

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

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

„Signaltransduktion durch TRAF-bindende Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-SF)“

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

Vorgelegt

von

Julia Christina Hauer

aus

München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. H. Engelmann
2. Berichterstatter	Prof. Dr. R. Mocikat
Mitberichterstatter	Priv. Doz. Dr. J. Herrmann Priv. Doz. Dr. R. Rupel
Dekan:	Professor Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	27.07.2006

Meinen Eltern

Tommy und Max

1. ABKÜRZUNGEN	4
2. ZUSAMMENFASSUNG.....	7
3. EINLEITUNG	9
3.1. MITGLIEDER DER TNFR-SF	9
3.1.1. Bedeutung der TNFR-SF für den Organismus.....	9
3.1.2. Struktur und Funktion der TNFR-SF.....	10
3.2. TRAFs	13
3.2.1. Erstbeschreibung der TRAFs	13
3.2.2. Struktur und Funktion der TRAFs.....	14
3.2.3. Bindungsmotive für TRAFs innerhalb der Rezeptorsequenz	15
3.2.4. TRAF-vermittelte Signaltransduktionswege	16
3.2.5. TRAF-„knock out“-Experimente und ihre Bedeutung für den lebensfähigen Organismus. 19	
4. ZIELSETZUNG.....	20
5. MATERIAL UND METHODEN	21
5.1. REAGENZIEN	21
5.1.1. Zellen und Zellkulturmaterial.....	21
5.1.2. Puffer	22
5.1.3. Antikörper.....	24
5.1.4. Primer und cDNA-Klone	26
5.2. METHODEN	27
5.2.1. Klonierung der Hybridrezeptoren.....	27
5.2.1.1. cDNA-Synthese.....	27
5.2.1.2. Präparative PCR.....	28
5.2.1.3. Präparative Isolierung von DNA mittels DEAE-Zellulose nach gelelektrophoretischer Auftrennung	29
5.2.1.4. Ligation der cDNA der Hybridrezeptoren in einen Expressionsvektor	30
5.2.1.5. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	32
5.2.1.6. Transformation	32
5.2.1.7. Schnellpräparation und Überprüfung der Plasmid-DNA	32
5.2.1.8. Großansatz zur Isolierung von Plasmid-DNA	33

5.2.2. Zellkultur	33
5.2.2.1. Herstellung stabiler CD27-Ligand-Transfektanten	33
5.2.2.2. Ca-Phosphat-Transfektion in 293T-Zellen	34
5.2.2.3. Lyse	34
5.2.3. TRAF-Rekrutierungs-ELISA	34
5.2.3.1. Rekrutierungs-ELISA.....	34
5.2.3.2. Bestimmung der CD40-Expression im ELISA.....	36
5.2.4. Reporter-Assay zur Detektion von NF- κ B	36
5.2.5. Herstellung von Kernextrakten	38
5.2.6. SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot-Analysen	38
6. ERGEBNISSE	40
6.1. STRATEGIE.....	40
6.2. KONTROLLEN	42
6.2.1. Rekrutierungsvergleich von Hybridrezeptoren und korrespondierendem Wildtyp- rezeptor.....	42
6.2.2. Vergleich der NF- κ B-Aktivierung von Hybridrezeptoren und Wildtyprezeptor	43
6.2.3. Einfluss der Transmembrandomäne auf die TRAF-Rekrutierung	44
6.2.4. Einfluss der Transmembrandomäne auf die Aktivierung von NF- κ B	45
6.3. TRAF-REKRUTIERUNG AN DIE REZEPTOREN DER TNFR-SF	46
6.3.1. Vorteile des verwendeten Transfektionssystems	46
6.3.2. Ergebnisse der TRAF-Rekrutierungsstudie.....	47
6.3.2.1. TRAF2-Rekrutierung	49
6.3.2.2. TRAF5-Rekrutierung	50
6.3.2.3. TRAF6-Rekrutierung	50
6.3.2.4. TRAF1-Rekrutierung	50
6.3.2.5. TRAF3-Rekrutierung	51
6.4. AKTIVIERUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NF- κ B	51
6.4.1. Das Reportersystem.....	52
6.4.2. Aktivierung von NF- κ B durch alle getesteten Rezeptoren	52
6.4.3. Rezeptoren mit starker TRAF2-, TRAF5- und TRAF6-Bindung	53
6.4.4. Rezeptoren mit starker TRAF6-Bindung	54
6.4.5. Rezeptoren mit schwacher TRAF-Bindung	54

6.5. TRAF3 ALS REGULATORISCHES ELEMENT IM NF- κ B-SIGNALWEG.....	55
6.5.1. Zielsetzung des Experiments.....	55
6.5.2. NF- κ B-Suppression durch TRAF3.....	56
6.5.3. Regulierung von TRAF2-, TRAF5- und TRAF6-abhängiger NF- κ B-Aktivierung durch TRAF3	57
6.6. TRAF3 ALS REGULATORISCHES ELEMENT DES NF- κ B-SIGNALWEGS IM CD40-MODELL	58
6.6.1. TRAF-Bindung an CD40-Mutanten	59
6.6.2. Regulation der NF- κ B-Aktivität durch TRAF3 im CD40-Modell.....	60
6.7. AKTIVIERUNG VON NF- κ B ÜBER TRAF2 TROTZ STARKER TRAF6-BINDUNG.....	61
6.8. REGULATION DER P50-, P52-, RELA- UND RELB-TRANSLOKATION DURCH TRAF3.....	63
6.8.1. Translokation von p50 und p52 über die unterschiedlichen TRAFs.....	64
6.8.2. Inhibition der TRAF2/5-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch TRAF3 im CD40-Modell.....	65
6.8.3. Regulation der NF- κ B-Aktivierung der Mitglieder der TNFR-SF durch TRAF3 auf den alternativen Signalweg.....	67
7. DISKUSSION	69
7.1. VERGLEICH DES ELISA-SYSTEMS MIT ETABLIERTEN METHODEN.....	69
7.2. BESTÄTIGUNG DER FUNKTIONALITÄT DER HYBRIDREZEPTOREN DURCH KONTROLLEXPERIMENTE.....	71
7.3. QUANTITATIVE UNTERSCHIEDE IN DER REZEPTOR-TRAF-REKRUTIERUNG	71
7.4. NF- κ B-AKTIVIERUNG ÜBER TRAF2, TRAF5 UND TRAF6	72
7.5. TRAF3 ALS REGULATORISCHES MOLEKÜL IM NF- κ B-SIGNALWEG	74
8. LITERATURVERZEICHNIS	78
9. DANKSAGUNG	87
10. LEBENSLAUF	88

1. ABKÜRZUNGEN

α -	Anti-
Ak	Antikörper
AP-1	(activation protein 1) Transkriptionsfaktor
AS	Aminosäure
ATAR	(another TRAF associated receptor) ein weiterer TRAF-assoziiertes Rezeptor
ATCC	(American Tissue Culture Collection) amerikanische Gewebekultur Sammlung
BAFF	B-Cell Activation Factor from the Tumor Necrosis Factor (TNF) Family
BHK	(baby hamster kidney cells) Nierenzellen von Hamsterbabies
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	(cluster of differentiation) Differenzierungsantigen
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	(complementary desoxy ribonucleic acid) komplementäre Desoxy-ribonukleinsäure
ciAP1,2	(cellular inhibitor of apoptosis protein 1, 2) zelluläres Apoptose-hemmendes Protein 1, 2
DD	Todesdomäne
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	(desoxy ribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase
FADD	(Fas associated death domain) Fas-assoziierte Todesdomäne
FCS	(fetal calf serum) fötales Kälberserum
FDC	follikulär dendritische Zellen
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GITR	Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family Related Gene
HVEM	(herpes virus entry mediator) TNF/NGF Rezeptor
I κ B	(Inhibitor of NF- κ B) NF- κ B-hemmendes Molekül

ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
I-TRAF	TRAF-interagierendes Protein
IZD	Intrazellulärdomäne
JNK	c-jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LMP1	latentes Infektionsmembranprotein 1
LT α	Lymphotoxin-alpha
LT β R	Lymphotoxin-beta-Rezeptor
mAk	monoklonaler Antikörper
mCD40L	membranständiger CD40-Ligand
MCS	Multicloningsite
mRNA	(messenger RNA) Boten RNA
mut	mutiert
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	(nuclear factor κ B) Transkriptionsfaktor
NGF	(nerve growth factor) Nervenwachstumsfaktor
NIK	NF- κ B-induzierende Kinase
NK	natürliche Killerzellen
p75TNFR	p75 Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
pAK	polyklonales Antiserum
PBL	periphere Blutleukozyten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
R	Rezeptor
RANK	(receptor activator of NF- κ B) TNF/NGF Rezeptor
RIP1, 2	Rezeptor-interagierendes Protein 1, 2
RNA	(ribonucleic acid) Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion
Th0, 1, 2	T-Helfer 0, 1, 2 –Zellen
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

TNFR-SF	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie
TRADD	(TNF receptor associated death domain) TNF-Rezeptor-assoziierte Todesdomäne
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor
TRIP	TRAF-integrierendes Protein
U	(unit) Einheit
VCAM	vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül
wt	Wildtyp

2. ZUSAMMENFASSUNG

Eine funktionierende Immunantwort hängt von der erfolgreichen Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems ab. Dies wird durch das große Netzwerk der Zytokine, die durch hochspezifische Rezeptoren auf ihre Zielzellen Einfluss nehmen, erreicht. Zwei Gen-Familien von besonderer Bedeutung sind die Tumor-Nekrose-Faktor-Ligand- und die TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFL-SF und TNFR-SF). Mitglieder der TNFR-SF aktivieren ihre intrazellulären Signalwege durch zwei zytoplasmatische Adaptermolekülklassen, die „Death Domain“ (DD)-Proteine und die TNF-Rezeptor-assoziierten-Proteine (TRAFs). Werden Mitglieder der TNFR-SF durch Zytokine oder ihre spezifischen Liganden aktiviert, tragen sie im Rahmen von Entzündungsreaktionen zu gesteigerter Genexpression bei und führen über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege zu programmiertem Zelltod. Beides erfolgt über die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die entweder zur nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B beitragen oder intrazelluläre Proteasen aktivieren, die die Zelle zerstören. Bekannt war, dass NF- κ B durch die Bindung von TRAF2, -5 und -6 an die Signaldomänen der Mitglieder der TNFR-SF aktiviert wird. Erst kürzlich erkannte man, dass zwei verschiedene NF- κ B-Signale existieren, die auch über zwei verschiedene Signalwege induziert werden. Jeder Signalweg resultiert in der nukleären Translokation zweier verschiedener Rel-Dimere, dem klassischen NF- κ B (p50/RelA) und dem alternativen NF- κ B (p52/RelB).

Wie die große Gruppe der TNFR-SF, über eine beschränkte Anzahl von Adaptermolekülen und intrazellulären Signalwegen eine große Zahl unterschiedlicher biologischer Funktionen kontrolliert, wird bis heute nicht ausreichend verstanden. Eine nahe liegende Vermutung ist, dass unterschiedliche Kombinationen der verschiedenen Adaptermoleküle für verschiedene Signalfunktionen kodieren. Die Bestimmung der Rekrutierungsmuster dieser Adapterproteine ist deshalb ein entscheidender Schritt zum besseren molekularen Verständnis der Signaltransduktion durch Mitglieder der TNFR-SF.

Die folgende Arbeit konzentriert sich auf die TRAF-Rekrutierungsmuster der 12 Mitglieder der TNFR-SF ohne Todesdomäne (p75TNFR, LT β R, RANK, HVEM, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, GITR, BCMA, OX40 und TACI). Untersuchungen zu

TRAF-TNFR-SF-Interaktionen wurden bis dato zumeist unter In-vitro-Bedingungen durchgeführt. Die wenigen Studien, die die TRAF-Rekrutierung in intakten Zellen untersuchten, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Dieses Projekt basiert auf einem neu entwickelten Testsystem, das die TNFR-SF-TRAF-Bindung nach Komplexbildung in der intakten Zelle misst. Außerdem ermöglichte dieses Testsystem zum ersten Mal, die TRAF-Rekrutierung unterschiedlicher Rezeptoren direkt und quantitativ miteinander zu vergleichen. Die Rekrutierungsanalyse zeigte, dass alle Rezeptoren alle TRAFs rekrutieren und sich nur in der Quantität der TRAF-Bindung unterscheiden.

In einem Versuch, die Funktion einzelner TRAFs aufzuzeigen, wurde die NF- κ B-Signalaktivität von 12 Mitgliedern der TNFR-SF verglichen. Gezielte Struktur-Funktions-Analysen am Beispiel von CD40 und seiner Mutanten mit definierten TRAF-Rekrutierungsmustern zeigten, dass CD40 über TRAF6 nur den klassischen NF- κ B-Signalweg aktiviert. Über TRAF2/5 aktiviert CD40 sowohl den klassischen als auch den alternativen Signalweg. Wir beobachteten außerdem, dass TRAF3 spezifisch die NF- κ B-Aktivierung über TRAF2/5 hemmt. Dieser TRAF3-Effekt war von einer intakten Zink-Finger-Domäne im TRAF3-Molekül abhängig und lässt sich deshalb nicht mit kompetitiver Verdrängung von TRAF2 von der gemeinsamen Rezeptorbindestelle erklären. Paradoxe Weise führte die Suppression des mittels TRAF2/5 induzierten NF- κ B durch TRAF3 zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität des TRAF6-abhängigen klassischen NF- κ B über CD40. Die regulatorische Funktion von TRAF3 im NF- κ B-Signalweg ist nicht auf CD40 beschränkt. Nach den hier erhobenen Daten aktivieren alle 12 getesteten Mitglieder der TNFR-SF den alternativen NF- κ B-Signalweg. TRAF3 blockierte oder hemmte diese Signalaktivität in allen untersuchten Fällen.

3. EINLEITUNG

3.1. Mitglieder der TNFR-SF

3.1.1. Bedeutung der TNFR-SF für den Organismus

Eine optimale Immunantwort wird durch die fehlerfreie Ergänzung aus angeborener und erworbener Immunität garantiert. Das Immunsystem als eines der komplexesten Organsysteme reguliert dies über eine Vielzahl von Zell-Zell-Kontakten. Dieser Vorgang wird durch zahlreiche lösliche Zytokine und zellständige Liganden gesteuert, die über hochspezifische Rezeptoren mit ihren Zielzellen interagieren. Über die Rezeptor-Ligand-Bindung der unterschiedlichen Zellen des Immunsystems werden Entzündungsreaktionen gesteuert, die die Differenzierung und die Proliferation der Zellen regulieren, sowie das Zelltodprogramm (Apoptose) auslösen. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die TNFL-SF und die TNFR-SF.

