-Aktivität bei ca. 350000rLE und einer Rezeptorkonzentration $1,2 \times 10^6$ Rezeptoren/Zelle (Abbildung 13). Auch hier war der murine CD40 Δ T2/6-Rezeptor nicht mehr in der Lage NF- κ B zu induzieren.

7.3.3. MURINES CD40 ZEIGT DEUTLICH SCHWÄCHERE NF- κ B-AKTIVIERUNG ÜBER TRAF6

In den Rekrutierungsstudien zeigte sich, dass die humanen und murinen Rezeptoren CD40_{WT} und CD40T6X jeweils gleich gut TRAF2 und TRAF5 binden konnten. Daher war zu erwarten, dass diese Rezeptorvarianten NF- κ B speziesunabhängig mit gleicher Effizienz aktivieren würden. Die Rekrutierungsuntersuchungen für TRAF6 dagegen demonstrierten einen erheblichen Bindungsunterschied an den humanen und den murinen Wildtyp-Rezeptor. Es stellte sich die Frage, ob diese Unterschiede auch die NF- κ B-Aktivierung beeinflussen würden. Da bei den Wildtyp-Rezeptoren mit einem Mischsignal durch TRAF2, -5 und TRAF6 zu rechnen war, konnten diese nur bedingt für den direkten Vergleich der NF- κ B-Aktivierung durch die verschiedenen TRAF-Proteine herangezogen werden. Deshalb wurden die CD40T6X-Mutanten, die nur noch TRAF2 und TRAF5 rekrutieren können, und humanes und murines CD40 Δ T2, das nur noch TRAF6 bindet, getrennt verglichen (Abbildung 14).

CD40T6X signalisiert ausschliesslich über TRAF2 und TRAF5. Beim unmittelbaren Vergleich von humanem und murinen CD40T6X zeigten sich, wie erwartet, keine Unterschiede in deren NF- κ B-Signalkapazität. Für den isolierten Vergleich der TRAF6-vermittelten Signale wurden humanes und murines CD40 Δ T2, das nur noch TRAF6 bindet, verglichen (siehe Abbildung 14). Dabei zeigte sich, dass der murine Rezeptor ein schwächeres Signal induzierte und höher exprimiert werden musste, um das gleiche

Luziferasesignal hervorzurufen wie der humane Rezeptor. Dasselbe Ergebnis zeigte sich auch in der murinen Zelllinie A9 (Abbildung 14). Die Erwartung, dass murines CD40 Δ T2 aufgrund schlechterer TRAF6-Rekrutierung auch schlechter NF- κ B aktivieren würde, wurde somit bestätigt. Als Negativkontrollen wurden hier die CD40 Δ T2/6-Rezeptoren der jeweiligen entsprechenden Zelllinie verwendet. In beiden Fällen zeigten diese kaum noch NF- κ B-Aktivierung.

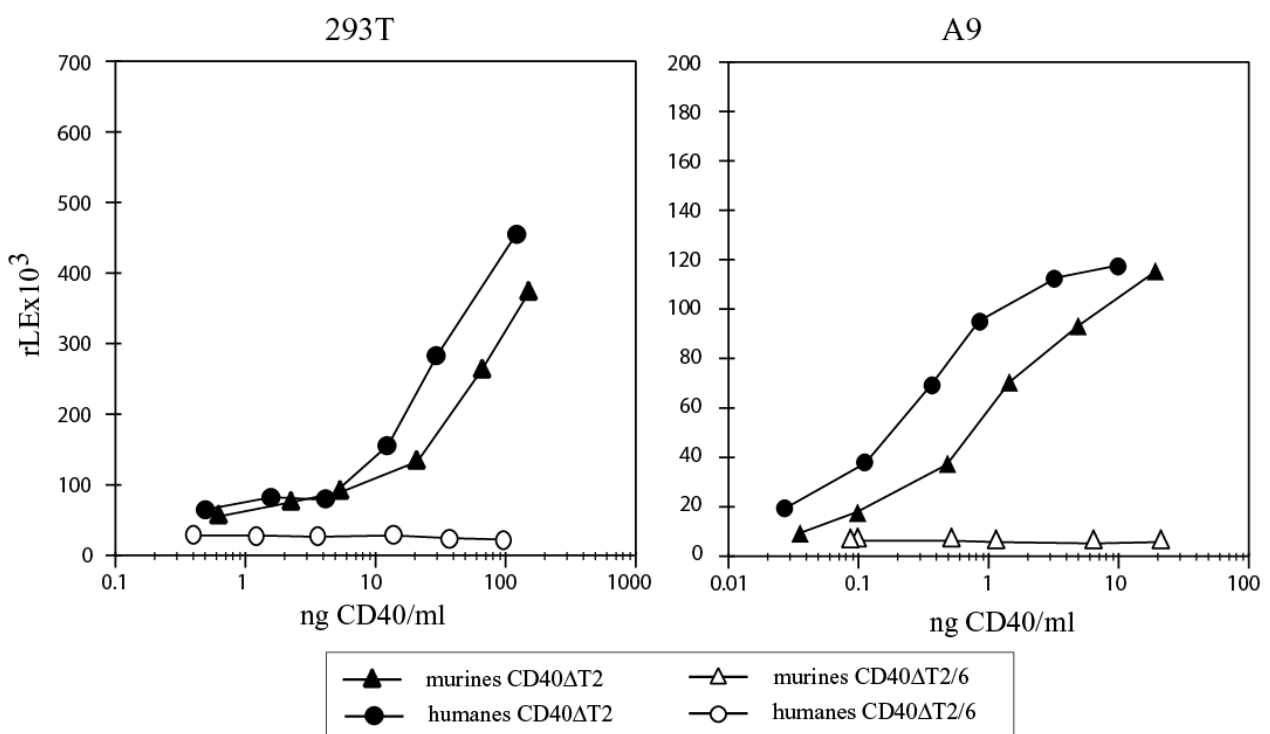


Abbildung 14: Vergleich der NF- κ B-Aktivierung der humanen und murinen Rezeptoren CD40 Δ T2 in der humanen Zelllinie HEK293T sowie in der murinen Zelllinie A9. Gezeigt ist die gemessene Luziferaseaktivität als „relative Lichteinheiten“ (rLE) in Relation zur Expression der getesteten CD40-Rezeptorhybride. 15 Stunden (HEK293T) bzw. 16 Stunden (A9) nach transients Transfektion der Rezeptorhybride, bestehend aus humaner bzw. muriner CD40-Transmembran- und Intrazellulärdomäne, wurde mit CD40L stimuliert. Nach weiteren drei Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen.

8. DISKUSSION

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen sollten die Frage klären, ob das TRAF-Rekrutierungsmuster an CD40 von der Spezieszugehörigkeit der Bindungspartner abhängt. Hierzu wurde die Bindung von humanen und murinen TRAF-Proteinen an speziegleiche bzw. spezieverschiedene CD40-Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten systematisch verglichen.

Aus Sequenzvergleichen zwischen humanem und murinem CD40 ist ersichtlich, dass der murine Rezeptor über elf zusätzliche Aminosäuren am äußersten C-Terminus verfügt. Die weiter N-terminal gelegenen Abschnitte von humanem und murinem CD40 sind auf einer Länge von 35 Aminosäuren komplett konserviert (Tsukamoto et al., 1999). In diesem Bereich befindet sich auch das PxQxT-Motiv, welches als zentrales Bindemotiv für TRAF1, -2, -3 und TRAF5 an CD40 identifiziert wurde (Aizawa et al., 1997; Akiba et al., 1998; Boucher et al., 1997; Devergne et al., 1996; Franken et al., 1996; Gedrich et al., 1996; Pullen et al., 1998; Sandberg et al., 1997; Ye et al., 1999a). Der Rezeptorbereich, in dem TRAF6 bindet, ist weniger gut konserviert (Ishida et al., 1996a; Tsukamoto et al., 1999). Es sollte festgestellt werden, ob die strukturellen Unterschiede in der Signaldomäne von humanem und murinem CD40 zu speziepezifischer TRAF-Rekrutierung führen.