Kommt es zu einer fehlerhaften Interaktion von Ligand und Rezeptor, kann dies zu einer überschießenden bzw. einer insuffizienten Immunantwort führen. Rezeptor-Ligand-Fehlregulationen werden derzeit in der Medizin als pathophysiologische Grundlage für bestimmte Krankheiten diskutiert. Zu einer Minderfunktion des Immunsystems kommt es z.B. im Rahmen des Hyper-IgM-Syndroms. Diesem liegt eine Mutation in der Aminosäuresequenz des CD40-Liganden zugrunde (Graf et al., 1992; Allen et al., 1993; Aruffo et al., 1993). Die Patienten leiden aufgrund fehlender IgG-Produktion unter einer insuffizienten humoralen Immunantwort. Ihre B-Zellen produzieren fast ausschließlich Antikörper des Isotyps IgM und sind nicht in der Lage, den Klassenwechsel zu vollziehen. Der RANK-Ligand reguliert über seinen Rezeptor RANK die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998). Ist die Rezeptor-Ligand-Interaktion bzw. der distale Signaltransduktionsweg des RANK-Rezeptors gestört, resultiert dies in dem Krankheitsbild einer schweren Osteopetrose (Lomaga et al., 1999). Dagegen führt die Überexpression von BAFF zu einer überschießenden Funktion des Immunsystems. Die Mäuse entwickeln ein lupusähnliches Syndrom, das sich in Hypergammaglobulinämie, der Produktion von Antikörpern gegen DNA, sowie einer Autoimmunnephritis äußert (Gross et al., 2000; Khare et al., 2000; Mackay et al.,

1999; Siegel et al., 2000). Ein weiterer Rezeptor der TNFR-SF ist BCMA. Dieser wurde erstmals als Produkt der Translokation t(4:16) in T-Zell-Lymphomen entdeckt (Madry et al., 1998). Diese Translokation führt zu einer Proliferation von T-Zellen und resultiert in einer durch das Immunsystem nicht mehr regulierbaren überschießenden Reaktion.

Diese Beispiele demonstrieren, dass eine gestörte Rezeptor-Ligand-Interaktion über eine Minder- bzw. Überfunktion der Immunantwort bestimmte Krankheitsbilder auslösen kann. Der TNFR-SF und ihren Signaltransduktionsmechanismen kommt dabei eine bedeutende Rolle in der zielgerichteten und funktionsfähigen Immunantwort des Organismus zu. Welche Moleküle jedoch an den unterschiedlichen Signalkaskaden beteiligt sind und wie sie diese beeinflussen, konnte noch nicht erschöpfend gezeigt werden. Von einem detaillierten Verständnis der einzelnen Schritte innerhalb der Signalkaskaden der Rezeptoren, die die intakte Funktionsfähigkeit des Organismus garantieren, ist man noch weit entfernt.

3.1.2. Struktur und Funktion der TNFR-SF

Die Zellrezeptoren der TNFR-SF lassen sich aufgrund ihrer Signalmechanismen zwei Untergruppen zuordnen. Eine Gruppe besteht aus Apoptose-induzierenden Rezeptoren, wie z.B. p55TNFR (CD120a), Fas (CD95) und TRAIL. Sie besitzen eine konservierte Struktureinheit, die so genannte „Death Domain“ in ihrer Signaldomäne, die als Bindestelle für die Adaptermoleküle „TNF-receptor-associated-Death-Domain“ (TRADD), „Fas-associated-Death-Domain“ (FADD), „Receptor interacting protein (RIP) associated ICH-1/ CED-3-homologous protein with a death domain“ (RAIDD) und „Caspase and RIP adaptor with death domain“ (CRADD) fungieren. Diese Proteine besitzen keine eigene Enzymaktivität oder klassische Phosphorylierungsstellen, sondern dienen der Rekrutierung weiterer Signalproteine, wie zum Beispiel der „Caspase 8“. Caspasen sind Cysteinproteasen vom Typ des „Interleukin-1 β -konvertierenden Enzyms (ICE)“ (Boldin et al., 1996). Die „Caspase 8“ aktiviert weitere Caspasen durch proteolytische Spaltung und initiiert über diesen Mechanismus programmierten Zelltod.

Eine zweite Gruppe von Mitgliedern der TNFR-SF aktiviert ihren Signaltransduktionsweg über die Rekrutierung so genannter TNF-Rezeptor-

assoziierter Faktoren (TRAFs). Derzeit sind 14 Mitglieder der TNFR-SF bekannt, welche direkt mit TRAFs interagieren. Mit Ausnahme des Rezeptors BCMA handelt es sich in allen Fällen um Klasse-I-Transmembranproteine. Sie zeichnen sich zum einen durch zysteinreiche Strukturhomologien in ihren Extrazellulärdomänen sowie durch bestimmte konservierte TRAF-Bindungsstellen in ihren Intrazellulärdomänen aus. Ihre Namen sind CD40 (Stamenkovic et al., 1989), p75TNFR (Rothe et al., 1994), CD30 (Gedrich et al., 1996), CD27 (Akiba et al., 1998), LT β R (Nakano et al., 1996), RANK (Anderson et al., 1997), 4-1BB (Garni-Wagner et al., 1996), OX40 (Arch and Thompson, 1998), HVEM (Marsters et al., 1997; Hsu et al., 1997), GITR (Gurney et al., 1999; Kwon et al., 1999), BCMA (Hatzoglou et al., 2000), TACI (Xia et al., 2000), TROY (Kojima et al., 2000) und BAFF-R (Thompson et al., 2001).

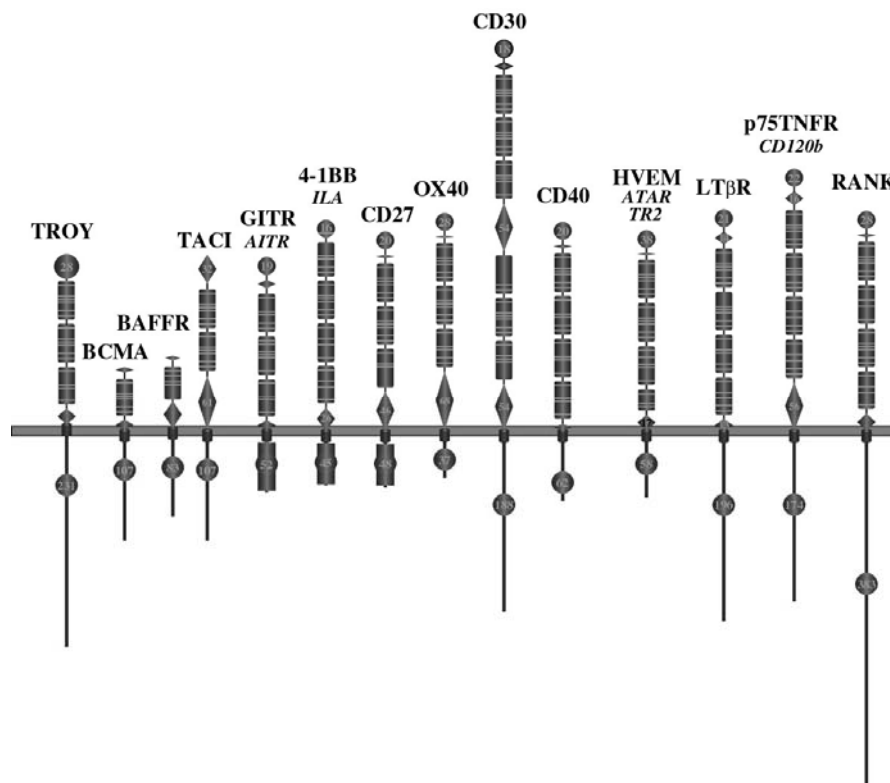


Abbildung 1: Mitglieder der TRAF-bindenden TNFR-SF. TROY, Receptor of B-Cell Activation Factor from the Tumor Necrosis Factor (TNF) Family (BAFFR), B-Cell-Maturation-Antigen (BCMA), Transmembrane Activator Calcium Modulator and Cyclophilin Ligand Interactor (TACI), Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Gene (GITR), CD137 (4-1BB), CD27, OX40, CD30, CD40, Herpesvirus-Entry-Mediator (HVEM), Lymphotoxin- β -Receptor (LT β R.), p75-TNFR, Receptor Activator of NF- κ B (RANK).

Diese Rezeptoren rekrutieren eine Vielfalt von Adaptermolekülen, die bis dato noch nicht erschöpfend untersucht wurden. Ein gemeinsames Set von Proteinen, die so genannten TRAFs, werden jedoch von allen gezeigten Mitgliedern der TNFR-SF gebunden.

Rezeptor	Expression	Funktion	Referenz
BAFFR	B-Zellen	Überleben transitorischer B-Zellen, verstärkt die humorale Immunität	(Waldschmidt and Noelle, 2001)
BCMA	Reife B-Zellen	Unbekannt	(Waldschmidt and Noelle, 2001)
TACI	Reife B-Zellen	Unterstützt die Th1-Antwort, negative Regulation der B-Zell-Antwort	(Waldschmidt and Noelle, 2001)
GITR	PBL Knochenmark, Milz, Thymus	Inhibition T-Zell-Rezeptor-vermittelter Apoptose	(Gurney et al., 1999)
4-1BB	Aktivierte T-Zellen	T-Zell-abhängige Immunantwort HIV-Replikation Antitumoraktivität	(Jang et al., 1998; Arch and Thompson, 1998)
CD27	Periphere T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen	T-T-Zell- und T-B-Zell-Interaktion	(Gravestain et al., 1998)
OX40	Aktivierte T-Zellen, HTLV-I-infizierte Zellen	Kostimulation von T-Zellen, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen	(Kawamata et al., 1998)
CD30	Gedächtnis T-Lymphozyten, virustransformierte T- oder B-Lymphozyten, Oberflächenantigen der Hodgkin-Zelle	Proliferation oder Apoptose peripherer T-Lymphozyten Induziert Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen	(Ansieau et al., 1996)
CD40	Hämatopoetische Zellen	Adhäsion, Proliferation und Induktion des Isotypswitch	(Kuhne et al., 1997)
HVEM	PBLs, Milz	Lymphozytenaktivierung, Herpesvirus-Einschleusung während der Infektion	(Marsters et al., 1997)
LTβR.	Lymphoide Zellen	Entwicklung und Proliferation sekundären Lymphgewebes	(Force et al., 2000)
p75-TNFR	Lymphoide Zellen	Proliferation von NK-, B-, reifer T-Zellen GM-CSF-Sekretion von T-Lymphozyten	(Rothe et al., 1994)
RANK	Dendritische Zellen, aktivierte T-Zellen	Aktivierung der DC-Funktion über BcL-X _L Osteoklastendifferenzierung	(Darnay et al., 1998; Galibert et al., 1998)

Tabelle 1: Expression und Funktion TRAF-bindender Mitglieder der TNFR-SF: Die Mitglieder der TNFR-SF sind auf einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems exprimiert und tragen spezifisch zu einer gerichteten Immunantwort bei.

3.2. TRAFs

3.2.1. Erstbeschreibung der TRAFs

Obwohl der TNFR-SF mit den TRAFs nur ein limitiertes Repertoire von Adaptermolekülen zur Anknüpfung an intrazelluläre Signalkaskaden zur Verfügung steht, beeinflussen sie eine große Zahl verschiedener biologischer Funktionen. Variation in der TRAF-Rekrutierung ist die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen. Derzeit sind sechs verschiedene TRAFs bekannt. TRAF1 konnte als 45kD-Protein im Komplex mit dem p75TNFR kopräzipitiert (Rothe et al., 1994) werden. Die gleiche Arbeitsgruppe entdeckte mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid-System“ (YTH) die direkte Interaktion von TRAF2 mit der intrazytoplasmatischen Domäne des p75TNFR. TRAF3, auch unter dem Namen CAPI oder CRAF1 bekannt, wurde zum ersten Mal als CD40-bindendes Protein im YTH-System entdeckt (Hu et al., 1994). TRAF4, ursprünglich CART1 genannt, wurde auf der Suche nach mammarkarzinomspezifischen Genen entdeckt (Regnier et al., 1995). TRAF5 wurde als $LT\beta R$ -bindendes Protein mittels PCR gefunden, wobei hierfür Oligonukleotidprimer benutzt wurden, die den konservierten Aminosäuremotiven der TRAF-Domäne des TRAF1, -2 und -3 entsprachen (Nakano et al., 1996). Unabhängig davon wurde TRAF5 auch als CD40-bindendes Protein beschrieben (Nakano et al., 1996). TRAF6 wurde ursprünglich als signalvermittelndes Molekül für die CD40- und IL1-Rezeptor-induzierte (Cao et al., 1996) Aktivierung von NF- κ B (Ishida et al., 1996b) beschrieben.

3.2.2. Struktur und Funktion der TRAFs

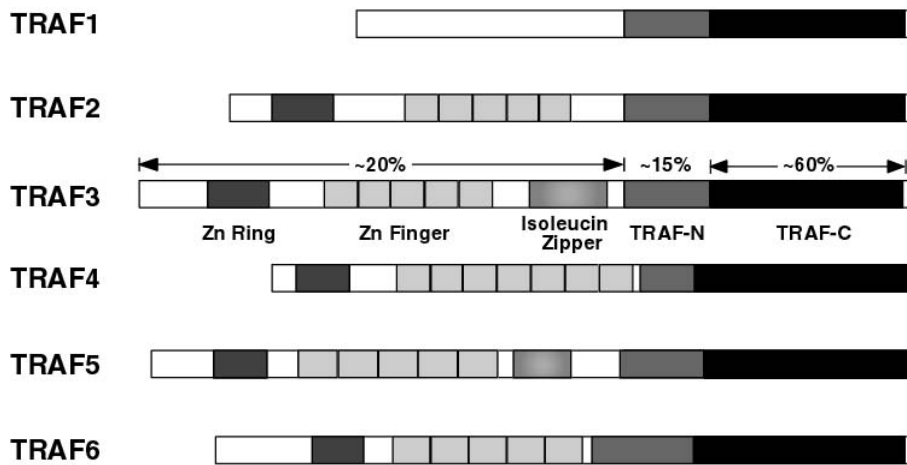


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TRAF-Proteine. TRAF-Proteine besitzen einen hoch konservierten C-Terminus für die Bindung an Rezeptoren oder die Interaktion mit anderen TRAFs. Der N-Terminus ist weniger konserviert. Er besteht aus Zink- bzw. Zink-Ring-Fingern, die vermutlich für die funktionelle Aktivität der TRAFs kodieren.

Die TRAF-Rekrutierung an die Intrazellulärdomäne der Mitglieder der TNFR-SF wird durch Ligandbindung und Trimerisierung der Rezeptoren induziert. Da alle Rezeptoren der TNFR-SF durch agonistische Antikörper, jedoch nicht durch monovalente F(ab)-Fragmente dieser Antikörper (Clark and Ledbetter, 1986; Engelmann et al., 1990; Paulie et al., 1989), aktiviert werden können, wurde postuliert, dass die Rezeptortrimerisierung bzw. –aggregation den wesentlichen Aktivierungsmechanismus der TNFR-SF darstellt. Gezeigt wurde dies erstmals an der Kristallstruktur des Komplexes von Lymphotoxin α ($LT\alpha$) und TNFRI (Bazzoni and Beutler, 1996; Banner et al., 1993). Die Trimerisierung wird als notwendige Bedingung für die TRAF-Rekrutierung angesehen.

Alle TRAFs zeichnen sich durch eine TRAF-C- und eine TRAF-N-Domäne aus. Die TRAF-C-Domäne ist genetisch zu 60% konserviert, wohingegen die TRAF-N-Abschnitte nur zu 15% übereinstimmen. Die TRAF-C-Domäne vermittelt die Interaktion zwischen den TRAF-Monomeren, die Bindung von TRAFs an den Rezeptor, sowie an andere Signalmoleküle wie „NF- κ B inducing Kinase“ (NIK) oder I-

TRAF/TANK. Über die TRAF-C-Domäne wird auch die direkte Bindung von TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF6 an den Rezeptor vermittelt, wohingegen TRAF4 und TRAF5 nur indirekt gebunden werden. Zusätzlich zu den konservierten TRAF-Domänen besitzen TRAF2, -3, -4, -5 und -6 einen Zink-Ring-Finger und bis zu sechs Zink-Finger-Motive. Sie sind N-terminal lokalisiert und dienen als DNA-Protein- oder Protein-Protein-Interaktionsstellen. Neuere Arbeiten postulieren, dass die TRAFs im Bereich ihrer Ring-Finger auch Ubiquitinaseaktivitäten besitzen (Brown et al., 2002). Diese sind für die rezeptorinduzierte Ubiquitinierung der TRAFs verantwortlich. Dieser Prozess führt zu Proteasom-vermittelter Degradierung und reguliert so die Funktion TRAF-abhängiger Signalkaskaden (Bishop, 2004). Anders als die anderen TRAFs besitzt TRAF1 lediglich einen Zink-Finger. TRAF3 und TRAF5 besitzen außerdem ein Isoleuzin-Zipper-Motiv, das diese beiden Proteine zur Heteromerisierung befähigt. Daraus ergibt sich die Möglichkeit der indirekten Rekrutierung von TRAF5 an einen Rezeptor, dem eine direkte Bindungsstelle für diesen Faktor fehlt. Ebenso bilden TRAF1 und TRAF2 über ihre TRAF-Domäne Hetero- und Homooligomere. Zur Homooligomerisierung sind alle sechs TRAFs befähigt (Pullen et al., 1998). Die N-terminalen Strukturen der TRAFs sind in geringerem Maße konserviert. Es entspricht der gängigen Meinung, dass diese Bereiche verschiedene Signalmoleküle binden und dadurch rezeptorspezifische Funktionen vermitteln.

3.2.3. Bindungsmotive für TRAFs innerhalb der Rezeptorsequenz

Außer für TRAF4 konnten sowohl über Mutationsanalysen als auch über Kristallstrukturanalysen definierte Bindemotive für die TRAF-Moleküle an den Mitgliedern der TNFR-SF identifiziert werden. Für die TRAF1-, TRAF2- und TRAF3-Bindungsstelle wurde in Mutationsanalysen das Konsensusmotiv P_xQ_x(T/S/D) im LMP1, CD30, CD40 und CD27 (Devergne et al., 1996; Franken et al., 1996; Aizawa et al., 1997; Boucher et al., 1997; Brodeur et al., 1997; Akiba et al., 1998; Gedrich et al., 1996; Pullen et al., 1998; Sandberg et al., 1997), sowie die S_xEE-Sequenz des p75TNFR und des CD30-Rezeptors (Rothe et al., 1994; Boucher et al., 1997) und das QEE-Motiv der Rezeptoren 4-1BB und OX40 (Ye et al., 1999; Arch et al., 1998) identifiziert.

Kristallanalysen der TRAF-Domäne des humanen TRAF2 mit Peptiden der Rezeptoren CD40, CD30, OX40, 4-1BB und dem EBV-Onkoprotein LMP1 ergaben die Motive (P/S/A/T)x(Q/E)E und PxQxxD für die TRAF2-Bindung (Ye et al., 1999). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Peptidsequenzen wie ExGKE und VxxSxxEE TRAF-Rekrutierung vermitteln können. TRAF6-Bindung wird durch das Aminosäuresequenzmotiv QxPxEx mit den N-terminal angrenzenden basischen Aminosäuren und den sauren C-terminalen Aminosäuren vermittelt. An den CD40-Rezeptor wird TRAF6 über die Peptidsequenz QEPQEINF (AA 211-218) rekrutiert (Pullen et al., 1998). Die genannten Bindemotive werden in allen TRAF-bindenden Rezeptoren gefunden.

3.2.4. TRAF-vermittelte Signaltransduktionswege

TRAFs waren bislang als Adaptermoleküle ohne eigene Signalaktivität beschrieben. Nach Ligand-induzierter Stimulation der Rezeptoren und Interaktion mit ihrem Rezeptor verknüpfen sie diesen mit unterschiedlichen, aber für jeden Rezeptor spezifischen Signalkaskaden. Diese werden über bestimmte Proteasen (z.B. Caspasen), Phospholipasen (z.B. Phospholipase A2) oder Proteinkinasen (z.B. MAPK) aktiviert. Neueste Untersuchungen lassen vermuten, dass die TRAFs Ubiquitinaseaktivität besitzen. Wie Brown et al. beschreiben, sind sie in der Lage, ihre eigene rezeptorinduzierte Degradierung zu regulieren (Brown et al., 2002).

Ein bedeutender Signalweg, der - neben einer Vielzahl von anderen Liganden und Zytokinen - von allen TRAF-bindenden Mitgliedern der TNFR-SF aktiviert wird, besteht in der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B. An der Induktion der NF- κ B-Translokation in den Zellkern sind proximal die Adaptorproteine TRAF2, -5 und -6 beteiligt. Über die Bindung der TRAFs an den Rezeptor können zwei NF- κ B-Signalwege aktiviert werden. Über einen klassischen Signalweg werden die NF- κ B-Komponenten RelA und p50 in den Nukleus transloziert. Die Aktivierung des klassischen Signalwegs erfolgt über inflammatorische Zytokine, Viren, Toll-like-Rezeptoren (TL-Rs) und Pathogenkontakt. Über diese Kaskade wird die Transkription verschiedenster entzündungsfördernder Zytokine, Chemokine und

Adhäsionsmoleküle reguliert. Der klassische Signalweg ist für die Bekämpfung von Entzündungsreaktionen und somit für die angeborene Immunität bedeutend.

Der alternative Signalweg hingegen induziert den Übertritt der NF- κ B-Moleküle p52 und RelB in den Zellkern (Karin and Ben-Neriah, 2000). Über diese Kaskade wird die Differenzierung und Proliferation der Lymphorgane sowie der daran beteiligten Zellen reguliert. Die erworbene Immunantwort ist somit sehr stark von diesem Signalweg abhängig (Bonizzi and Karin, 2004). Ein zusätzlicher antiapoptotischer Effekt von NF- κ B beeinflusst den Zell-Zyklus und greift in viele Aspekte der Onkogenese ein. Zum Beispiel konnte NF- κ B als Produkt des Onkoproteins BCR-ABL aus Zelllinien, die von Patienten mit myeloischer Leukämie stammten, als essentielle Komponente der onkogenen Aktivität nachgewiesen werden (Reuther et al., 1998).

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. Durch Stimulation werden N-terminale Serine des I κ B durch den I κ B-Kinase-(IKK)-Komplex phosphoryliert (Israel, 2000). Dieser besteht aus drei Komponenten, der IKK α , der IKK β und einer regulatorischen Einheit, die IKK γ oder auch NEMO genannt wird (Viatour et al., 2005; Israel, 2000). Die Phosphorylierung des I κ B α führt zu seiner Degradierung. Das aus dem IKK-Komplex gelöste NF- κ B kann nun in den Nukleus translozieren und dort über die Bindung an spezifische Promotoren die Transkription verschiedener Gene aktivieren.

Als ein Bindeglied zwischen den an den Rezeptor gebundenen TRAF-Molekülen und der Aktivierung von NF- κ B gilt die „NF- κ B inducing Kinase“ (NIK). Diese wurde erstmals als TRAF2-gebundenes Signalprotein isoliert (Malinin et al., 1997). NIK phosphoryliert besonders effektiv die IKK α -Einheit des IKK-Komplexes (Senftleben et al., 2001). IKK α ist wiederum an der Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs beteiligt und führt zur nukleären Translokation von p52/RelB-Heteromeren (Ling et al., 1998). NIK interagiert über ein bekanntes Konsensusmotiv mit TRAF1, -2, -3, -5 und -6 (Song et al., 1997). Die Bindung an TRAF4 wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht.

Im Gegensatz zu NIK binden TRAFs auch an viele unterschiedliche intrazelluläre Moleküle, die inhibitorisch auf die NF- κ B-Aktivierung wirken. Das „inhibitor of apoptosis“-Protein (cIAP), das „TRAF and TNF receptor associated protein“ (TTRAP)

(Pype et al., 2000) und A20 (Opipari et al., 1990) gehören zu dieser Gruppe zytoplasmatischer Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass cIAP direkt Caspasen hemmt und auf diesem Weg Apoptose regulieren kann. A20 ist ein effektiver Inhibitor von TRAF- bzw. MAP-Kinasen-vermittelter NF- κ B-Aktivierung (Zetoune et al., 2001; Hess et al., 1998). Für TRAF6 wird postuliert, dass es der Gruppe der Mg²⁺/Mn²⁺-abhängigen Phosphodiesterasen angehört und über seine Endonukleaseaktivität Einfluss auf den Signalweg nimmt (Rodrigues-Lima et al., 2001).

Über die Bindung an Moleküle mit Todesdomäne, wie zum Beispiel TRADD, können TRAFs an Rezeptoren binden, die direkt mit Proteinen mit einem Death-Domain-Motiv interagieren. Andererseits binden sie auch an Rezeptoren ohne Death-Domain-Motiv und induzieren über diese unter anderem NF- κ B. Auf diese Weise können TRAFs als Schaltelement zwischen Apoptose-induzierenden und antiapoptotischen Effekten der Mitglieder der TNFR-SF fungieren.

Neben der Interaktion der TRAFs mit den oben genannten körpereigenen Proteinen wurden auch Interaktionen der TRAFs mit viralen Proteinen wie z.B. LMP1 nachgewiesen (Mosialos et al., 1995). Dieses Molekül wird von dem Epstein-Barr-Virus kodiert und ist mit der Entstehung von Burkitt-Lymphomen, sowie Karzinomen des Nasopharynxbereiches assoziiert. Das Protein LMP1 bindet z.B. an TRAF1, -2, -3 und -5 (Xie et al., 2004; Bishop, 2004). Kaye et al. zeigten, dass LMP1 transformierende Wirkung besitzt und somit entscheidende Prozesse in der Onkogenese steuert. Diese Beobachtungen legen nahe, dass TRAF-vermittelte Signale auch an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind (Kaye et al., 1993; Kaye et al., 1995).

Neben der NF- κ B-Aktivierung regulieren die TRAFs die Aktivität weiterer Kinasen und Transkriptionsfaktoren. TRAF2 und TRAF6 vermitteln z.B. die Aktivierung der c-JUN-N-terminalen Kinase (JNK) und beeinflussen auf diesem Wege die transkriptionelle Aktivität von AP-1 (Chung et al., 2002). TRAF6 aktiviert außerdem die „Extra-Cellular-Signal-Regulated-Kinase“ (ERK) (Kashiwada et al., 1998). Die Funktion von TRAF1, TRAF3 und TRAF4 hingegen ist in diesem Zusammenhang noch nicht ausführlich untersucht.

3.2.5. TRAF-„knock out“-Experimente und ihre Bedeutung für den lebensfähigen Organismus

Die Bedeutung einzelner TRAFs für den Organismus in seiner Gesamtheit wurde mit Geninaktivierungsexperimenten untersucht. TRAF2-, TRAF3- und TRAF6-Defizienz führte zu erhöhter postnatalen Sterblichkeit (Lomaga et al., 1999; Naito et al., 1999; Xu et al., 1996; Yeh et al., 1997). TRAF3-defiziente Mäuse weisen zusätzlich eine progressive Hypoglykämie, sowie eine Depletion peripherer, weißer Blutzellen auf und versterben am Tag 10 nach Geburt (Xu et al., 1996). Mäuse, denen das TRAF6-Gen fehlt, litten bei Geburt außerdem unter schwerer Osteopetrose. Als Ursache wurde eine fehlende Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten gezeigt. Die Inaktivierung des TRAF5-Gens beeinträchtigte die Lebensfähigkeit der Mäuse nicht, bestätigte aber die Beteiligung dieses Adapterproteins am NF- κ B-Signalweg von CD40 und CD27 (Nakano et al., 1999). Alle bisherigen Studien zeigen, dass TRAF-Proteine von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Funktionsfähigkeit des erwachsenen Organismus sind. Aufgrund der großen Anzahl von Rezeptoren, für deren Signalweg sie eine Rolle spielen, ist dies nicht überraschend. Die Inaktivierung eines TRAF-Gens beeinträchtigt somit immer die Funktion mehrerer Rezeptoren. Rückschlüsse auf die biologische Rolle eines bestimmten TRAFs für die Signaltransduktion eines Mitgliedes der TNFR-SF auf der Basis von Gen-Inaktivierungsexperimenten sind somit nur bedingt möglich.

Ein alternativer Ansatzpunkt, die Bedeutung der einzelnen TRAFs zu verstehen, ist es, die Variationen in der TRAF-Rekrutierung an den Rezeptoren aufzuzeigen und darüber auf die Rezeptorfunktion zu schließen.

4. ZIELSETZUNG

Bis jetzt wurde die TRAF-Rekrutierung nur für einzelne Rezeptoren untersucht. Dabei wurden Methoden verwendet, die keine vergleichende Messung der TRAF-Bindung erlaubten. Ein systematischer Vergleich des Rekrutierungsverhaltens TRAF-bindender Rezeptoren wurde deshalb noch nicht durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es,

1. eine Testmethode zu entwickeln, die es erlaubt, die Signaldomänen aller TRAF-rekrutierenden Mitglieder der TNFR-SF hinsichtlich ihrer TRAF-Rekrutierungsfähigkeit miteinander zu vergleichen,
2. eine systematische und zumindest semiquantitative Definition der TRAF-Rekrutierungsmuster an Signaldomänen der TNFR-SF vorzunehmen,
3. die In-vitro-Korrelation der Rekrutierungsmuster zur Signalaktivität der untersuchten Rezeptoren am Beispiel von NF- κ B zu bestimmen.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Reagenzien

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

5.1.1. Zellen und Zellkulturmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Zelllinie	Quelle
HEK293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen (freundlich überlassen von Dr. D. Wallach, Weizmann Institute of Science)
BHK _{wt}	Babyhamster Nierenzellen (ATCC CRL 6281)
BHK _{CD40L}	Stabil mit CD40-Ligand-transfizierte BHK-Zellen
BHK _{CD27L}	Stabil mit CD27-Ligand-transfizierte BHK-Zellen
CHO TNF	CHO transfiziert mit unsezernierbarem TNF
H9	HTLV-1-transformierte T-Zelle einer T-Zell-Leukämie
LC5	Humane embryonale Lungenfibroblasten
Ramos	Humane Burkitt-Lymphomzelllinie (ATCC CRL 1596)
C8166	HTLV-1-transformierte T-Zelllinie

Tabelle 2: Liste der verwendeten Zelllinien

Das Zellkulturmedium Dulbecco's MEM Glutamax I Medium (Gibco BRL) enthielt 5% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin), 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin (Boehringer Ingelheim) und 1mM Natrium-Pyruvat (Gibco

BRL). Das Kulturmedium der transfizierten Zelllinien BHK_{wt}, BHK_{CD40L}, und BHK_{CD27L} wurde zusätzlich mit 200µg/ml Geneticin G418 (Invitrogen) versetzt. Alle Zellen wurden in einer H₂O gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 8% CO₂ kultiviert.