Humane und murine TRAFs (TRAF1, -2, -3, -5 und TRAF6) weisen ebenfalls eine hohe Homologie von größer als 90% auf. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der humanen und murinen Bindungspartner, war deshalb lediglich im Fall von TRAF6 mit speziepezifischen Rekrutierungsmustern zu rechnen. Diese Erwartung konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Für TRAF1, -3, -5 und -6 war speziepezifisches Bindungsverhalten nachweisbar. Während humanes und murines TRAF1 eine bessere Rekrutierung an den jeweils spezieeigenen Rezeptor zeigten, banden die TRAF3-Proteine beider Spezies besser an humanes CD40. Die Rekrutierung von TRAF5 an CD40 war entscheidend von der gleichzeitigen Anwesenheit von TRAF6 und der Spezieszugehörigkeit des Rezeptors abhängig. TRAF6 interagiert unabhängig von der Spezieszugehörigkeit bevorzugt mit humanem CD40.

TRAF2 wies keine speziesspezifischen Präferenzen für humanes oder murines CD40 auf. Dafür erbrachten die Rekrutierungsuntersuchungen von TRAF2A, einer Spleissvariante, die bisher nur in der Maus nachgewiesen werden konnte (Brink und Lodish, 1998), einen unerwarteten Befund. TRAF2A, das sich nur durch sieben zusätzliche Aminosäuren im Bereich der Ringfingerregion von TRAF2 unterscheidet (siehe Anhang Abbildung 16), wies eine deutlich stärkere Abhängigkeit vom TRAF-Bindemotiv PxQxT auf als murines oder humanes TRAF2.

Trotz der Differenzen in der Aminosäuresequenz konnten bisher für Maus und Mensch keine über CD40-vermittelten Funktionsunterschiede festgestellt werden. Dies führt zu der Vermutung, dass zwischen Rezeptor und spezieseigenem TRAF-Protein eine Ko-Evolution stattgefunden haben könnte. Deshalb wurde erwartet, dass murines TRAF6 besser an den murinen CD40-Rezeptor binden würde, während humanes TRAF6 eine stärkere Affinität an den humanen Rezeptor aufwies.

8.1. TRAF2A LIEFERT HINWEISE AUF EINE BETEILIGUNG DER RINGFINGERSTRUKTUR AN DER REZEPTORBINDUNG

TRAF2 bindet über das Konsensusmotiv PxQxT direkt an CD40 (Franken et al., 1996; Park et al., 1999; Pullen et al., 1999; Pullen et al., 1998; Ye et al., 1999a). Die Aminosäuresequenzen von humanem und murinem CD40 unterscheiden sich im Bereich dieser TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle nicht (Tsukamoto et al., 1999). Auch die TRAF-C-Domänen von humanem und murinem TRAF2, welche die Bindung an den Rezeptor vermitteln, sind hochkonserviert (siehe Anhang Abbildung 16). Aufgrund der ausgeprägten Strukturhomologien der TRAF2-Proteine und der Rezeptorbindemotive war für die Rekrutierung von TRAF2 keine Speziesspezifität zu erwarten. Die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigten dies. Murines und humanes TRAF2 zeigten eine gleich gute Rekrutierung an die Rezeptoren mit intaktem TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindemotiv. Die Deletion des PxQxT-Motivs und der weiter C-terminal gelegenen Abschnitte (CD40 Δ T2) führte zu einem kompletten Bindungsausfall. Diese Beobachtung verdeutlicht nochmals die Bedeutung dieses Motivs für die TRAF2-

Rekrutierung. Eine Punktmutation der Aminosäure Threonin in Position 254 zu Alanin (CD40T2X), führte allerdings im Widerspruch zu den bisher veröffentlichten Beobachtungen nicht zu vollständigem Funktionsausfall. Sowohl für humanes als auch für murines TRAF2 war eine Restbindung von ca. 60% möglich. Vorherige Studien hatten gezeigt, dass die Mutation der Aminosäure Threonin im PxQxT-Motiv zu einem kompletten Bindungsausfall von TRAF1, -2 und TRAF3 führt (Cheng und Baltimore, 1996; Hu et al., 1994; Ishida et al., 1996b; Leo et al., 1999; Pullen et al., 1999) und essentielle Bedeutung für die CD40-Signaltransduktion besitzt (Sutherland et al., 1999). Die Bedeutung des PxQxT als zentrales Bindemotiv war auch in Kristallstrukturanalysen dargelegt worden (McWhirter et al., 1999; Ni et al., 2000; Park et al., 1999; Ye et al., 1999a). Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen eine entscheidende Rolle dieses Motivs für die Rekrutierung der TRAF1-, TRAF2- und TRAF5-Proteine, veranschaulichen jedoch auch, dass das PxQxT-Motiv keine essentielle Bedeutung für die TRAF-Rekrutierung besitzt. Die Mutation des Threonins reichte allein nicht aus um TRAF-Rekrutierung zu verhindern. Sowohl TRAF2, als auch TRAF1 und TRAF5 zeigten deutliche Restbindung an CD40T2X. Die Bindungsfähigkeit von TRAF3 war im Vergleich zum CD40-Wildtyp nicht beeinträchtigt. Weitere Punktmutationen in den C-terminal gelegenen Q₂₆₃E₂₆₄- und I₂₇₁S₂₇₂-Motiven des humanen Rezeptors waren notwendig, um die Bindung der TRAF2-Proteine, sowie die Bindung von TRAF3, und TRAF5, deutlich abzuschwächen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass der C-Terminus zur Bindungsstabilisierung an das PxQxT-Motiv beiträgt, wie dies bereits in früheren Arbeiten vermutet worden war (Bishop, 2004; Leo et al., 1999).

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zu humanem und murinem TRAF2, die Rekrutierung von murinem TRAF2A an CD40 wesentlich stärker von der Einfachmutation des Threonins in Position 254 betroffen war. Die Bindung von TRAF2A an CD40T2X reduzierte sich auf 5% des Wildtyp-Ausgangswertes. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, inwiefern sich humanes und murines TRAF2 von murinem TRAF2A unterscheiden und welche daraus resultierenden strukturellen Differenzen diese unterschiedlichen Bindungscharakteristiken erklären können. Da der einzige strukturelle Unterschied zwischen muTRAF2 und muTRAF2A sieben zusätzlich vorhandene Aminosäuren im Bereich der Ringfingerdomäne von TRAF2A sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Aminosäureinsertion für die hier gezeigten Rekrutierungsdifferenzen

verantwortlich ist. Brink et al. konnten demonstrieren, dass diese zusätzliche Aminosäuresequenz die Zinkbindung nicht verändern. Sie folgerten daraus, dass die Gesamtstruktur des Proteins dadurch, wenn überhaupt, nur unwesentlich beeinflusst wird (Brink und Lodish, 1998). Frühere Arbeiten demonstrierten, dass die Interaktion von TRAF2 ausschließlich von der TRAF-Domäne vermittelt wird (Rothe et al., 1994). Obwohl die Ring- und Zinkfingerstrukturen bisher nur für die Signalweiterleitung verantwortlich gemacht wurden (Bishop, 2004; Dempsey et al., 2003), weisen die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass diese Motive in TRAF2 auch einen Einfluss auf die TRAF-Rekrutierung ausüben.

Eine mögliche Bindungsbeeinflussung durch die Ringfingerregion könnte direkt oder indirekt erfolgen. Denkbar ist, dass TRAF2 zwar über das PxQxT-Motiv an den Rezeptor gebunden wird, die Interaktion jedoch durch eine zusätzliche Bindung der Ringfinger mit anderen Rezeptorbereichen außerhalb des PxQxT-Motivs stabilisiert wird. Hierfür könnten zum Beispiel die Q₂₆₃E₂₆₄- und I₂₇₁S₂₇₂-Motive des Rezeptors von Bedeutung sein. Sollte die Insertion der sieben Aminosäuren im TRAF2A zur Folge haben, dass diese Bindungsstabilisierung nicht möglich ist, wäre TRAF2A, wie in dieser Studie gezeigt, allein vom PxQxT-Motiv abhängig.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die veränderten Rekrutierungscharakteristiken von TRAF2A wäre, dass TRAF2A im Gegensatz zu TRAF2 nicht in der Lage ist NF- κ B zu aktivieren. Dies wurde in einer Studie von Brink und Lodish bereits gezeigt (Brink und Lodish, 1998). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wäre zum Beispiel vorstellbar, dass TRAF2 durch seine zusätzliche Signalaktivität fördernden Einfluss auf die CD40-TRAF2-Interaktion hat. Besitzt TRAF2A durch den veränderten Ringfinger diese Signalaktivitäten nicht, wäre seine Rekrutierung an CD40 stärker von dem zentralen Bindemotiv PxQxT abhängig.