5.1.2. Puffer

HeBS:

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

Hochsalzpuffer DEAE:

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

TFBI-Medium:

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

TFBII-Medium:

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

Blockpuffer für ELISA:

PBS/0,05% Tween/1% BSA/NaN₃

Lysepuffer für Rekrutierungs-ELISA:

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

Citratpuffer:

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

Substratpuffer für Reporterassay:

25mM Glycylglycin pH7,8, 60mMDTT, 10mM MgSO₄, 1mM ATP und
35µM Luziferin (P.J.K Industrievertretung HandelMarketing GmbH, Kleinblittersdorf)

Lysepuffer für Reporterassay:

25mM Glycylglycin pH7,8, 10mM MgSO₄, 0,5% Triton X 100 und 1%BSA

PufferA für Kernextrakte:

10mM Hepes (pH 7.6)

15mM KCl

2mM MgCl₂

0.1mM EDTA

Puffer C für Kernextrakte:

25mM Hepes (pH 7.6)

50mM KCl

0.1mM EDTA (pH 8.0)

10% Glycerol

1mM DTT

0.1M PMSF in Isopropanol

100KIU Aprotinin/ml

5.1.3. Antikörper

Monoklonale Antikörper	Bezeichnung	Quelle
Maus-IgG ₁ -anti-humanes-CD40 aus Kulturüberständen des G28.5 Hybridoms gereinigt	G28.5	ATCC HB 9110
Maus-IgG ₁ -antiXpress	α Xpress	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Maus-IgG ₁ -anti-denaturiertes-humanes-IL-4, Isotypkontrolle	2-28	im Labor vorhanden
Maus-anti-myc (9E10) Kulturüberstand	M α -myc	ATCC
Maus-IgG ₁ -anti-humanes-CD40 aus Kulturüberständen des RO1 Hybridoms gereinigt	RO1	Im Labor vorhanden
Maus-IgM-anti-humanes-CD27	M-T272	Im Labor vorhanden
Biotinyliertes Maus-IgG ₁ -anti-CD27	M-T271 bio	Im Labor vorhanden
Maus-IgG-anti-p75TNFR #41	α TBPII#41	Im Labor vorhanden
Maus-IgG ₁ -anti-NF- κ B p52 cat. #05-361	M α p52	Upstate Biotechnology, Lake Placid
Maus-IgG ₁ -anti-NF- κ B RelA cat. #8008	M α RelA	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Maus-IgG ₁ -anti- β Aktin cat. A-5441	M α Aktin	SIGMA

Polyklonale Antikörper	Bezeichnung	Quelle
Kaninchen-anti-TRAF1 (G-20 SC-983)	K α TRAF1	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-TRAF2 (H-249 SC-7187)	K α TRAF2	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-TRAF3 (H-206 SC-949)	K α TRAF3	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen-anti-TRAF5 (H-257 SC-7220)	K α TRAF5	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-TRAF6 (H-274 SC-7221)	K α TRAF6	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-p75TNFR	K α TBPII	Im Labor vorhanden
Kaninchen-anti-NF- κ B p50 (H-119 SC-7178)	K α p50	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Kaninchen-anti-CD40 (EZD)	K α CD40	Im Labor vorhanden
Kaninchen-anti-NF- κ B RelB (C-19 sc-226)	K α RelB	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California
Polyklonale Detektionsantikörper	Bezeichnung	Quelle
Peroxidase-markiertes-Kaninchen- anti-Mausimmunglobulin Antiserum	P260	DAKO GmbH, Hamburg
Peroxidase-markiertes-ZiegelgG- anti-Kaninchenimmunglobulin Antiserum	G α K	Dianova, Hamburg
Peroxidase-markiertes-ZiegelgG- anti-Kaninchen-IgG (H+L) Antiserum	G α RIgG(H+L)	Dianova, Hamburg
Peroxidase-markiertes-ZiegelgG- anti-Maus IgG Antiserum	G α M	Dianova, Hamburg
Peroxidase-markiertes-ZiegelgG- anti-Kaninchen-IgG (FAB) Antiserum	G α KFab	Dianova, Hamburg

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

5.1.4. 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 Mutationsprimer für die Insertion der MluI-Schnittstelle in die CD40-cDNA wurden über die Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

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

Rezeptor	cDNA IMAGE-Klone	Primer
CD27TM CD27IZD	I: 1241134 (3122-g23)	MLUI5'AAA-CGC-GTT-CGC-ATC-CTT-GTG-ATC-TTC-TC3' MLUI5'AAA-CGC-GTA-TAT-AGA-TCA-AAC-AAA-GGA-GAA-A3' SALI5'GCG-CAG-TCG-ACT-GGG-CTC-CTG3'
LT β TM LT β IZD	I: 740737 (1819-f02)	MLUI5'AAA-CGC-GTA-ACC-ATG-CTG-ATG-CTG-GCC-G3' MLUI5'AAA-CGC-GTT-TCT-CTC-TGC-AGG-AAA-CTG-GGA3' SALI5'TGT-GCC-CCC-CTT-CGT-CGA-CCT-TTT-C3'
OX40TM OX40IZD	I: 2389923 (5936-b04)	MLUI5'AAA-CGC-GTT-GCC-GCC-ATC-CTG-GGC-CT3' MLUI5'AAA-CGC-GTG-AGG-CTG-CCC-CCC-GAT-GC3' XHO5'CTC-CGG-GCT-CGA-GCC-TGG-C3'
BCMATM BCMAIZD	I: 1130845 (2835-d14)	MLUI5'TCA-GTG-AAA-GGA-CGC-GTT-GCG-ATT-CTC-TGG-AC3' MLUI5'CTA-AGG-AAA-CGC-GTC-TCT-GAA-CCA-TTA-AAG-GA3' KPN5'CTA-ACA-TAA-AGA-GGT-ACC-ACA-GTT-AGA-GG3'
CD30TM CD30IZD	LC5	MLUI5'AAA-CGC-GTG-AAG-CCC-GTT-CTG-GAT-GCA3' MLUI5'AAA-CGC-GTC-TGC-AGG-AAG-CGA-ATT-CGG-C3' SALI5'CAA-CCT-CGG-TGT-CGA-CAG-TGC-CAT3'
HVEMTM HVEMIZD	TT stim.T-Zellen	MLUI5'AAA-CGC-GTG-GTA-TGG-TGG-TTT-CTC-TCA-GG3' MLUI5'AAA-CGC-GTG-CCA-AGG-GGT-GAT-GTA-GTC-AAG-G3' SALI5'TTC-AGC-AGT-CGA-CAC-TCC-AGG-TA3'
RANKTM RANKIZD	C8166	MLUI5'AAA-CGC-GTG-CCC-GGT-TTA-ATA-ATT-CTG-CTT3' MLUI5'AAA-CGC-GTA-AAA-GGG-AAA-GCA-CTC-ACA-GC3' 1520 5'GAG-CCT-CCC-ATC-AGC-CCC-ATC-C3' 1305 5'CAA-AAA-GAG-GTG-GAC-AGT-GGC-C3' Sal5'GCT-GGG-GTC-GAC-GCT-GCG-GTG-CTG3'
TACITM TACIIZD	RAMOS	MLUI5'AAA-CGC-GTC-ACG-CTG-GGG-CTC-TGC-CTG-T3' MLUI5'AAA-CGC-GTG-GAT-CCC-TGC-TCC-TGC-CAG-CCC-C3' SALI5'GAC-TCA-GAG-TGC-GTC-GAC-CTC-CTG-CT3'
4-1BBTM 4-1BBIZD	H9	MLUI5'AAA-CGC-GTG-CAG-ATC-ATC-TCC-TTC-TTT-CTT-G3' MLUI5'AAA-CGC-GTT-GTT-AAA-CGG-GGC-AGA-AAG-A3' XHO5'GGG-GGA-ATC-TCG-AGT-ATT-ATG-TAG-G3'

Rezeptor	cDNA IMAGE-Klone	Primer
GITRTM GITRIZD	TT stim T-Zellen I:2 449786 (6091-p11)	MLUI5'AAA-CGC-GTA-GAG-CCG-CTT-GGG-TGG-CTG-AC3' MLUI5'CAG-CTG-AGG-AGA-CGC-GTC-ATG-TGG-CCC-CG3' KPN15'CTG-CGG-TCG-GTA-CCC-CCG-GAG-GA3'
P75 TNFRM P75TNFRIZD	Plasmid im Labor vorhanden	MLUI5'AAA-CGC-GTC-GAC-TTC-GCT-CTT-CCA-GTT-GG3' MLUI5'AAA-CGC-GTC-TTG-TGC-CTG-CAG-AGA-GAA-GCC-A3' SAL5'GCT-GCG-GCT-GTC-GAC-GGC-ACT-AGA-G3'
CD40TM CD40IZD	cDNA	MLUI5'GTG-GTC-CCC-AGG-ATC-GGC-TGA-GAG-CCC-TGG-TGG3' MLUI5'CTG-GTC-TTT-ATC-AAA-AAG-GTG-GCC-AAG-CCA- ACC-AAT-AAG-G3'

Tabelle 4: Verwendete cDNA- und IMAGE-Klone sowie PCR-Primer

RT-PCR

cDNA	Quelle
RAMOS, LC5, TT stim. T-Zelllinie, H9	Freundlich überlassen durch Frau Christine Federle, Labor Prof. Dr. Rieber
RNA	Quelle
C8166	Freundlich überlassen durch Frau Christine Federle, Labor Prof. Dr. Rieber

5.2. Methoden

5.2.1. Klonierung der Hybridrezeptoren

5.2.1.1. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit SuperscriptTM II RnaseH⁻ Reverse Transkriptase (200U/ μ l) (Gibco) nach Vorschrift des Herstellers. 5 μ g RNA wurden mit 1 μ l 10mM dNTP (Pharmacia) und 0,1 μ l verdünnte 10x „random hexamer“ Primer (Boehringer Mannheim, Mannheim) umgeschrieben. Die entstandene cDNA wurde mit H₂O auf 200 μ l Endvolumen aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

5.2.1.2. Präparative PCR

Jede PCR-Reaktion wurde in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) in einem UNO40-Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit folgendem Ansatz durchgeführt:

5µl verdünnte cDNA bzw. 10ng Plasmid der IMAGEklone, jeweils 125ng 5'- und 3'-Primer, 5µl dNTP (2mM) (Pharmacia), 3µl 10xPuffer mit 15mM MgCl₂ (Boehringer Mannheim), 1U pfu DNA-Polymerase (Stratagen), H₂O ad 30µl und 30µl Mineralöl (Sigma).

PCR- Programm:		CD27, LTβR, HVEM, TACI, p75TNFR, CD30, RANK	GITR, BCMA, 4-1BB	OX40
Denaturieren	95°C, 2min			
Denaturieren	95°C, 40s			
Primerbindung	X °C, 40s	55 °C Zykluszahl 10	50 °C Zykluszahl 10	57°C Zykluszahl 10
Synthese	72°C, 80s			
Denaturieren	95°C, 40s			
Primerbindung	X°C, 80s	58 °C Zykluszahl 15	54 °C Zykluszahl 25	60 °C Zykluszahl 25
Synthese	72°C, 40s			
Synthese	72°C, 2min			

Die PCR-Produkte wurden phenolisiert, gefällt, mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen (10U) (Abb.3) (Boehringer Mannheim) verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Produkte mit einer Länge

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

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

Zur Aktivierung wurde die DEAE-Zellulose (NA 45, Schleicher & Schuell, Dassel) in geeignete, ca. 0,5cm breite Streifen geschnitten, danach für 10 min in 10mM NaEDTA pH 8, 5 min in 0,5M NaOH getränkt und daraufhin mehrmals mit H₂O gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in 0,1mM 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 platziert. 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 500µl Hochsalzpuffer bei 65°C 30 min eluiert, nach Standardprotokoll (Sambrook 1989) mit Isopropanol gefällt und gewaschen. Die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgte mit Hilfe eines DNA-Standards im 3% bzw 1.5% Agarosegel.

5.2.1.4. Ligation der cDNA der Hybridrezeptoren in einen Expressionsvektor

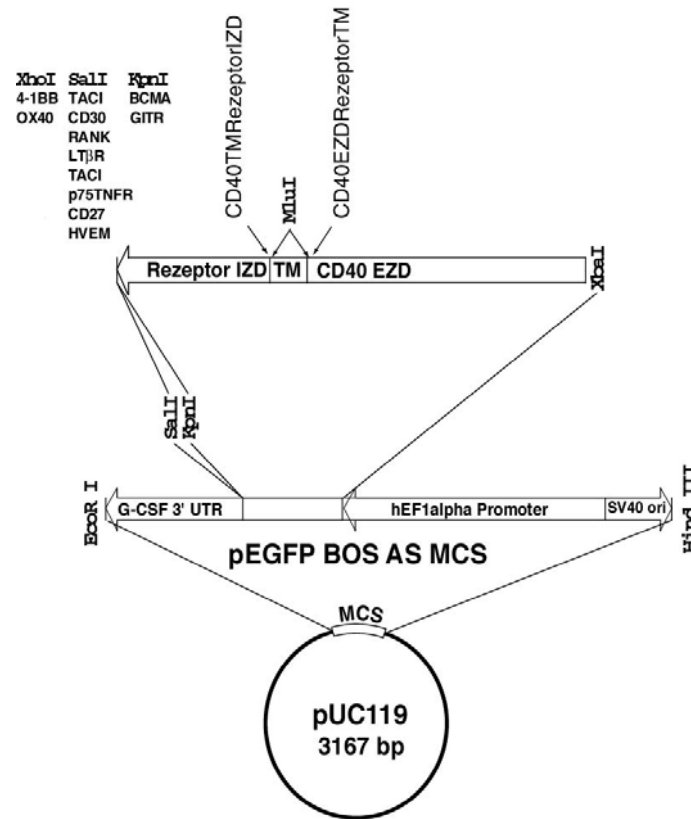


Abbildung 3: Klonierungskarte der Hybridrezeptoren. Dargestellt ist der Vektor pEGFPBosASMCS, in den die Rezeptorhybridsequenz einligiert wurde. Es sind die Rezeptorkonstrukte CD40TMRezeptorIZD und CD40EZDRezeptorTM beschrieben.

Zur Klonierung der Hybridrezeptoren wurde der eukaryontische Expressionsvektor pEFBosASMCS benutzt. Dieser Vektor ist ein Derivat des ursprünglichen pEFBos-Vektors, in den weitere Enzymschnittstellen mit Hilfe eines NheI-XbaI-Fragmentes des kommerziell erhältlichen pEGFP-N1-Plasmids eingefügt wurden. Die CD40EZDRezeptorTM-Hybride wurden aus der Extrazellulärdomäne des CD40-Rezeptors (CD40EZD) mit der jeweiligen Rezeptor-Transmembran- (TM) und der Rezeptor-Intrazellulärdomäne (IZD) zusammenkloniert. Die Klonierung erfolgte an einer MluI-Schnittstelle in der CD40-Sequenz am Übergang der CD40-Extrazellulärdomäne zur CD40-Transmembrandomäne. Die MluI-Schnittstelle in der CD40-cDNA wurde durch PCR-vermittelte Mutagenese mit dem „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene eingefügt. Hieraus resultierte eine Mutation von Asparaginsäure (D) zu Glutaminsäure an Position 190 der CD40-cDNA.