Brink et al. hatten außerdem gezeigt, dass sich TRAF2A von TRAF2 auch in seinem zellulären Umsatz unterscheidet (Brink und Lodish, 1998). TRAF2A ist durch eine kürzere biologische Halbwertszeit gekennzeichnet. Damit drängt sich die Frage auf, ob diese Besonderheit auch die hier erhobenen Befunde erklären könnte. Eine verkürzte Halbwertszeit sollte sich allerdings gleichsinnig auf die Rekrutierung an CD40_{WT} und CD40T2X auswirken. Unsere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass dies nicht der Fall ist. Der relative Unterschied zwischen der Bindung an CD40_{WT} und an CD40T2X ist für TRAF2A deutlich

größer als für TRAF2. Hinzu kommt, dass HEK293T-Zellen TRAF1 und TRAF2 exprimieren. Brink et al. hatten dargelegt, dass beide TRAF-Proteine TRAF2A durch Heteromerisierung stabilisieren (Brink und Lodish, 1998). Somit ist eine verkürzte Halbwertszeit als Erklärungsmöglichkeit für die hier gezeigten Rekrutierungsdifferenzen eher unwahrscheinlich.

Über die Funktion von TRAF2A kann derzeit nur spekuliert werden. TRAF2 vermittelt über die Ring-Zinkfingerstrukturen mehrere Funktionen. Zum einen fördert es die Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Protein-Kinase (JNK), zum anderen aktiviert es NF- κ B, einen wichtigen Transkriptionsfaktor der Entzündung (Rothe et al., 1995b). Die Aktivierung der JNK erfolgt unabhängig von der Ringfingerregion, ist jedoch auf die Zinkfinger motive angewiesen. Da sich die Zinkfinger motive in TRAF2 und TRAF2A nicht unterscheiden, ist anzunehmen, dass beide TRAF-Varianten JNK aktivieren. TRAF2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung erfordert den N-terminalen Ringfinger sowie die ersten zwei Zinkfinger (Dadgostar und Cheng, 1998; Takeuchi et al., 1996). Wie von Brink et al. gezeigt, ist TRAF2A nicht in der Lage NF- κ B zu aktivieren. TRAF2A hemmt sogar die über TRAF2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung (Brink und Lodish, 1998). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass TRAF2A das CD40-Signal von einem kombinierten NF- κ B-JNK-Modus auf einen reinen JNK-Modus umschaltet.

TRAF2A wurde bisher nur in der Maus nachgewiesen. Daher stellt sich die Frage, welches Protein diese Regulatorfunktion im menschlichen Organismus übernimmt. Ein potentieller Kandidat wäre TRAF3. Jüngste Untersuchungen zeigen, dass im humanen System TRAF3 in der Lage ist die NF- κ B-Aktivierung über TRAF2/5 zu blockieren und hin zu einer TRAF6-vermittelten NF- κ B-Aktivierung über p50/RelA zu verschieben (Hauer et al., 2005). Wie TRAF3 die Aktivierung der JNK beeinflusst ist noch nicht untersucht.

Welche dieser Spekulationen wirklich zutrifft, kann nur in weiteren Studien geklärt werden. TRAF2A scheint jedoch ein wichtiger Unterschied im Signaltransduktionsapparat von Mensch und Maus zu sein. Inwieweit er Auswirkungen auf die Biologie von CD40 hat, bleibt ebenfalls zu klären.

8.2. BEDEUTUNG DES TRAF6-VERMITTELTEN SIGNALTRANSDUKTIONSWEGES IN DER MAUS

Tsukamoto et al. hatten gezeigt, dass humaner und muriner CD40-Rezeptor im Bereich der TRAF6-Bindestelle nur schwach konserviert sind (Tsukamoto et al., 1999) Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob dadurch auch Differenzen im Bindungsverhalten der TRAF6-Proteine festzustellen sind.

Im Hinblick auf die identische Biologie von humanem „Hyper-IgM-Syndrom“ und der „CD40L-Knock-out“-Maus war anzunehmen, dass die Signaltransduktionswege keine Speziesunterschiede aufweisen. Basierend auf dieser Annahme wurden viele CD40-Signaltransduktionsstudien ohne Rücksicht auf eventuell bestehende Speziesunterschiede im Signaltransduktionsapparat durchgeführt. Die hier gezeigten Experimente ergaben für TRAF6 einen weiteren Speziesunterschied zwischen humaner und muriner CD40-Signaltransduktion. Humanes wie murines TRAF6 zeigten eine eindeutige Rekrutierungspräferenz an humanes CD40. Es stellt sich deshalb die Frage, ob TRAF6 bei der CD40-Signaltransduktion der Maus eine andere Rolle spielt als beim Menschen. Bisher nachgewiesene Signalfunktionen von TRAF6 sind die Aktivierung von NF- κ B (Ishida et al., 1996a), JNK (Hsing und Bishop, 1999; Jalukar et al., 2000) und ERK (Kashiwada et al., 1998). Im Hinblick auf die wichtige Funktion von NF- κ B wurde hier die Signalaktivität einer humanen CD40-Mutante, die nur über TRAF6 signalisiert (CD40 Δ T2), mit der korrespondierenden murinen CD40-Mutante verglichen. Dabei fiel auf, dass murines CD40 TRAF6 nicht nur deutlich schlechter rekrutiert, sondern auch ein deutlich schwächeres TRAF6-abhängiges NF- κ B-Signal erzeugt.

Neuere Arbeiten zeigen, dass CD40 NF- κ B, abhängig von den jeweils beteiligten TRAF-Proteinen, über zwei verschiedene Wege aktiviert wird (Bonizzi und Karin, 2004; Coope et al., 2002; Hauer et al., 2005; Pomerantz und Baltimore, 2002). TRAF6 aktiviert NF- κ B über den sogenannten klassischen Weg, das heißt über die Translokation der Proteine p50 und Rel A in den Zellkern (Hauer et al., 2005). Dieser Weg ist von besonderer Bedeutung für die Vermittlung von Entzündungsreaktionen und für den Schutz vor Apoptose (Bonizzi und Karin, 2004). Ob das abgeschwächte TRAF6-Signal im Maussystem Rückwirkungen auf diese Funktionen hat, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Im Hinblick auf die

Ergebnisse aus den „CD40L-Knock-out“-Experimenten ist es eher zu erwarten, dass das abgeschwächte TRAF6-Signal durch weitere Maus-spezifische Mechanismen kompensiert wird.

Signaltransduktion auf der CD40-TRAF6-Achse ist in der Maus sicherlich nicht ohne Bedeutung. In-vivo-Studien demonstrierten, dass sie zum Beispiel eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Plasmazellen und hoch-affinen Antikörpern spielt (Ahonen et al., 2002). Ahonen et al. arbeiteten dabei ebenfalls mit Hybridrezeptoren, welche aus der humanen CD40-Extrazellulärdomäne und der murinen CD40-Transmembran- und Intrazellulärdomäne bestanden. Dieses Vorgehen resultierte aus dem von Ahonen et al. geäußerten Verdacht, dass es speziesspezifische Unterschiede bei den Interaktionen zwischen CD40 und seinen Signalproteinen gibt (Ahonen et al., 2002). Die hier gezeigten Befunde bestätigen die Richtigkeit dieses von Ahonen et al. gewählten experimentellen Ansatzes.