Die CD40TMRezeptor^IZD-Hybride wurden aus der Extrazellulär- und der Transmembrandomäne des CD40 mit der Intrazellulärdomäne des Rezeptors von Interesse zusammenkloniert. Die Klonierung erfolgte an einer nach der Transmembrandomäne des CD40 eingefügten MluI-Schnittstelle.

Anschließend wurden die durch PCR generierten cDNA-Fragmente, die für den Transmembran- und den intrazytoplasmatischen Bereich der Rezeptoren kodieren, zusammen mit der für die Extrazellulärdomäne von CD40 kodierenden cDNA (XbaI/MluI) in den pEGFPBosASMCS einkloniert. Die Restriktionsschnittstellen in den cDNA-Fragmenten für die entsprechenden Rezeptoren wurden durch PCR-vermittelte Mutagenese geschaffen (Abb.3). Dabei wurde darauf geachtet, dass kein Aminosäureaustausch erfolgte. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

Der Plasmidvektor pEGFPBosASMCS wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und Sall nach Vorschrift geschnitten und, um eine Vektorrelegation zu vermeiden, mit 1µl alkalischer Phosphatase 1U/µl (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. In zwei Ansätzen wurden einmal 100ng und einmal 20ng geschnittenes und gereinigtes Rezeptor-PCR-Fragment mit jeweils 20ng verdautem und dephosphoryliertem Vektor, 1µl 10x Ligasepuffer (Roche), 1U T4 DNA-Ligase (Roche) und H₂O ad 10µl für 24 Stunden bei 16°C ligiert. Das verwendete CD40-Plasmid sowie die CD40-Mutanten CD40₁₋₂₂₂, CD40_{E235A}, CD40_{T245A}, CD40_{TAQE263QE274} und CD40₁₋₂₄₅ waren bereits im Labor vorhanden und standen zur Verfügung. Sie wurden durch PCR-vermittelte Mutagenese generiert und nach dem bekannten Protokoll in den Vektor pEFBos einkloniert. Eine graphische Darstellung der mutierten CD40-Konstrukte findet sich auf Seite 58.

Ebenso war die cDNA des p75TNF-Rezeptors bereits im Labor vorhanden.

Der Rezeptor CD27 (IMAGE 1241134 (3122-g23)) wurde als XbaI/XhoI-Fragment aus dem Klonierungsvektor pBSISK+ in den XbaI/Sall-verdauten und dephosphorylierten Expressionsvektor pEGFPBosASMCS einkloniert.

Ebenfalls zur Verfügung standen die Moleküle TRAF1, -2, -3, -5, -6 und ΔTRAF3(324-567). ΔTRAF3(324-567) ist eine dominant negative Mutante des TRAF3 Moleküls (Abb. 12). Alle TRAFs wurden in voller Länge in den pCDNA3-Vektor (Invitrogen) einkloniert. Die ΔTRAF3-Mutante wurde in den Vektor pCDNA3.1

einkloniert. Die TRAF4-cDNA aus dem IMAGE-Klon 2005824 wurde als BgIII-Fragment in den, mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pCDNA3 einkloniert. Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft.

5.2.1.5. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Escherichia coli DH5 α Bakterien wurden in 500ml TYM-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1M NaCl, 10mM MgSO₄) im Bakterieneschüttler 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 bei 4°C für 15 min zentrifugiert (Sorvall RC-5B Zentrifuge, Du Pont Instruments, Bad Homburg) und in 100ml eiskaltem, steril filtriertem TFB1-Medium vorsichtig resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Bakterien wiederum abzentrifugiert und in 20ml eiskaltem TFB2-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Dagert Ehrlich 1979).

5.2.1.6. Transformation

100 μ l kompetente DH5 α -Bakterien wurden mit 10 μ l 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 1-2ml LB-Medium verdünnt. Die Bakterien wurden eine Stunde lang bei 37°C im Bakterieneschüttler kultiviert und anschließend auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausplattiert. Von jeweils 10 Einzelkolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert.

5.2.1.7. Schnellpräparation und Überprüfung der Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Engelbrecht 1991). Vor der Fällung der DNA wurde eine zusätzliche Phenolextraktion durchgeführt. Mittels Restriktionsverdau und anschließender

Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) wurde die Insertion der Rezeptor-DNA und deren Sequenz verifiziert.

5.2.1.8. Großansatz zur Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Reinigung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde, nach einer in den „Current Protocols in Molecular Biology“ beschriebenen Methode, das Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender PEG-Präzipitation verwendet (Heilig et al., 1998). Zusätzlich wurden die Plasmide mittels HPLC aufgereinigt.

5.2.2. Zellkultur

5.2.2.1. Herstellung stabiler CD27-Ligand-Transfektanten

Die für CD27Ligand kodierende cDNA (IMAGE-Klon 2958657) wurde mit den Restriktionsenzymen SmaI und NheI aus dem Vektor pOTB7 herausgeschnitten und in den Vektor pEFBosASMCS (XbaI/SmaI) ligiert.

Für die Transfektion wurden BHK_{wt}-Zellen (ATCC) am Vortag ausgesät (10⁵ Zellen/90mm Platte). 10µg der mit ApaI linearisierten CD27L-pEFBosASMCS-DNA und 1µg des HINDIII-verdauten pTCF-Vektors, der für das Genitocinresistenzgen codiert, wurden mit 100µl Optimem und 2µl DMRIE-C (Invitrogen) verdünnt und für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Hinzufügen von weiteren 4ml Optimem wurde die DNA-Lösung auf den mediumfreien Zellrasen pipettiert. Nach 4-6 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach zwei Tagen wurden die transfizierten Zellen mit 1000µg/ml Geneticin G418 (Invitrogen) selektioniert. Die Expression wurde mit einem anti-CD27-Ligand-Antikörper (Pharmigen) mittels Immunfluoreszenz (im FACS) nachgewiesen.

5.2.2.2. *Ca-Phosphat-Transfektion in 293T-Zellen*

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

5.2.2.3. *Lyse*

Die Lyse erfolgte aufgrund des Expressionsmaximums der Proteine nach ca. 30 Stunden. Die semiadhärenten Zellen wurden von den Zellkulturplatten abgelöst und in 1,5ml Eppendorfgefäßen bei 2600rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in PBS gewaschen und auf Eis für 30min in 180µl Lysepuffer lysiert. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 3500rpm wurden die Überstände bei –80°C aufbewahrt.

5.2.3. TRAF-Rekrutierungs-ELISA

5.2.3.1. *Rekrutierungs-ELISA*

Eine ELISA-Mikrotiterplatte (Maxisorb von Greiner) wurde mit 5µg/ml monoklonalem Antikörper gegen die CD40-Extrazellulärdomäne in Coatingpuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Proteine mit PBS/0,05% Tween entfernt und noch freie unspezifische Bindungsstellen mit PBS/0,05% Tween BSA/NaN₃ blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurde die Platte mit je 50µl der Probenverdünnungen beschickt. Der gebundene Rezeptor-TRAF-Komplex wurde mit den oben genannten Anti-TRAF-Antikörpern bzw. Anti-Tag-Antikörpern und anschließend mit dem entsprechenden Peroxidasegekoppelten Immunglobulin nachgewiesen. Eine schematische Darstellung des

Sandwich-ELISAs ist in Abbildung 4 zu sehen. Als Substrat der Peroxidase dienen 1mg in DMSO gelöstes TMB (Fluka, Buchs, Schweiz) und 2µl H₂O₂ in 10ml Substratpuffer. Nach 2-5 min wurde die Farbreaktion mit 1M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption mit 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.

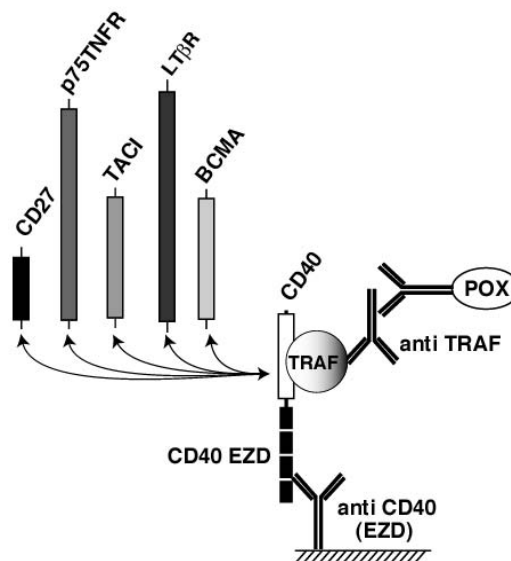


Abbildung 4: Schematische Darstellung des TRAF-Nachweises an den Hybridrezeptoren im ELISA. Der Festphasenantikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die Extrazellulärdomäne des CD40-Rezeptors gerichtet ist. Der Nachweisantikörper erkennt das TRAF von Interesse, das an die unterschiedlichen Intrazellulärdomänen gebunden ist. Der mit Peroxidase markierte Antikörper dient als Nachweis der TRAF-Rezeptor-Interaktion.

Um die Variationen innerhalb der verschiedenen Ansätze zu eliminieren wurden Standard-Extrakte für jede CD40/TRAF-Kombination hergestellt. Die Konzentration des CD40/TRAF-Komplexes in diesen Standards wurde als 1000U/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, solange die TRAFs in einem genügenden Überschuss exprimiert wurden, das Ergebnis des Rekrutierungs-ELISAs nur noch von der CD40-Expression abhängig war. 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.

Formel:

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

Zudem wurden TRAF-Rekrutierungsergebnisse relativ zur entsprechenden CD40_{WT}-TRAF-Rekrutierung dargestellt. Die TRAF-Bindung an CD40_{WT} entspricht stets 100%.

5.2.3.2. Bestimmung der CD40-Expression im ELISA

Für die Bestimmung der CD40-Gesamtexpression wurde analog zu den oben beschriebenen ELISAs als Festphasenantikörper der anti-CD40-mAk RO1 verwendet. Als Nachweisantikörper diente ein polyklonales Kaninchen-Immunglobulin gegen die lösliche Extrazellulärdomäne des CD40-(sCD40) Moleküls. Das mit Peroxidase konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-Antiserum wurde verwendet, um den ELISA zu entwickeln. Als Standard diente HPLC-gereinigtes lösliches CD40.

5.2.4. Reporter-Assay zur Detektion von NF-κB

Das verwendete Reporterkonstrukt entstammt dem ICAM-1-Promoter. Der ICAM-1-Promoter kann von TRAF-bindenden Rezeptoren aktiviert werden (Jahnke and Johnson, 1994; Jahnke et al., 1995). Die NF-κB-responsible Promotersequenz enthält zwei NF-κB-Bindungsstellen. Die Abhängigkeit der Transkription des Luziferase-Gens von den NF-κB-Bindungsstellen wurde mit Hilfe von Punktmutationen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

HEK293T-Zellen wurden in Flachbodenmikrotiterplatten in einer Dichte von 5000 Zellen pro Kavität in 100µl DMEM mit 20mM HEPES ausgesät. Nach Über-Nacht-Kultivierung bei 37°C in einer 8% CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen mit einem DNA-Plasmid-Mix transfiziert. Diese Mischung enthielt 180ng/Loch des Luziferasereporter genes pC277ΔAP2pGL3Enh (Jahnke and Johnson, 1994; Jahnke et al., 1995) und verschiedene Mengen (20-0,6ng/Loch) CD40-, CD27-, p75TNFR- oder CD40-Hybridrezeptoren-DNA. Die Unterschiede in der DNA-Menge wurden mit leerem pEFBos-Vektor ausgeglichen. Die Transfektion wurde so durchgeführt wie früher beschrieben. 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 in Medium verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden weitere 18 Stunden bei 37°C und 8% CO₂-Atmosphäre inkubiert und anschließend mit in Formaldehyd fixierten BHK_{CD40L}-, BHK_{CD27L}-, CHO-TNF- oder BHK_{Neo}-Zellen stimuliert. Drei Stunden später wurden die Zellen in 100µl Lysepuffer lysiert. 50µl von jedem Lysat wurden sofort auf 96-Loch-Lumineszenzplatten übertragen und mit 100µl 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.

Die Balkendiagramme in den Kotransfektionsexperimenten mit 6ng TRAF-Plasmid und 10ng Rezeptorplasmid wurden ebenfalls mit den CD40-Werten normiert. Es handelt sich hierbei um Dreifachwerte.

5.2.5. Herstellung von Kernextrakten

2×10^5 -Zellen (293T) wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Sie wurden gemäß dem oben genannten Protokoll mit $0.2 \mu\text{g}$ Rezeptorplasmid, $2 \mu\text{g}$ TRAF und $2 \mu\text{g}$ leerem Vektor transfiziert.

Nach 28 Stunden wurden die Zellen abgelöst, 2 mal mit PBS gewaschen und die Kernextrakte nach der Methode von Fessele et al gewonnen (Fessele et al., 2001).

Für alle Schritte wurden nur eiskalte Puffer verwendet und sie fanden auf Eis statt. Die Zellen wurden zuerst mit $100 \mu\text{l}$ Puffer A 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie mit $100 \mu\text{l}$ Puffer A + 0.2% NP40 10 min auf Eis lysiert. Die Zellkerne wurden bei 1800 rpm und 4°C für 5 min in der Hettich-Zentrifuge sedimentiert, in $100 \mu\text{l}$ Puffer C gewaschen und in $100 \mu\text{l}$ Puffer C + 0.4M NaCl für 30 min auf Eis lysiert.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Kernextrakt gewonnen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.2.6. SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot-Analysen

Die elektrophoretische Auftrennung der Kernextrakte ($10 \mu\text{g}$ Protein) erfolgt mit einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (Laemmli 1970) in einer Mini-Protean-II-2D-Kammer (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien) unter reduzierenden Bedingungen. Für die Western-Blot-Analysen wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mit der "Semidry"-Blot-Methode (Gallagher 1991) auf eine PVDF-Membran (Boehringer Mannheim) geblottet. Dies erfolgte in einer LKB 2117-MultiphorII-Elektrophorese-Kammer (Pharmacia LKB, Freiburg) mit 192mM Glycin, 25mM Tris pH 9,2, 0,02% SDS und 10% Methanol. Zur Kontrolle der Blotting-Effizienz wurde das Gel mit Coomassie blue Reagenz gefärbt (Sasse und Gallagher 1991). Die Membran wurde mindestens 1 Stunde in 2.5% Magermilchpulver in PBS und 0,5% NaN_3 blockiert und anschließend mit dem spezifischen p52- bzw. dem p50-Antikörper über Nacht eine Stunde inkubiert (αp50 Ak: 1:10000 verdünnt mit 1% Magermilch in PBS/ NaN_3 ; αp52 Ak: $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ in 1% Magermilch in PBS/ NaN_3 ; αRelA Ak: 1:1000 in 1% Magermilch in PBS/ NaN_3 ; αRelB Ak: 1:500 in 1% Magermilch in

PBS/ NaN_3). Nach vier 5-minütigen Waschsritten in PBS/Tween wurden die Membranen für 4 Stunden mit Peroxidase-markierten Kaninchen-anti-Mausimmunglobulin-Antikörpern bzw. Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:4000 bzw. 1:20000 in 1% MM/PBS inkubiert. Die Membran wurde erneut 6-8 mal für 5 min in PBS/Tween gespült und mit dem Supersignal West Pico Reagenz (Perbio) auf X-Ray 90 Filmen (Linhardt, München) entwickelt.