8.3. TROTZ VOLLSTÄNDIG KONSERVIERTEM BINDEMOTIV WERDEN HUMANES UND MURINES TRAF1 BESSER AN DEN SPEZIESEIGENEN REZEPTOR REKRUTIERT

Auch für TRAF1 war bekannt, dass es an das PxQxT-Motiv des CD40-Rezeptors bindet. Da dieses im humanen und murinen CD40 zu 100% konserviert ist, war nicht davon auszugehen, dass sich humanes und murines TRAF1 in ihrem Bindungsverhalten an CD40 unterscheiden. Die hier erhobenen Befunde zeigen jedoch, dass humanes TRAF1 besser an den humanen Rezeptor und murines TRAF1 besser an den murinen Rezeptor bindet. Die Analyse der CD40-Mutante mit inaktivierter TRAF6-Bindestelle (CD40T6X) zeigte diesen Speziesunterschied sogar noch deutlicher. Da TRAF1 über die vollständig konservierte CD40-Region rekrutiert wird, lässt sich dieser Speziesunterschied nur über Strukturunterschiede zwischen humanem und murinem TRAF1 erklären. Bei der Betrachtung der beiden TRAF1-Proteine fällt auf, dass sie sich in den Aminosäuresequenzen ihrer TRAF-Domänen in nur 13 Aminosäuren unterscheiden (vergleiche Anhang Abbildung 15). Dies zeigt, dass auch sehr geringe strukturelle Unterschiede zu messbaren Rekrutierungsunterschieden führen können.

Bei den TRAF1-Rekrutierungsanalysen fiel auch auf, dass die Deletion der C-terminalen Rezeptorabschnitte (CD40 Δ T2) nicht zu einem Bindungsausfall von TRAF1 führte. Trotz fehlendem TRAF1-Bindemotiv, war eine TRAF1-Restbindung von 6-27% messbar. Diese Beobachtung legt nahe, dass Strukturen in der Umgebung des TRAF6-Bindemotivs, welches im CD40 Δ T2-Rezeptor noch intakt ist, bei der TRAF1-Bindung eine Rolle spielen. Dieser Befund war unerwartet, da TRAF2, -3 und TRAF5, die wie TRAF1 an die CD40-Region binden, die bei Maus und Mensch identische Struktur aufweist, nicht an CD40 Δ T2 binden konnte. Eine Erklärung für diesen paradoxen Befund erfordert weitere strukturelle Analysen der TRAF1-CD40-Interaktion.

8.4. TRAF6 BEEINFLUSST DIE TRAF5-BINDUNG

Für TRAF5 ist bekannt, dass es wie TRAF1, -2 und TRAF3 an das vollständig konservierte PxQxT-Motiv des CD40-Rezeptors bindet (Pullen et al., 1998). Der Erwartung entsprechend, zeigten sich keine Bindungsunterschiede von humanem und murinem TRAF5 an die Wildtyp-Rezeptoren. Auch die Analyse von Rezeptormutanten mit deletierter TRAF1-, -2-, -3-, -5-Bindestelle (CD40 Δ T2) zeigte keine unerwarteten Bindungsunterschiede. Genau wie TRAF1, -2, und TRAF3, war auch TRAF5 weiterhin in der Lage an den Rezeptor mit einfach mutiertem Bindemotiv zu binden. Dies bestätigte erneut, dass neben dem PxQxT-Motiv auch andere Rezeptorabschnitte für die Rekrutierung von TRAF1, -2, -3 und TRAF5 bedeutsam sind.

Ein bemerkenswerter Nebenbefund ergab sich bei der Analyse der CD40-Mutante mit inaktiviertem TRAF6-Bindemotiv. Diese Mutation beeinflusste auch die TRAF5-Rekrutierung deutlich. Am humanen Rezeptor bewirkte die Inaktivierung des TRAF6-Bindemotivs eine gesteigerte Rekrutierung. Im murinen CD40 führte diese Mutation zu leicht verminderter TRAF5-Rekrutierung. Eine mögliche Erklärung für diesen paradoxen Befund ergibt sich aus der Tatsache, dass murines CD40 deutlich schwächer mit TRAF6 interagiert. Unter der Annahme, dass die Bindung von TRAF6 an CD40 die Verfügbarkeit der TRAF5-Bindestelle reduziert, wäre zu erklären, warum die Elimination der TRAF6-Bindestelle im

humanen CD40 zu einer deutlichen Verbesserung der TRAF5-Rekrutierung führt. Im murinen System ist die CD40-TRAF6-Interaktion deutlich schwächer (siehe Kapitel 8.2.). Deshalb ist zu erwarten, dass der Einfluss von TRAF6 auf die TRAF5-Rekrutierung ebenfalls deutlich schwächer ist. Damit führt die Elimination der TRAF6-Bindung im murinen System auch nicht zu erhöhter TRAF5-Rekrutierung. Der Befund, dass diese Mutation im Maus-CD40 sogar zu verschlechterter TRAF5-Rekrutierung führt, ist ohne zusätzliche strukturelle Analysen nicht zu erklären. Er weist jedoch auf weitere, bisher nicht entdeckte Unterschiede im CD40-Signalapparat von Maus und Mensch hin.

8.5. TROTZ UNTERSCHIEDLICHER BINDUNGSCHARAKTERISTIKEN ZEIGEN MAUS UND MENSCH ÄHNLICHE ÜBER CD40-VERMITTELTE KRANKHEITSBILDER

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten deutliche TRAF-Rekrutierungsunterschiede an CD40 im humanen und murinen System auf. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit diese beiden Systeme miteinander vergleichbar sind und Untersuchungsergebnisse, die in der Maus gewonnen werden, auf den Menschen übertragen werden können.

Das korrekte Funktionieren CD40-vermittelter Signalwege ist von wesentlicher Bedeutung für den Organismus. Ein Ausfall des CD40-Liganden führt beispielsweise zu dem sogenannten „Hyper-IgM-Syndrom“. Klinisch manifestiert sich diese angeborene Erkrankung mit schweren Immundefiziten, hervorgerufen durch fehlenden Immunglobulin-Klassenwechsel und ausbleibende Bildung von B-Zell-Keimzentren (Allen et al., 1993; Aruffo et al., 1993; Callard et al., 1993; DiSanto et al., 1993; Fuleihan et al., 1993; Korthäuer et al., 1993). Auch die T-Zell-vermittelte Aktivierung von Makrophagen ist gestört. Die Patienten leiden infolge dieser Ausfälle an wiederholten opportunistischen Infektionen (Soong et al., 1996; Stout et al., 1996). Durch die gezielte Inaktivierung des CD40-Liganden in der Maus konnte ein dem humanen Krankheitsbild sehr ähnlicher Symptomenkomplex erzeugt werden (Castigli et al., 1994; Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994). Ein Defekt am Beginn der Signalkaskade führt also bei Maus und Menschen zu dem gleichen Resultat. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass humanes und murines System sich auch in den ablaufenden

Signaltransduktionsmechanismen nicht unterscheiden. Die hier vorgestellten Daten zeigen deutliche Unterschiede im TRAF-Rekrutierungsverhalten von humanem und murinem CD40 auf. Damit bleibt herauszufinden, warum der Defekt des CD40-Liganden, trotz unterschiedlichem Bindungsverhalten der TRAF-Proteine an den Rezeptor, in Maus und Mensch am Ende zu identisch aussehenden Krankheitsbildern führt. Die Klärung dieses Problems bedarf weiterer intensiver Untersuchungen des CD40-Signalapparates von Maus und Mensch. Bis zur endgültigen Beantwortung der Frage nach Speziesunterschieden bei TRAF-vermittelten Signalmechanismen sollten Rückschlüsse vom Mausmodell auf menschliche Physiologie und Pathophysiologie der TNFR-Signaltransduktion nur unter Vorbehalt gezogen werden.

9. LITERATURVERZEICHNIS

Ahonen, C., Manning, E., Erickson, L. D., O'Connor, B., Lind, E. F., Pullen, S. S., Kehry, M. R., und Noelle, R. J. (2002). The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells. *Nat. Immunol.* *3*, 451-456.

Aizawa, S., Nakano, H., Ishida, T., Horie, R., Nagai, M., Ito, K., Yagita, H., Okumura, K., Inoue, J., und 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.

Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Atsuta, M., Morimoto, C., Ware, C. F., Malinin, N. L., Wallach, D., *et al.* (1998). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 13353-13358.

Allen, R. C., Armitage, R. J., Conley, M. E., Rosenblatt, H., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bedell, M. A., Edelhoff, S., Disteche, C. M., Simoneaux, D. K., *et al.* (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* *259*, 990-993.

Arch, R. H., und Thompson, C. B. (1998). 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 558-565.

Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L. S., Stenkamp, R., Neubauer, M., *et al.* (1993). The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* *72*, 291-300.

Baker, S. J., und Reddy, E. P. (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* *12*, 1-9.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., und Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* *73*, 431-445.

Bishop, G. A. (2004). The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 775-786.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., und Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803-815.

- Bonizzi, G., und Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.
- Boucher, L. M., Marengere, L. E., Lu, Y., Thukral, S., und 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.
- Brink, R., und Lodish, H. F. (1998). Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2A (TRAF2A), a TRAF2 splice variant with an extended RING finger domain that inhibits TNFR2-mediated NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 273, 4129-4134.
- Brown, K. D., Hostager, B. S., und Bishop, G. A. (2002). Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 19433-19438.
- Callard, R. E., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., und Spriggs, M. K. (1993). CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol. Today* 14, 559-564.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., und Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.
- Castigli, E., Alt, F. W., Davidson, L., Bottaro, A., Mizoguchi, E., Bhan, A. K., und Geha, R. S. (1994). CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12135-12139.
- Cheng, G., und Baltimore, D. (1996). TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev.* 10, 963-973.
- Chomczynski, P., und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H., und Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell. Sci.* 115, 679-688.
- Clark, E. A., und Ledbetter, J. A. (1986). Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4494-4498.
- Coope, H. J., Atkinson, P. G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., Klaus, G. G., Johnston, L. H., und Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* 21, 5375-5385.

Dadgostar, H., und Cheng, G. (1998). An intact zinc ring finger is required for tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated nuclear factor-kappaB activation but is dispensable for c-Jun N-terminal kinase signaling. *J. Biol. Chem.* *273*, 24775-24780.

Dadgostar, H., und Cheng, G. (2000). Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 2539-2544.

Dagert, M., und Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* *6*, 23-28.

Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., und Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 193-209.

Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E., und 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.

DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A., und de Saint Basile, G. (1993). CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* *361*, 541-543.

Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J., und Pierce, S. K. (2003). Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 457-481.

Engbrecht, J., Brent, R., und M.A., K. (1991). Minipreps of Plasmid DNA, In *Current Protocols in Molecular Biology* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds. (Boston: John Wiley & Sons Inc.), pp. 1.6.1-1.6.10.

Engelmann, H., Holtmann, H., Brakebusch, C., Shemer Avni, Y., Sarov, I., Nophar, Y., Hadas, E., Leitner, O., und Wallach, D. (1990). Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor receptor have TNF-like activity. *J. Biol. Chem.* *265*, 14497-14504.

Franken, M., Devergne, O., Rosenzweig, M., Annis, B., Kieff, E., und Wang, F. (1996). Comparative analysis identifies conserved tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 binding sites in the human and simian Epstein-Barr virus oncogene LMP1. *J. Virol.* *70*, 7819-7826.

Freemont, P. S. (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *684*, 174-192.

Freemont, P. S. (2000). RING for destruction? *Curr. Biol.* *10*, R84-87.

Fuleihan, R., Ramesh, N., Loh, R., Jabara, H., Rosen, R. S., Chatila, T., Fu, S. M., Stamenkovic, I., und Geha, R. S. (1993). Defective expression of the CD40 ligand in X

chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 2170-2173.

Gedrich, R. W., Gilfillan, M. C., Duckett, C. S., Van Dongen, J. L., und Thompson, C. B. (1996). CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *J. Biol. Chem.* *271*, 12852-12858.

Grewal, I. S., Xu, J., und Flavell, R. A. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* *378*, 617-620.

Grimaldi, J. C., Torres, R., Kozak, C. A., Chang, R., Clark, E. A., Howard, M., und Cockayne, D. A. (1992). Genomic structure and chromosomal mapping of the murine CD40 gene. *J. Immunol.* *149*, 3921-3926.

Hauer, J., Puschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C., und Engelmann, H. (2005). TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 2874-2879.

Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., und Engelmann, H. (1998). CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur. J. Immunol.* *28*, 3594-3604.

Hess, S., Kurrle, R., Lauffer, L., Riethmuller, G., und Engelmann, H. (1995). A cytotoxic CD40/p55 tumor necrosis factor receptor hybrid detects CD40 ligand on herpesvirus saimiri-transformed T cells. *Eur. J. Immunol.* *25*, 80-86.

Hostager, B. S., Haxhinasto, S. A., Rowland, S. L., und Bishop, G. A. (2003). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* *278*, 45382-45390.

Hsing, Y., und Bishop, G. A. (1999). Requirement for nuclear factor-kappaB activation by a distinct subset of CD40-mediated effector functions in B lymphocytes. *J. Immunol.* *162*, 2804-2811.

Hu, H. M., O'Rourke, K., Boguski, M. S., und Dixit, V. M. (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J. Biol. Chem.* *269*, 30069-30072.

Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., *et al.* (1996a). 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.

Ishida, T. K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996b). TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 9437-9442.

Jahnke, A., und Johnson, J. P. (1994). Synergistic activation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by TNF-alpha and IFN-gamma is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat1 alpha (p91) that can be activated by both IFN-gamma and IFN-alpha. *Febs. Lett.* *354*, 220-226.

Jahnke, A., Van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., und Johnson, J. P. (1995). Constitutive expression of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is regulated by differentially active enhancing and silencing elements. *Eur. J. Biochem.* *228*, 439-446.

Jalukar, S. V., Hostager, B. S., und Bishop, G. A. (2000). Characterization of the roles of TNF receptor-associated factor 6 in CD40-mediated B lymphocyte effector functions. *J. Immunol.* *164*, 623-630.

Karin, M., Liu, Z., und Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 240-246.

Kashiwada, M., Shirakata, Y., Inoue, J. I., Nakano, H., Okazaki, K., Okumura, K., Yamamoto, T., Nagaoka, H., und Takemori, T. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J. Exp. Med.* *187*, 237-244.

Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., und Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* *1*, 167-178.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., und Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 9150-9154.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., Mosialos, G., und 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.

Kingston, R. E., Chen, C. A., Okayama, H., und Rose, J. K. (1993). Calcium Phosphate Transfection using DEAE-dextran, In *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 36), F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds. (Boston: John Wiley & Sons Inc.), pp. 9.1-9.1.11.

Korthäuer, U., Graf, D., Mages, H. W., Briere, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A. G., Notarangelo, L. D., Levinsky, R. J., und Kroccek, R. A. (1993). Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361, 539-541.

Lee, S. Y., Lee, S. Y., und Choi, Y. (1997). TRAF-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)- and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF- κ B activation. *J. Exp. Med.* 185, 1275-1285.

Leo, E., Welsh, K., Matsuzawa, S., Zapata, J. M., Kitada, S., Mitchell, R. S., Ely, K. R., und Reed, J. C. (1999). Differential requirements for tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins in CD40-mediated induction of NF-kappaB and Jun N-terminal kinase activation. *J. Biol. Chem.* 274, 22414-22422.

Lomaga, M. A., Yeh, W. C., Sarosi, I., Duncan, G. S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., *et al.* (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 13, 1015-1024.

Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., und Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540-544.

McWhirter, S. M., Pullen, S. S., Holton, J. M., Crute, J. J., Kehry, M. R., und Alber, T. (1999). Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8408-8413.

Mizushima, S., und Nagata, S. (1990). pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18, 5322.

Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., und Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.

Mullinax, R., Sorge, J., Hess, S., und Engelmann, H. (1996). Identification of a novel protein from a HybriZAP cDNA library which specifically interacts with the CD40 receptor. *Strategies* 9, 81-83.

Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T., Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Yamamoto, T., und Inoue, J. (1999). Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4, 353-362.

Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C. F., Yagita, H., und Okumura, K. (1996). TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 14661-14664.

Ni, C. Z., Welsh, K., Leo, E., Chiou, C. K., Wu, H., Reed, J. C., und Ely, K. R. (2000). Molecular basis for CD40 signaling mediated by TRAF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 10395-10399.

Opipari, A. W., Boguski, M. S., und Dixit, V. M. (1990). The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor α encodes a novel type of zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* *265*, 14705-14712.