6. ERGEBNISSE

6.1. Strategie

Das Testsystem, das in unserem Labor für die Detektion der TRAF-Rekrutierung an die Signaldomänen der Mitglieder der TNFR-SF entwickelt wurde, beruht auf dem ELISA-Prinzip. Ziel dieser Studie war es, dieses System derart zu modifizieren, dass ein Vergleich der Rezeptorsignaldomänen hinsichtlich TRAF-Rekrutierung und NF- κ B-Aktivierung möglich wurde. Die Rezeptorsignaldomäne sollte die einzige molekulare Variable in diesem System darstellen. Durch Verwendung des gleichen Festphasen- bzw. des gleichen Nachweisantikörpers war es möglich, Variabilitäten in der Affinität durch unterschiedliche Antikörperkombinationen auszuschließen. Dies ermöglichte es, die TRAF-Rekrutierung aller Rezeptoren für ein bestimmtes TRAF mit einer Antikörperkombination zu detektieren. Außerdem lieferte das Testsystem zumindest semiquantitative Daten für die Rekrutierung eines bestimmten TRAFs. Der direkte und quantitative Vergleich der Rekrutierung unterschiedlicher TRAFs ist in diesem Testsystem nicht möglich, da sich nicht nur die Signaldomänen, sondern auch die Nachweisantikörper in ihrer Affinität zu den TRAFs unterscheiden und somit nicht vergleichbare Rekrutierungsdaten liefern.

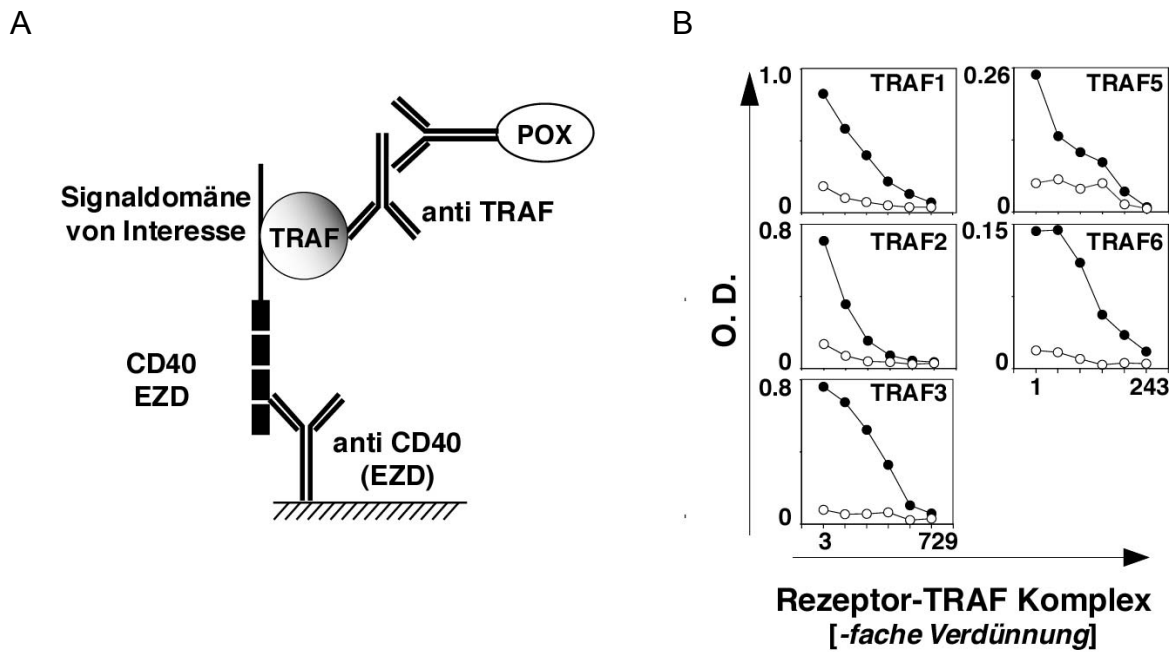


Abbildung 5: ELISA-Testsystem zur Detektion der TRAF-Rekrutierung an Rezeptoren: Abb. A: Schematische Darstellung eines ELISAs zur vergleichenden Messung der TRAF-Rekrutierung an verschiedene TNF-Rezeptoren. Die Verwendung von Rezeptorhybriden erlaubt die Messung der TRAF-Rekrutierung verschiedener Rezeptorsignaldomänen mit der gleichen Antikörperkombination. Dies ermöglicht den Vergleich der TRAF-Rekrutierung verschiedener Rezeptoren. **Abb. B** zeigt die Sensitivität des Testsystems für die TRAF-Rekrutierung der verschiedenen TRAFs an die Rezeptoren. Beispielhaft wird CD40_{WT} (●) im Vergleich zu CD40₁₋₂₀₃ (○), der Negativkontrolle ohne Signaldomäne, dargestellt. Gezeigt ist die optische Dichte (OD), abhängig der Rezeptor-TRAF-Konzentration.

Um das Ziel einer vergleichbaren TRAF-Rezeptorbindung zu erreichen, wurden Hybridrezeptoren aus der CD40-Extrazellulärdomäne und der Signaldomäne des Rezeptors von Interesse kloniert (Abb.3).

Von jedem Rezeptor wurden jeweils zwei Rezeptorvarianten generiert. Die erste Rezeptorvariante enthielt die Extrazellulär- (Ezd) und die Transmembrandomäne (TM) des CD40-Rezeptors sowie die Signaldomäne des Rezeptors (IZD) von Interesse. Für den zweiten Rezeptor wurde die CD40-Ezd mit der TM und der IZD des Rezeptors von Interesse fusioniert. Hiermit sollte später der Einfluss der TM auf die TRAF-Rekrutierung und die Signalaktivität des Rezeptors erfasst werden.

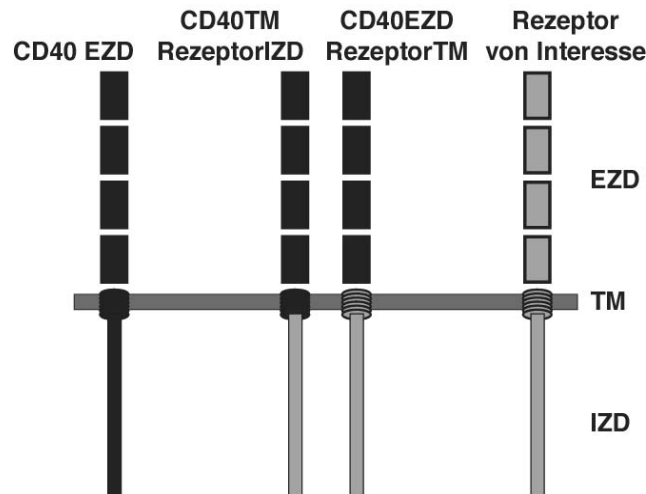


Abbildung 6: Modell der Hybridrezeptoren. CD40_{WT}-Rezeptor; Hybridrezeptor mit CD40_{WT} Transmembrandomäne; Hybridrezeptor mit Transmembrandomäne des Rezeptors von Interesse; Wildtyprezeptor von Interesse.

6.2. Kontrollen

Die Funktionsfähigkeit und Vergleichbarkeit der Hybridrezeptoren mit der Wildtypsituation wurde beispielhaft für den p75TNFR und für CD27 getestet. Es sollte sichergestellt werden, dass die TRAF-Rekrutierung wie auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die Hybridrezeptoren der Aktivität ihrer Wildtyprezeptoren entspricht. Sowohl die TRAF-Rekrutierung als auch die NF- κ B-Aktivität wurde für beide Rezeptorchimären im Vergleich zu ihrem intakten Wildtyprezeptor getestet.

6.2.1. Rekrutierungsvergleich von Hybridrezeptoren und korrespondierendem Wildtyprezeptor

Die vergleichende TRAF-Rekrutierung ist in Tabelle 5 dargestellt. Ein quantitativer Vergleich der TRAF-Rekrutierung an die Wildtyprezeptoren war hier aufgrund unterschiedlicher Extrazellulärdomänen der Rezeptoren nicht möglich. Es wurden unterschiedliche Festphasenantikörper verwendet, die aufgrund unterschiedlicher Affinitäten zu ihren Rezeptoren den quantitativen Vergleich der TRAF-Rekrutierung

in diesem Testsystem nicht erlauben. Allerdings stimmten die Wildtyprezeptoren mit ihren Hybridrezeptoren in der vorhandenen bzw. fehlenden Bindung der getesteten TRAFs überein.

Rezeptor	TRAF1	TRAF2	TRAF3	TRAF5	TRAF6
CD27	+	+	+	+	-
CD40EZDCD27TM	+	+	+	+	-
CD40TMCD27IZD	+	+	+	+	-
p75TNFR	+	+	+	+	+
CD40EZDp75TM	+	+	+	+	+
CD40TMp75IZD	+	+	+	+	+

Tabelle 5: Vergleichende TRAF-Rekrutierung von Wildtyprezeptor und Hybridrezeptoren:

Vergleich der TRAF1-, TRAF2-, TRAF3-, TRAF5- und TRAF6-Rekrutierung an den Wildtyprezeptor und die generierten Varianten der CD40-Hybridrezeptoren, beispielhaft dargestellt für CD27 und p75TNFR. (+ : detektierbare Bindung; - : nicht detektierbare Bindung).

6.2.2. Vergleich der NF- κ B-Aktivierung von Hybridrezeptoren und Wildtyprezeptor

In Übereinstimmung mit den TRAF-Rekrutierungsdaten zeigten die Wildtyprezeptoren eine mit ihren Hybridrezeptoren vergleichbare NF- κ B-Signalaktivität (Abb.7). Die Wildtyprezeptoren wurden in diesen Experimenten mit ihren spezifischen Liganden, membran-TNF α und CD27-Ligand, stimuliert. Hybridrezeptoren wurden mit dem membranständigen CD40-Liganden stimuliert. Nach Transfektion der HEK293T-Zellen mit 20ng Expressionsplasmid erreichten CD27 und seine Hybridrezeptoren ein Maximum von ca. 250000 RLE (Abb.7). Der p75TNFR und seine Chimären erreichten unter vergleichbaren Expressionsbedingungen ein entsprechendes NF- κ B-Niveau von 250000 RLE. Allerdings zeigten alle drei Rezeptoren im Rahmen der Testvariabilität die gleiche NF- κ B-Signalaktivität (Abb.7). Hiermit wurde gezeigt, dass die Hybride und ihr Wildtyprezeptor in der NF- κ B-Aktivität korrelieren.

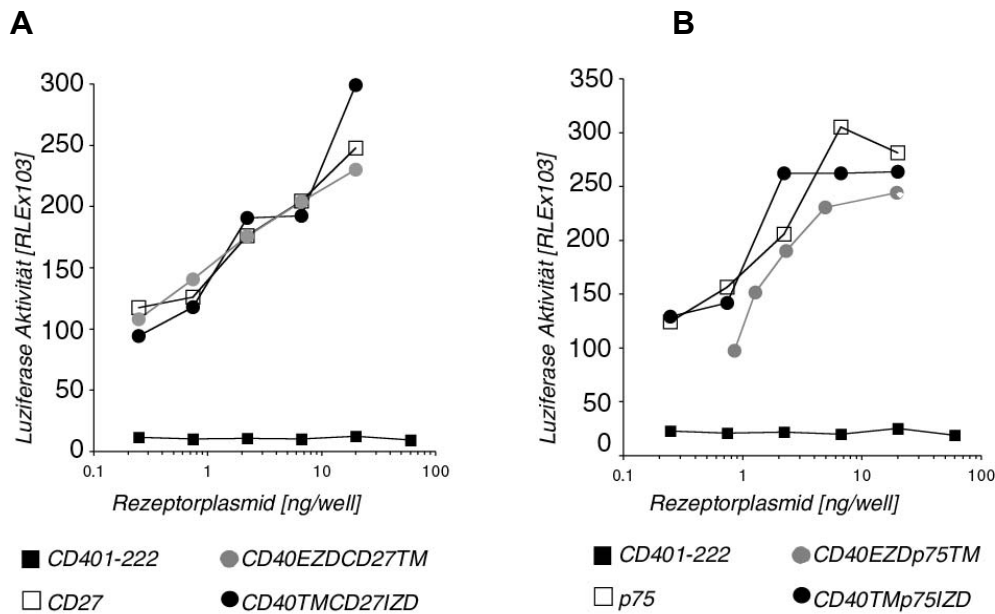


Abbildung 7: Vergleichende Darstellung der NF κ B-Aktivierung von Wildtyprezeptor und Hybridrezeptoren: Darstellung der NF κ B-Aktivität von CD27 (A), p75-TNFR (B) und der korrespondierenden Rezeptorhybride.

6.2.3. Einfluss der Transmembrandomäne auf die TRAF-Rekrutierung

Um den Einfluss der TM auf die TRAF-Rekrutierung zu erfassen, wurden für jede Signaldomäne von Interesse, wie in Abbildung 6 dargestellt, zwei Rezeptorhybride hinsichtlich ihrer TRAF-Bindung getestet. Das eine Hybrid enthielt die TM des CD40-Rezeptors, das andere die des Rezeptors von Interesse. Die TRAF-Rekrutierung wurde mit dem ELISA-Testsystem in Abbildung 4 gemessen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde CD40_{WT} als Standard in den Experimenten mitgeführt. Die Rekrutierung des jeweils untersuchten TRAFs an CD40_{WT} wurde 100% gesetzt. Die TRAF-Rekrutierung der getesteten Rezeptoren ist jeweils relativ zur CD40-TRAF-Rekrutierung dargestellt. Nach den hier erhaltenen Daten konnte kein Einfluss der TM auf das Rekrutierungsverhalten der jeweiligen Zytoplasmadomänen festgestellt werden. CD40EZD*p75*TNFR_{TM} oder CD40TM*p75*TNFR_IZD zeigten fast identische TRAF-Rekrutierungswerte für alle getesteten TRAFs (Abb.8).