Park, Y. C., Burkitt, V., Villa, A. R., Tong, L., und Wu, H. (1999). Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* *398*, 533-538.

Park, Y. C., Ye, H., Hsia, C., Segal, D., Rich, R. L., Liou, H. C., Myszka, D. G., und Wu, H. (2000). A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* *101*, 777-787.

Paulie, S., Rosen, A., Ehlin, H. B., Braesch, A. S., Jakobson, E., Koho, H., und Perlmann, P. (1989). The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction. *J. Immunol.* *142*, 590-595.

Pomerantz, J. L., und Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Mol. Cell* *10*, 693-695.

Pullen, S. S., Dang, T. T., Crute, J. J., und 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.

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

Püschner, S. (2000) Die Bedeutung Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktoren für die Signaltransduktion des CD40 Rezeptors, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.

Pype, S., Declercq, W., Ibrahimi, A., Michiels, C., Van Rietschoten, J. G., Dewulf, N., de Boer, M., Vandenabeele, P., Huylebroeck, D., und Remacle, J. E. (2000). TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 18586-18593.

Ramakrishnan, P., Wang, W., und Wallach, D. (2004). Receptor-Specific Signaling for Both the Alternative and the Canonical NF-kappaB Activation Pathways by NF-kappaB-Inducing Kinase. *Immunity* *21*, 477-489.

Reuther, J. Y., Reuther, G. W., Cortez, D., Pendergast, A. M., und Baldwin, A. S., Jr. (1998). A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev.* *12*, 968-981.

Rodrigues-Lima, F., Josephs, M., Katan, M., und Cassinat, B. (2001). Sequence analysis identifies TTRAP, a protein that associates with CD40 and TNF receptor-associated factors, as a member of a superfamily of divalent cation-dependent phosphodiesterases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *285*, 1274-1279.

Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., und Goeddel, D. V. (1995a). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* *83*, 1243-1252.

Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., und Goeddel, D. V. (1995b). TRAF2-mediated activation of NF- κ B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* *269*, 1424-1427.

Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., und Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* *78*, 681-692.

Salvesen, G. S., und Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signalling by proteolysis. *Cell* *91*, 443-446.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Vol 1, second edition edn (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sandberg, M., Hammerschmidt, W., und Sugden, B. (1997). Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J. Virol.* *71*, 4649-4656.

Schwabe, R. F., Hess, S., Johnson, J. P., und Engelmann, H. (1997). Modulation of soluble CD40 ligand bioactivity with anti-CD40 antibodies. *Hybridoma* *16*, 217-226.

Song, H. Y., Regnier, C. H., Kirschning, C. J., Goeddel, D. V., und Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 9792-9796.

Soong, L., Xu, J. C., Grewal, I. S., Kima, P., Sun, J., Longley, B. J., Jr., Ruddle, N. H., McMahon Pratt, D., und Flavell, R. A. (1996). Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* *4*, 263-273.

Stout, R. D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I. S., und Flavell, R. A. (1996). Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J. Immunol.* *156*, 8-11.

Sutherland, C. L., Krebs, D. L., und Gold, M. R. (1999). An 11-amino acid sequence in the cytoplasmic domain of CD40 is sufficient for activation of c-Jun N-terminal kinase, activation of MAPKAP kinase-2, phosphorylation of I kappa B alpha, and protection of WEHI-231 cells from anti-IgM-induced growth arrest. *J. Immunol.* *162*, 4720-4730.

Takeuchi, M., Rothe, M., und Goeddel, D. V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J. Biol. Chem.* *271*, 19935-19942.

Torres, R. M., und Clark, E. A. (1992). Differential increase of an alternatively polyadenylated mRNA species of murine CD40 upon B lymphocyte activation. *J. Immunol.* *148*, 620-626.

Trauzold, A., Roder, C., Sipos, B., Karsten, K., Arlt, A., Jiang, P., Martin-Subero, J. I., Siegmund, D., Muerkoster, S., Pagerols-Raluy, L., *et al.* (2005). CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* *19*, 620-622.

Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Azuma, S., Yamamoto, T., und Inoue, J. (1999). Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1234-1239.

Wain, H. M., Bruford, E. A., Lovering, R. C., Lush, M. J., Wright, M. W., und Povey, S. (2002). Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* *79*, 464-470.

Wain, H. M., Lush, M. J., Ducluzeau, F., Khodiyar, V. K., und Povey, S. (2004). Genew: the Human Gene Nomenclature Database, 2004 updates. *Nucleic Acids Res.* *32*, D255-257.

Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., und 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.

Wiley, J. A., und Harmsen, A. G. (1995). CD40 ligand is required for resolution of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J. Immunol.* *155*, 3525-3529.

Xie, P., Hostager, B. S., und Bishop, G. A. (2004). Requirement for TRAF3 in Signaling by LMP1 But Not CD40 in B Lymphocytes. *J. Exp. Med.* *199*, 661-671.

Xu, J., Foy, T. M., Laman, J. D., Elliott, E. A., Dunn, J. J., Waldschmidt, T. J., Elsemore, J., Noelle, R. J., und Flavell, R. A. (1994). Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* *1*, 423-431.

Xu, Y., Cheng, G., und Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses. *Immunity* 5, 407-415.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D. P., und Wang, X. (1997). Prevention of Apoptosis by bcl-2: Release of Cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., Segal, D., Dzivenu, O. K., Vologodskaya, M., Yim, M., *et al.* (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418, 443-447.

Ye, H., Park, Y. C., Kreishman, M., Kieff, E., und Wu, H. (1999a). The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol. Cell* 4, 321-330.

Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J. J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C. A., *et al.* (1999b). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* 274, 30202-30208.

Yeh, W. C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., *et al.* (1997). Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7, 715-725.

Zetoune, F. S., Murthy, A. R., Shao, Z., Hlaing, T., Zeidler, M. G., Li, Y., und Vincenz, C. (2001). A20 inhibits NF-kappa B activation downstream of multiple Map3 kinases and interacts with the I kappa B signalosome. *Cytokine* 15, 282-298.

10. ANHANG

10.1. PROTEINSEQUENZVERGLEICH DER TRAF-PROTEINE

	10	20	30	40	50	60
huTRAF1	MASSSGSSPRPAPDENEFPPGCPPTVCQDPKEPRALCCAGCLSENPRNGEDQICPKCRGE					

muTRAF1	MASSS-----APDENEFQFGCPPAPCQDPSEPRVLCCTACLSENLRDDEDRI					

	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110	120
huTRAF1	DLQISIPGSRRLRTOEKAHPEVAEAGIGCPPFAGVGCSPFKGSPQSVQEHVTSQTS					

muTRAF1	NLHPVSPGSPL-TQEKVHSDVAEAEIMCPPFAGVGCSPFKGSPQSMQEHVTSQ					

	60	70	80	90	100	110
	130	140	150	160	170	180
huTRAF1	GFMKQWKARLGCGLSESGPMALQNLSDLQLQAAVEVAGDLEVD					

muTRAF1	AVLKEWKSSPGSNLGSAPMALERNLSELQLQAAVEATGDLEVD					

	120	130	140	150	160	170
	TRAF-N-Domäne					
	190	200	210	220	230	240
huTRAF1	FMKEKLLAELLEGKLRVFNIVAVLNKEVEASHLALATSIHQSQLDRERILSLE					

muTRAF1	LVKEKLLAQLEEKLRVFNIVAVLNKEVEASHLALAASIHQSQLDREHLLSLE					

	180	190	200	210	220	230
	250	260	270	280	290	300
huTRAF1	QTLAQKDQALGKLEQSLRLMEEASFDGTFWLKITNVTRRCHESACGRTVSLF					

muTRAF1	QTLAQKDQVLGKLEHSLRLMEEASFDGTFWLKITNVTKRCHESVCGRTVSLF					

	240	250	260	270	280	290
	TRAF-C-Domäne					
	310	320	330	340	350	360
huTRAF1	YGYKLCLRLYLNGDGTGKRTHLSLFIIVIMRGEYDALLPWPFRNKVTFMLLDQ					

muTRAF1	YGYKLCLRLYLNGDGSKKTHLSLFIIVIMRGEYDALLPWPFRNKVTFMLLDQ					

	300	310	320	330	340	350
	370	380	390	400	410	
huTRAF1	AFRPDLSSASFQRPQSETNVASGCPLFFPPLSKLQSPKHAYVKDDTMFLKCI					

muTRAF1	AFRPDLSSASFQRPQSETNVASGCPLFFPPLSKLQSPKHAYVKDDTMFLKCI					

	360	370	380	390	400	

Abbildung 15: Proteinsequenzvergleich humanes und murines TRAF1


```

      10      20      30      40      50      60
huTRAF2 MAAASVTTPPGSLELLQPGFSKTLTLLGTRLEAKYLCSACRNVLRPFFQAQCGHRYCSFCLAS
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 MAAASVTSPGSLELLQPGFSKTLTLLGTRLEAKYLCSACKNILRRPFFQAQCGHRYCSFCLTS
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
huTRAF2 ILSSGPQNCAACVHEGIYEEGISILESSAFPDNAARREVESLPAVCPDGDCTWKGLKE
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 ILSSGPQNCAACVYEGLYEEGISILESSAFPDNAARREVESLPAVCPNDGCTWKGLKE
        70      80      90     100     110     120
muTRAF2A RCASILS

      130     140     150     160     170     180
huTRAF2 YESCHEGRCPMLLTCPCACKGLVRLGKERHLEHECPERSLSCRHCRAPCCGADVKAHHE
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 YESCHEGLCPFLTEPCACKGLVRLSEKEHHTEQECPKRSLSQCQCRAPCSHVDLEVHYE
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
huTRAF2 VCPKFPLTCDGCGKKKIPREKFDHVKTGCKCRVPCRPHAIGCLETVEGEKQOEHEVQWL
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 VCPKFPLTCDGCGKKKIPRETFQDHRACSKCRVLCRPFHTVGCSEMVETENIQDHELQRL
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
huTRAF2 REHLAMLLSSVLEAKPLLDQSHAGSELLQRCESELEKKTATFENIVCVLNREVERVAMTA
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 REHLALLSSFFLEAQASPGTLNQVGPPELLQRQILEQKIATFENIVCVLNREVERVAVTA
      250     260     270     280     290     300

      TRAF-N-Domäne
      310     320     330     340     350     360
huTRAF2 EACSRQHRLDQDKIEALSSKVQQLERSIGLKDLMADLEQKVLEMEASTYDGVFIWKISD
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 EACSRQHRLDQDKIEALSNKVQQLERSIGLKDLMADLEQKVSELEVSTYDGVFIWKISD
      310     320     330     340     350     360

      TRAF-C-Domäne
      370     380     390     400     410     420
huTRAF2 FARKRQEAVAGRIPAIFSPAFYTSRYGYKMCLRIYLNQDGTGRGTHLSLFFVVMKGPNDA
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 FTRKRQEAVAGRTPAIFSPAFYTSRYGYKMCLRVYLNQDGTGRGTHLSLFFVVMKGPNDA
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
huTRAF2 LLRWPFNQKVTLMLLDQNNREHVIDAFRDPVTSSSFQRPVNDMNIASGCPLFCPVSKEA
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 LLQWPFNQKVTLMLLDHNREHVIDAFRDPVTSSSFQRPVSDMNIASGCPLFCPVSKEA
      430     440     450     460     470     480

      490     500
huTRAF2 KNSYVRDDAIFIKAIVDLTGL
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
muTRAF2 KNSYVRDDAIFIKAIVDLTGL
      490     500
    
```

Abbildung 16: Proteinsequenzvergleich humanes und murines TRAF2

	10	20	30	40	50	60
huTRAF3	MESSKKMDS	PGALQTNP	PLKLHTDR	SAGTPV	VFVEQGGY	KEKFKVKT

muTRAF3	MESSKKMDA	AGTLQPNP	PLKLQPD	RGAGS-VL	VPBQGGY	KEKFKVKT

	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110	120
huTRAF3	CSPKQTEC	GHRFCESC	MAALLSS	SSPKCTAC	QESIVKDK	VFKDNCKR

muTRAF3	CNPKQTEC	GHRFCESC	MAALLSS	SSPKCTAC	QESIICKD	KVFKDNCK

	60	70	80	90	100	110
	130	140	150	160	170	180
huTRAF3	SRGCAEQ	LTGLHLL	VHLKND	CHFELP	CVRPDCK	EKVLKDL

muTRAF3	GRGCAEQ	LTGLHLL	VHLKNE	CQFELP	CLRADCK	EKVLKDL

	120	130	140	150	160	170
	190	200	210	220	230	240
huTRAF3	KSQVPMI	ALQKHED	TDCPCVV	VVSCPHK	CSVQTL	LRSELSA

muTRAF3	KSQVPMI	KLQKHED	TDCPCVV	VVSCPHK	CSVQTL	LRSELSA

	180	190	200	210	220	230
	250	260	270	280	290	300
huTRAF3	FQGTNQ	QIKAHE	ASSAVQ	HVNLLK	EWNSLE	KKVSL

muTRAF3	FQGTNQ	QIKAHE	ASSAVQ	HVNLLK	EWNSLE	KKVSL

	240	250	260	270	280	290
	310	320	330	340	350	360
huTRAF3	EIERQKE	MLRNNE	SKILHL	QRVIDS	QAEKLE	KELDK

muTRAF3	EIERQKE	MLRNNE	SKILHL	QRVIDS	QAEKLE	KELDK

	300	310	320	330	340	350
TRAF - N-Domäne						
	370	380	390	400	410	420
huTRAF3	VTELESV	DKSAGQ	VARNTG	LLESQL	SRHDQ	MLSVHD

muTRAF3	VTELESV	DKSAGQ	AARNTG	LLESQL	SRHDQ	TLVHD

	360	370	380	390	400	410
TRAF - C-Domäne						
	430	440	450	460	470	480
huTRAF3	KIRDYKR	RKQEA	VMGKTL	SLYSQP	PFTGYF	GYKMC

muTRAF3	KIRDYKR	RKQEA	VMGKTL	SLYSQP	PFTGYF	GYKMC

	420	430	440	450	460	470
	490	500	510	520	530	540
huTRAF3	EYDALLP	WPFPKQ	KVTLML	MDQGSS	RRHLG	DAFKPD

muTRAF3	EYDALLP	WPFPKQ	KVTLML	MDQGSS	RRHLG	DAFKPD

	480	490	500	510	520	530
	550	560				
huTRAF3	TVLENGT	YIKDDT	IFIKVI	VDTSDL	PDP	

muTRAF3	TVLENGT	YIKDDT	IFIKVI	VDTSDL	PDP	

	540	550	560			

Abbildung 17: Proteinsequenzvergleich humanes und murines TRAF3

ANHANG

	10	20	30	40	50	60
huTRAF5	MAYSEEHKMPCGFIRQNSGNSISLDFEPSIEYQFVERLEERYKCAFCHSVLHNPHQTGC					
					
muTRAF5	MAHSEEQAAVPCAFIRQNSGNSISLDFEPDTEYQFVEQLEERYKCAFCHSVLHNPHQTGC					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
huTRAF5	GHRFCQHCILSLRELNTVPICPVDKEVIKSQEVFKDNCCKREVLNLYVYCSNAPGCNAKV					

muTRAF5	GHRFCQQCIRSLRELNSVPICPVDKEVIKQEVFKDNCCKREVLNLHVYCKNAPGCNARI					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
huTRAF5	ILGRYQDHLQQLFQPVQCSNEKCREPVLKDLKEHLSASCQFRKEKCLYCKKDVVIVNL					

muTRAF5	ILGRFQDHLQHCFSFQAVPCPNESCREAMLRKDVKEHLSAYCRFREEKCLYCKRDIIVVTNL					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
huTRAF5	QNHEENLCPEYPVFCPNCAKIILKTEVDEHLAVCPAEQDCPFKHYGCAVTDKRRNLQQ					

muTRAF5	QDHEENSCPYPVFCPNRCVQTIIPRARVNEHLTVCPAEQDCPFKHYGCTVKGKGRNLL					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
huTRAF5	HEHSALREHMLVLEKNVQLEEQISDLHKSLEQKESKIQQLAETIKKLEKFKQFAQLFG					