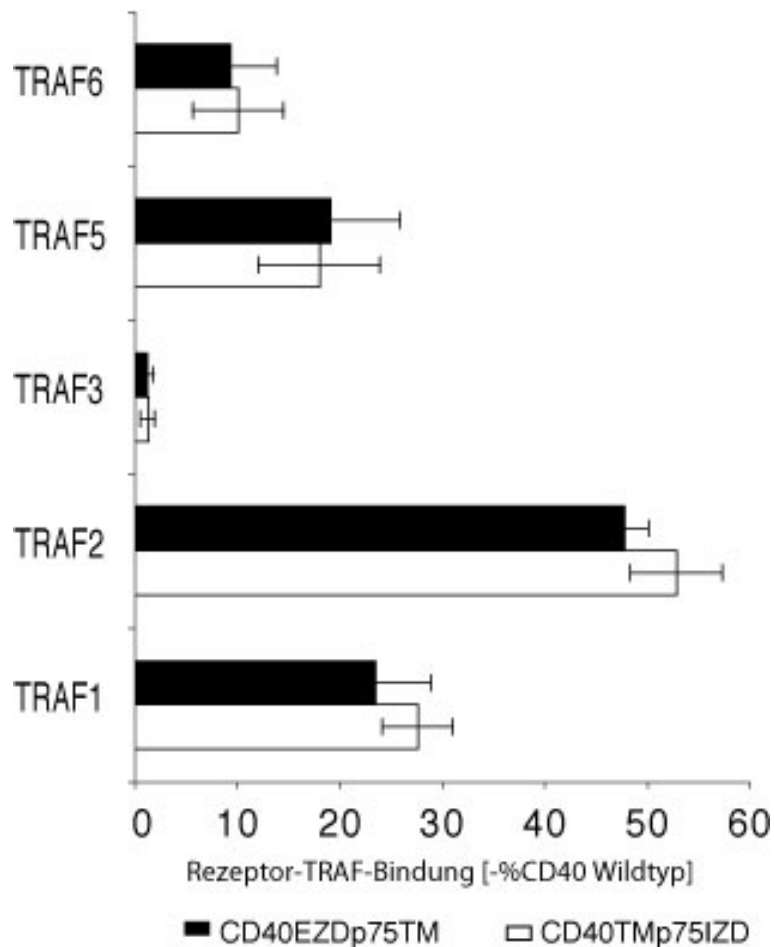


Abbildung 8: Vergleich der TRAF-Rekrutierung an die Hybridrezeptoren: TRAF1-, TRAF2-, TRAF3-, TRAF5- und TRAF6-Rekrutierung an die Rezeptorvarianten CD40EZDp75TNFRTM und CD40TMp75TNFR^{IZD}. Die TRAF-Rekrutierung ist dargestellt in % und zwar relativ zu der korrespondierenden CD40_{WT}-TRAF-Rekrutierung.

6.2.4 Einfluss der Transmembrandomäne auf die Aktivierung von NF- κ B

Wie bereits aufgrund der Rekrutierungsdaten zu erwarten war, beeinflusste die Transmembrandomäne die NF- κ B-Aktivierung nicht. Beide Hybride induzieren im Rahmen der Testvariabilität ähnlich hohe NF- κ B-Signale (Abb. 7).

Da aufgrund dieser Ergebnisse ein Einfluss der TM auf Rekrutierungs- oder Signalverhalten der Rezeptoren sehr unwahrscheinlich war, wurden in allen weiteren Experimenten nur noch die Hybridrezeptoren getestet, die die TM des Rezeptors von Interesse beinhalten.

6.3. TRAF-Rekrutierung an die Rezeptoren der TNFR-SF

6.3.1. Vorteile des verwendeten Transfektionssystems

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden TRAF und Rezeptor in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Der wesentliche Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die TRAF-Rezeptor-Komplexbildung in einer intakten Zelle also bei intakter Zellarchitektur stattfindet. Wie in vorausgehenden Analysen mit CD40 bereits gezeigt wurde, ist das zelluläre Umfeld für die Rekrutierung der TRAFs sehr viel effizienter als eine Komplexbildung unter In-vitro-Bedingungen. Dies konnte in dem in Abbildung 9 schematisch dargestellten Experiment nachgewiesen werden.

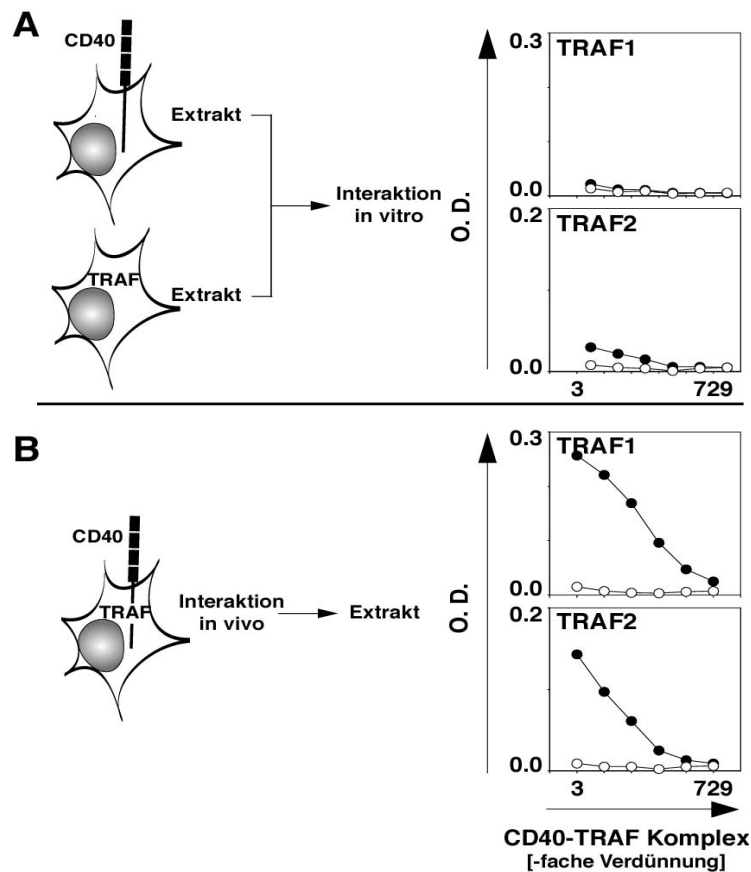


Abbildung 9: Vergleich der TRAF-Rekrutierung unter In-vivo- und In-vitro-Bedingungen. Abb. A zeigt die Transfektion von Rezeptor und TRAF in getrennten Zellen mit anschließender Komplexbildung In-vitro. Die TRAF1- und die TRAF2-Bindung an CD40 ist nur schwach bei niedriger Verdünnung des Zellysats nachweisbar. Die TRAF-Rekrutierung ist dargestellt als optische Dichte (OD) zur Verdünnung des Zellysates des CD40-Rezeptors (gefüllter Kreis) zur Negativkontrolle CD40₁₋₂₂₂ (leerer Kreis). **Abb. B** zeigt die Kotransfektion von Rezeptor und TRAF in einer Zelle und die effiziente TRAF-Rezeptor-Komplex-Bindung rechts.

6.3.2 Ergebnisse der TRAF-Rekrutierungsstudie

Die folgenden Rekrutierungsergebnisse der Rezeptoren sind jeweils für ein getestetes TRAF-Molekül miteinander vergleichbar, da für die Rekrutierung eines TRAFs an die unterschiedlichen Signaldomänen dieselbe Antikörperkombination verwendet wurde (Abb.7).

Außerdem konnte erstmals eine valide Quantifizierung der TRAF-Rekrutierung an die getesteten Rezeptoren vorgenommen werden, da alle Daten in Relation zur entsprechenden CD40_{WT}-TRAF-Rekrutierung angegeben sind. Der Vergleich der TRAF-Rekrutierung an die Rezeptoren im Bezug auf die TRAF-Rekrutierung des CD40 ermöglicht eine Einschätzung der quantitativen Rekrutierungsunterschiede innerhalb der getesteten Rezeptorgruppe. Die TRAF-Rekrutierung an CD40 ist in diesem System stets auf 1 gesetzt. Die TRAF-Bindung an eine CD40-Mutante ohne Signaldomäne (CD40₁₋₂₂₂) wurde in diesem Test als Negativkontrolle verwendet.

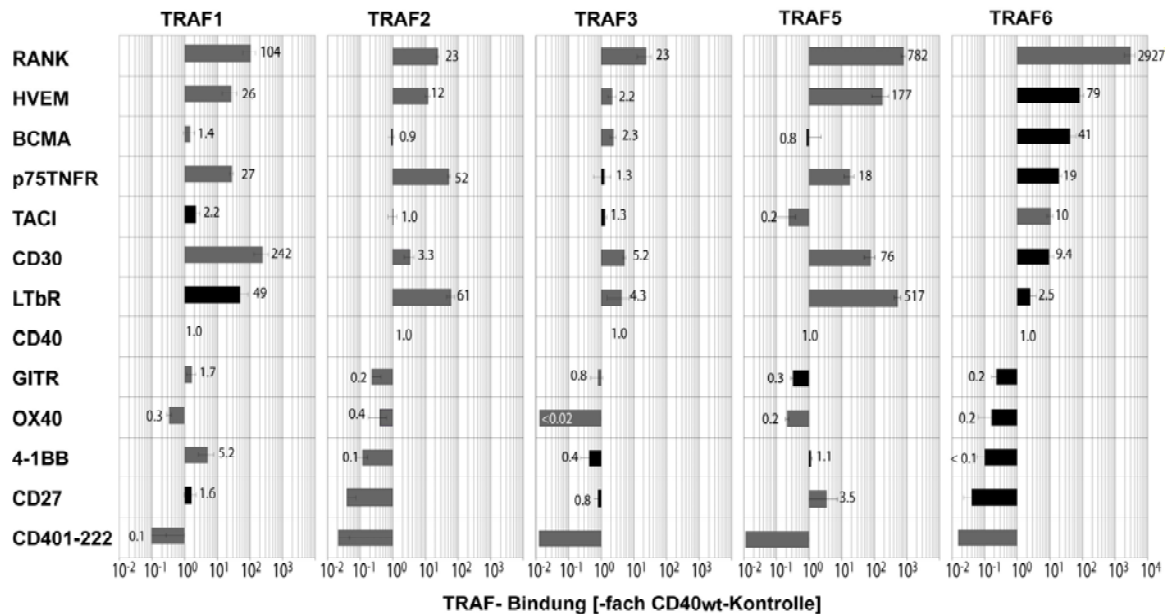


Abbildung 10: TRAF-Rekrutierungsmuster der Mitglieder der TNFR-SF

Zur vergleichenden Bestimmung der TRAF-Rekrutierungsmuster wurden TM und IZD der indizierten Rezeptoren an die Extrazellulärdomäne von CD40 fusioniert. Die Rezeptorhybride wurden in HEK293T-Zellen mit dem jeweiligen TRAF von Interesse kotransfiziert. Dreißig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die TRAF-Rekrutierung wurde gemessen. Dargestellt ist die TRAF1-, TRAF2-, TRAF3-, TRAF5- und TRAF6-Rekrutierung an die Mitglieder der getesteten TNFR-SF in logarithmischer Skalierung. Die TRAF-Rekrutierung an den CD40-Rezeptor wurde mit 1 gleichgesetzt und dient als Referenz. Die TRAF-Rekrutierung an die getesteten Rezeptoren ist jeweils in Relation (x-fach) zur Rekrutierung an CD40_{WT} dargestellt. Die Mutante CD40₁₋₂₂₂ zeigt das unspezifische Hintergrundsignal des ELISA-Tests. Graue Balken zeigen die bereits bekannte TRAF-Bindung an die Rezeptoren (Dempsey et al., 2003). Schwarze Balken zeigen TRAF-Interaktionen, die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben werden. Die Rezeptoren sind nach ihrer relativen TRAF6-Bindung geordnet.

Die hier durchgeführte TRAF-Rekrutierungsanalyse zeigte, dass TRAF-Rekrutierungsmuster unvollständig erfasst waren (Bradley and Pober, 2001; Inoue et al., 2000). Deutlich wird dies am LTβR, der nicht nur, wie bisher angenommen, TRAF2, -3 und -5 bindet (Dempsey et al., 2003), sondern auch beträchtliche Mengen an TRAF1, -2 und -6 rekrutiert (Abb.10). Analoge Befunde ergaben sich für den p75TNFR. Besonders auffällig war die Fähigkeit fast aller Rezeptoren TRAF6 zu binden, was bis dato nur für CD40 und RANK (Galibert et al., 1998) beschrieben war. Eine signifikant höhere TRAF6-Bindung als der Referenzrezeptor zeigten die Rezeptoren LTβR, CD30, TACI, p75TNFR, BCMA, HVEM und RANK mit einer 3- bis

3000-fach stärkeren Bindungskapazität als CD40. Als sehr schwache „TRAF6-Binder“ erwiesen sich GITR und OX40 mit einer 10-fach niedrigeren Bindungskapazität als CD40. Im Gegensatz zu 4-1BB und CD27 liegt ihre TRAF6-Rekrutierungskapazität allerdings noch deutlich über dem unspezifischen Signal der Negativkontrolle (CD40₁₋₂₂₂).

Diese Rekrutierungsstudie zeigt, dass jeder der untersuchten Rezeptoren jedes TRAF rekrutieren kann. An der Nachweisgrenze unseres Testsystems, jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle immer noch deutlich detektierbar, war die TRAF3-Rekrutierung von OX40.

Die Rezeptoren zeigten bis zu 10000-fache Unterschiede in ihrer TRAF-Bindungskapazität für ein gegebenes TRAF. Am besten wird dies an der TRAF6-Bindung deutlich, die vom Referenzrezeptor CD40 ausgehend von 0.1-fach bei 4-1BB bis zu 3000-fach bei RANK variiert. (Abb.10).

Aufgrund des hier angewandten Testprinzips war nur der Vergleich der unterschiedlichen Rezeptoren hinsichtlich der Rekrutierung des gleichen TRAFs möglich. Die Rekrutierung unterschiedlicher TRAFs wurde mit verschiedenen, unterschiedlich affinen anti-TRAF-Antikörpern nachgewiesen. Somit ist ein quantitativer Vergleich der Rezeptoren hinsichtlich der Rekrutierung eines TRAFs nur innerhalb, nicht aber zwischen den unterschiedlichen TRAFs zulässig.

6.3.2.1. TRAF2-Rekrutierung

LT β R und p75TNFR waren die beiden Rezeptoren mit der stärksten TRAF2-Bindungskapazität. Sie zeigten mehr als 50-fach stärkere Rekrutierung für dieses TRAF als CD40, gefolgt von RANK und HVEM, beides Rezeptoren, die TRAF2 ungefähr 10- bis 20-mal besser binden als CD40_{WT}. Für CD30 konnte eine 3-fach stärkere Rekrutierung gezeigt werden als für CD40_{WT}. CD27 und 4-1BB zeigten die schwächste Assoziation mit TRAF2. Die beiden Rezeptoren OX40 und GITR banden TRAF2 gleich gut, aber dennoch niedriger als CD40_{WT}. BCMA zeigte eine TRAF2-Bindung ähnlich der von CD40_{WT} (Abb.10)

6.3.2.2. TRAF5-Rekrutierung

Im Vergleich der TRAF5-Bindung an die getesteten Rezeptoren stellte sich heraus, dass die TRAF-bindenden Rezeptoren RANK, LT β R, HVEM und CD30 zwischen 100- und 800-fach stärker TRAF5 rekrutierten als der Referenzrezeptor CD40. p75TNFR assoziierte etwa 20-mal besser mit TRAF5 als CD40_{WT}. Eine fast dreifach erhöhte TRAF5-Bindung konnten wir für die intrazytoplasmatische Domäne von CD27 nachweisen. BCMA und 4-1BB rekrutierten TRAF5 gleich stark wie CD40_{WT}, wohingegen TACI, OX40 und GITR als schwache „TRAF5-Binder“ identifiziert wurden. Ihre Bindungskapazität betrug weniger als 30% des Referenzrezeptors.