muTRAF5	HERAALQDHMLVLEKNYQLEQRISDLYQSLEQKESKIQQLAETVKKFEKELKQFTQMPFG					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
huTRAF5	KNGSFLPNIQVFASHIDKSAWLEAQVHQLLQMVNQKPFDLRPLMEAVDTVQKITLLE					

muTRAF5	RNGTFLSNVQALTSHTDKSAWLEAQVRQLLQIVNQPSRLDLRSLVDAVDSVKQRITQLE					
	310	320	330	340	350	360
	TRAF-N-Domäne					
	370	380	390	400	410	420
huTRAF5	NNDQRLAVLEEETNKHDTHINIHKAQLSKNEERFKLLEGTCYNGKLIWKVTDYKMKKREA					

muTRAF5	ASDQRLVLEGETSKHDAHINIHKAQLNKNEERFKQLEGACYSKGLIWKVTDYRVKKREA					
	370	380	390	400	410	420
	TRAF-C-Domäne					
	430	440	450	460	470	480
huTRAF5	VDGHTVSIFSQSFYTSRCGYRLCARAYLNGDGSGRGSHLSLYFVVMRGEFDSLLQWPFQ					

muTRAF5	VEGHTVSVFSQPFYTSRCGYRLCARAYLNGDGSKGTHLSLYFVVMRGEFDSLLQWPFQ					
	430	440	450	460	470	480
	490	500	510	520	530	540
huTRAF5	RVTLMMLDQSGKKN-IMETFKPDPNSSSFKRPDGMNIASGCPRFVAHSVLENKAYIK					

muTRAF5	RVTLMMLDQSGKKNHIVETFKADPNSSSFKRPDGMNIASGCPRFVSHSTLENSKNTYIK					
	490	500	510	520	530	540
	550					
huTRAF5	DDTLFLKVAVDLTDLEDL					
					
muTRAF5	DDTLFLKVAVDLTDLEDL					
	550					

Abbildung 18: Proteinsequenzvergleich humanes und murines TRAF5

	10	20	30	40	50	60
huTRAF6	MSLLNCENSCGSSQSESDCCVAMASSCSAVTKDSSVGGTASTGNLSSSFMEIIQGYDVEF					
muTRAF6	MSLLNCENSCGSSQSSDCCAAMAASCSAAVKDSSVSGSA STGNLSSSFMEIIQGYDVEF					
	10	20	30	40	50	60
huTRAF6	70	80	90	100	110	120
muTRAF6	DPPLESKYECPICLMALREAVQTPCGHRFCKACIIKSIRDAGHKCPVDNEILLENQLFPD					
	70	80	90	100	110	120
huTRAF6	130	140	150	160	170	180
muTRAF6	NFAKREILSLMVKCPNEGCLHKMELRHLEDHQAHCEFALMDCPQCQRPFQKPFHINIHLK					
	130	140	150	160	170	180
huTRAF6	190	200	210	220	230	240
muTRAF6	DCPRRQVSCDNCAASMAFEDKEIHDQNCPLANVICYCNTILIREQMPNHYDLDCPTAPI					
	190	200	210	220	230	240
huTRAF6	250	260	270	280	290	
muTRAF6	PCTFSTFGCHEKMQRNHLARHLQENTQSHMRMLAQAVHSLSVI ----- PDSGYISEV					
	250	260	270	280	290	300
	TRAF -N-Domäne					
	300	310	320	330	340	350
huTRAF6	RNFQETIHQLEGLRVQRDHQIRELTAKMETQSMYVSELKRTIRTLEDKVAIEAQQCNGI					
muTRAF6	PNYBETIKQLESRLVQRDHQIRELTAKMETQSMYVSELKRTIRTLEDKVAEMEAQCNGI					
	310	320	330	340	350	360
	TRAF -C-Domäne					
	360	370	380	390	400	410
huTRAF6	YIWKIGNFGMHLKQEERKPVVIHSPGFYTGKPGYKLCMLRHLQLPTAQRCANYISLKVH					
muTRAF6	YIWKIGKFGMHLKSQEEERPVVIHSPGFYTGKPGYKLCMLRHLQLPTAQRCANYISLKVH					
	370	380	390	400	410	420
	420	430	440	450	460	470
huTRAF6	TMQGEYDShLpPpFqGtIRLTIldQseAPVRqNHhEIMdAKPELLAfQRPTiPRNPkgFg					
muTRAF6	TMQGEYDShLpPpFqGtIRLTIldQseALiRqNHhEVMdAKPELLAfQRPTiPRNPkgFg					
	430	440	450	460	470	480
	480	490	500	510	520	
huTRAF6	YVTFmHLEALRQRTfIKDDTLlVrCEvSTRfDmGSLRREGfQPRSTDAgV					
muTRAF6	YVTFmHLEALRQGTfIKDDTLlVrCEvSTRfDmGGLRKEGfQPRSTDAgV					
	490	500	510	520	530	

Abbildung 19: Proteinsequenzvergleich humanes und murines TRAF6

11. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. G. Riethmüller für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Institut zu beginnen.

Gleichmaßen möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. rer. nat. T. Brocker bedanken, der mir als kommissarischer Leiter und neuer Vorstand des Instituts ermöglichte, meine Dissertation in seinem Institut abzuschließen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Hartmut Engelmann möchte ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die gute Betreuung dieser Arbeit danken. In zahlreichen Diskussionen vermittelte er mir Einblicke in die Molekularbiologie und Immunologie, sowie ins wissenschaftliche Arbeiten. Für sein stets offenes Ohr in sowohl fachlichen als auch privaten Angelegenheiten und seine große Hilfsbereitschaft möchte ich mich besonders bedanken.

Frau Christine Federle danke ich für die kompetente Einführung in die molekularbiologischen Techniken. Bedanken möchte ich mich auch für ihr unermüdliches Engagement, die zahlreichen Tipps und Problemlösungen, sowie für ihre Geduld, ihr positives Denken und ihre fortwährend gute Laune.

Julia Hauer, Martin Herold, Maciek Lech und Stephanie Püschner danke ich für die gute Zusammenarbeit, die aufmunternden Worte und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich in den vergangenen Jahren immer unterstützt und mir mein Studium und diese Dissertation ermöglicht hat.

12. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHES

Name: Martina Bongers
Geburtsdatum: 25. Oktober 1977
Geburtsort: Bad Schwalbach
Staatsangehörigkeit: deutsch

Adresse: Eibachstraße 7
65329 Hohenstein

SCHULAU SBILDUNG

1984 - 1988 Besuch der Grundschule in Taunusstein-Bleidenstadt
1988 - 1994 Besuch des Gymnasialzweigs der Integrierten Gesamtschule in Taunusstein-Bleidenstadt
1994 - 1997 Besuch der Gymnasialen Oberstufe der Integrierten Gesamtschule Obere Aar in Taunusstein-Hahn
19.06.1997 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

HOCHSCHULAU SBILDUNG

05/1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2000 Physikum
03/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
13.05.2005 Approbation als Ärztin

PRAKTISCHES JAHR

02/2004 - 05/2004	Chirurgie im Hôpital Arnaud de Villeneuve Montpellier, Université de Montpellier, Frankreich
05/2004 - 09/2004	Anästhesiologie im Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München
09/2004 - 11/2004	Innere Medizin im Royal North Shore Hospital Sydney, Northern Clinical School, University of Sydney, Australien
01/2005 - 02/2005	Innere Medizin im Krankenhaus München-Schwabing, Ludwig-Maximilians-Universität München

ANSTELLUNGEN

seit 11/2005	Assistenzärztin im Zentrum für Innere Medizin der Dr.-Horst-Schmidt-Klinik in Wiesbaden
--------------	---

WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

seit 09/2001	Dissertation am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe PD Dr. med. Hartmut Engelmann, Ph.D.
--------------	---

VERÖFFENTLICHUNGEN

02/2005	J. Hauer, S. Püschner, P. Ramakrishnan, U. Simon, M. Bongers , C. Federle, H. Engelmann: TNF receptor-associated factor 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5 mediated activation of the noncanonical NF- κ B pathway by TRAF-binding TNFRs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005, 102: 2874-2879
---------	---