6.3.2.3. TRAF6-Rekrutierung

Die größten Unterschiede innerhalb der TRAF-bindenden Rezeptoren wurden für die TRAF6-Rekrutierung gefunden. RANK rekrutierte dieses TRAF etwa 3000-mal besser als CD40, gefolgt von HVEM mit einer 80-fach und BCMA mit einer 40-fach stärkeren TRAF6-Bindung. Auch p75TNFR, TACI und CD30 banden TRAF6 um eine Größenordnung besser als CD40. Die TRAF6-Rekrutierung des LT β R betrug das Dreifache der Rekrutierung von CD40_{WT}. Sehr niedrige TRAF6-Rekrutierung wurde für GITR, OX40, 4-1BB und CD27 gefunden.

6.3.2.4. TRAF1-Rekrutierung

Verglichen mit den anderen hier getesteten Rezeptoren war die TRAF1-Rekrutierung des Referenzrezeptors CD40_{WT} sehr schwach. Mit Ausnahme von OX40 zeigten alle anderen getesteten Rezeptoren eine deutlich stärkere TRAF1-Bindung. CD30 interagiert 200-mal besser mit TRAF1 als CD40_{WT}. RANK zeigte eine 100-fach stärkere Interaktion. LT β R, HVEM und p75TNFR wiesen eine mehr als 20-fach höhere Bindungskapazität für TRAF1 auf. TACI und 4-1BB zeigten eine 2- bis 5-

fache Steigerung der TRAF1-Bindung, wohingegen BCMA, TACI, GITR und CD27 eine ähnliche TRAF1-Bindung wie CD40_{WT} zeigten.

6.3.2.5. TRAF3-Rekrutierung

Unter allen getesteten TRAFs in dieser Studie war TRAF3 der Faktor mit der geringsten Rekrutierungsvariabilität. HVEM, BCMA, p75TNFR, TACI, GITR und CD27 zeigten gegenüber CD40 eine etwa 2-fach höhere TRAF3-Rekrutierung. Die stärkste TRAF3-Rekrutierung wurde für RANK (23-fach), CD30 (5-fach) und LT β R (4-fach) gefunden. GITR, 4-1BB und CD27 zeigten leicht reduzierte TRAF3-Spiegel zwischen 60% und 80% von CD40_{WT}. OX40 war der einzige Rezeptor mit nahezu undetektierbarer TRAF3-Bindung, die jedoch noch deutlich über der Negativkontrolle lag.

6.4. Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Nach der Erfassung der TRAF-Rekrutierungsmuster der getesteten Rezeptoren stellte sich die Frage, ob die TRAF-Rekrutierungsmuster mit den Signalaktivitäten der untersuchten Rezeptoren korrelieren. Deshalb wurden im nächsten Schritt weiter distal in der Signalkaskade gelegene funktionelle Unterschiede der getesteten Rezeptoren untersucht.

Untersucht wurde NF- κ B, ein Transkriptionsfaktor, den alle getesteten Mitglieder der TNFR-SF aktivieren. NF- κ B wird im Zytoplasma durch Phosphorylierung seiner Inhibitoren aktiviert und in den Zellkern transloziert. NF- κ B reguliert wichtige Gene, die für die angeborene und erworbene Immunität von Bedeutung sind und eine gerichtete Immunantwort möglich machen (Bonizzi and Karin, 2004; Li and Verma, 2002). NF- κ B konnte persistierend bei chronisch entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden (Neurath et al., 1996; Rogler et al., 1998). Dieser Transkriptionsfaktor spielt außerdem eine bedeutende Rolle für die Entstehung

maligner Erkrankungen (Karin et al., 2002; Karin and Greten, 2005) und die viral induzierte Tumorgenese (Mosialos, 1997).

6.4.1. Das Reportersystem

Zur Messung der NF- κ B-Signalaktivität wurde hier ein Reporterassay benützt. Das verwendete Reporterkonstrukt ist unter „Material und Methoden“ auf Seite 36 beschrieben.

Mit diesem System war es möglich, die Signalaktivität der verschiedenen Rezeptoren zu testen. Die unterschiedliche Signalaktivität wird von den verschiedenen Intrazellulärdomänen reguliert. Diese ist von der Rezeptorexpression auf den Zellen abhängig. Die Luziferaseaktivität, gemessen in „relativen Lichteinheiten“ (RLE), wurde somit in Relation zur Expression des getesteten CD40-Rezeptorhybrids gesetzt. Die Expression des CD40-Hybrids wurde im ELISA bestimmt. Damit wird ein Vergleich der getesteten Rezeptoren bezüglich ihres NF- κ B-Signalpotenzials möglich. Als Negativkontrolle wurde erneut die bereits bekannte CD40-Mutante CD40₁₋₂₂₂ verwendet, welche die unspezifische Signalaktivität des Systems zeigt.

Da dieses System nur die durch Bindung der Transkriptionsfaktoren induzierte Luziferaseaktivität messen kann, ist eine Trennung des NF- κ B-Signals in eine alternative und eine klassische Komponente nicht möglich. Es wird somit ein Mischsignal aus den Faktoren p50, RelA, p52 und RelB dargestellt. Die Translokation der Einzelkomponenten in den Nukleus und die Unterscheidung zwischen klassischem und alternativem Signalweg ist in diesem System nicht möglich.

6.4.2. Aktivierung von NF- κ B durch alle getesteten Rezeptoren

Jeder der getesteten Rezeptoren aktivierte die NF- κ B-abhängige Genexpression. Allerdings stellten sich enorme Unterschiede in der Signalstärke heraus. Es konnten in den Expressionsspiegeln, die für die NF- κ B-Aktivierung notwendig waren, erhebliche Unterschiede gemessen werden. RANK z.B. induzierte detektierbare NF-

κ B-Translokation von 100×10^3 RLE bereits bei 200-fach niedrigeren Expressionsspiegeln als 4-1BB oder CD27. Eine detailliertere Analyse unserer Ergebnisse machte es möglich die untersuchten Rezeptoren drei Gruppen zuzuordnen.

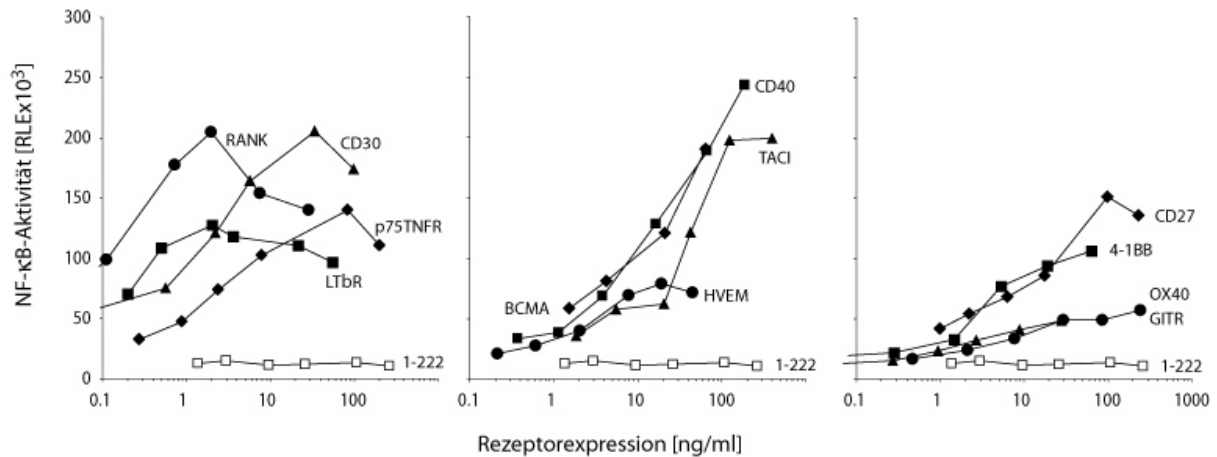


Abbildung 11: NF- κ B-Aktivierung durch TRAF-bindende Rezeptoren Rezeptorhybride bestehend aus CD40-EZD sowie aus TM- und Signaldomänen der bezeichneten Rezeptoren wurden transient in HEK293T-Zellen transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Rezeptorhybride mit CD40L stimuliert. Drei Stunden später erfolgte die Lyse der Zellen und die Messung der Luziferaseaktivität. Um vergleichbare Werte für jedes Rezeptorhybrid zu erhalten, wurden die Ergebnisse auf der Basis der Rezeptorexpression dargestellt. Die Rezeptorexpression wurde durch Messung der Rezeptorkonzentration im Zelllysate mit einem CD40-ELISA (siehe Material und Methoden) bestimmt.

6.4.3. Rezeptoren mit starker TRAF2-, TRAF5- und TRAF6-Bindung

RANK, CD30 und $LT\beta R$ zeigten die stärkste NF- κ B-Signalaktivität. Schon bei niedrigen Rezeptorkonzentrationen erreichten diese Rezeptoren eine Aktivität von 50 bis 100×10^3 RLE. Der p75TNFR induzierte bei niedriger Rezeptorexpression ein NF- κ B-Signal von 30×10^3 RLE (Abb.11). Alle anderen Rezeptoren zeigten ein signifikant niedrigeres Signalpotenzial von weniger als 30×10^3 RLE bei der gleichen Rezeptorexpression. Wurden die Rezeptoren RANK, p75TNFR und $LT\beta R$ bei hohen Expressionsspiegeln getestet, so stagnierte das NF- κ B-Signal. RANK und $LT\beta R$ erreichten ihr Maximalsignal bereits bei einer Rezeptorexpression von 2 ng/ml und

zeigten mit steigender Expression unveränderte bis leicht reduzierte NF- κ B-Aktivierung. CD30 und p75TNFR erreichten ihre maximale NF- κ B-Aktivierung hingegen erst bei einer Expression von 40-100ng/ml.

6.4.4. Rezeptoren mit starker TRAF6-Bindung

Bei näherer Betrachtung der TRAF-rekrutierenden Rezeptoren mit niedriger NF- κ B-Translokationsaktivität konnten zwei Gruppen gebildet werden.

Für die Rezeptoren TACI, BCMA und CD40 war eine mindestens 100-fach höhere Rezeptorexpression notwendig, damit sie die gleiche NF- κ B-Aktivierung erreichten wie die Rezeptoren der ersten Gruppe bei einer Expression von 0.1ng/ml. HVEM erreichte lediglich eine maximale Aktivität von ca. 80×10^3 RLE und zeigte bei einer Rezeptorexpression von über 20ng/ml bereits stagnierende NF- κ B-Aktivität. Die drei erstgenannten Rezeptoren dieser Gruppe zeigten ein hohes Maximalsignal von über 200×10^3 RLE bei hoher Rezeptorexpression von 100ng/ml (Abb. 11).

6.4.5. Rezeptoren mit schwacher TRAF-Bindung

Das schwächste NF- κ B-Signalpotential wiesen CD27, GITR, 4-1BB und OX40 auf (Abb.11). CD27 und 4-1BB benötigten eine 100-fach höhere Rezeptorexpression, um ein RANK-äquivalentes NF- κ B-Signal zu erzeugen. GITR und OX40 erreichten sogar nur ein Maximalsignal von knapp 50×10^3 RLE. Alle Rezeptoren dieser Gruppe zeigten ein sehr niedriges Maximalsignal von $50-100 \times 10^3$ RLE trotz einer Rezeptorexpression von 100ng/ml. CD27 und 4-1BB zeichneten sich in dieser Rezeptorgruppe durch ein etwas höheres NF- κ B-Aktivierungspotenzial aus.

Zusammenfassend konnten die Rezeptoren nach ihrer NF- κ B-Aktivität in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe zeigte hohe NF- κ B-Aktivität bei niedriger Rezeptorexpression. Die Rezeptoren dieser Gruppe waren ohne Ausnahme starke „TRAF2-, TRAF5- und TRAF6-Binder“ (Abb.11). In der zweiten Gruppe zeigten die Rezeptoren ein hohes NF- κ B-Maximalsignal, benötigten jedoch ein

höheres Expressionsniveau für dieses Signal. Diese Rezeptoren rekrutierten TRAF6 auf relativ hohem Niveau (Abb.11). Die dritte Rezeptorgruppe wies die geringste NF- κ B-Aktivität auf und dies korrelierte mit dem Bindungsvermögen für TRAF2, 5 und 6, das ebenfalls niedrig war.

6.5. TRAF3 als regulatorisches Element im NF- κ B-Signalweg

Nachdem bekannt war, dass TRAF2, -5 und -6 die Translokation von NF- κ B in den Nukleus fördern und die Korrelation zu den Rekrutierungsmustern gezeigt wurde, interessierte der Einfluss von TRAF1 und TRAF3 auf den NF- κ B-Signaltransduktionsweg. Die Funktion dieser beiden TRAFs ist bis dato weitgehend ungeklärt. Geninaktivierungsexperimente in der Maus demonstrierten, dass TRAF3 eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von CD40-Signalen in B-Zellen spielt (Cheng et al., 1995) und eine lebenswichtige Funktion für Vertebraten hat (Xu et al., 1996). Aus diesem Grund stand die Funktion dieses TRAFs im Vordergrund der folgenden Experimente.

6.5.1. Zielsetzung des Experiments

Die Untersuchung des TRAF3-Einflusses auf die Aktivierung von NF- κ B erfolgte in Zellen mit physiologischer und mit hoher TRAF3-Expression sowie in Zellen mit hohen Expressionspiegeln der dominant negativen Mutanten von TRAF3 (Δ TRAF3).

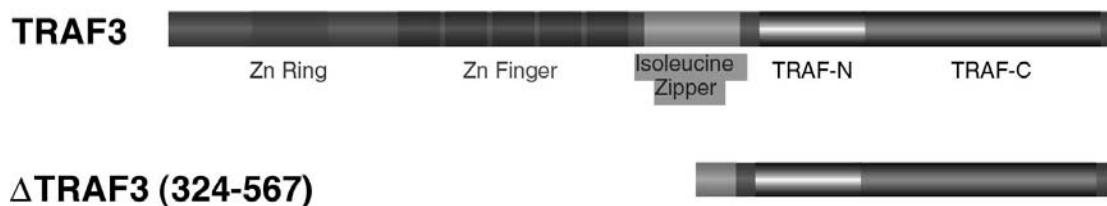


Abbildung 12: Modell der TRAF3-Struktur und ihrer dominant negativen Form (Δ TRAF3).

Dominant negative Mutanten von TRAF3 können über ihre intakte TRAF-C-Domäne an den Rezeptor binden oder mit anderen Proteinen interagieren. Sie besitzen N-terminal jedoch keine funktionellen Ring- und Zink-Finger mehr. Ohne funktionelle Aktivität können sie keine distal gelegenen Signalwege aktivieren. Die Experimente mit DNTRAF3-Mutanten wurden ausgewählt, um den Einfluss von TRAF3 auf den NF- κ B-Signalweg näher zu charakterisieren. Die TRAF3-Deletionsmutante Δ TRAF3(324-567) besitzt keinen intakten Isoleuzinzipper. Über dieses Motiv könnte TRAF3 mit TRAF5 Heteromere bilden (Pullen et al., 1998).

Dieses Experiment sollte zeigen, ob TRAF3 über einen dominant negativen Effekt in die Signalkaskade eingreift, was mit einer kompetitiven Bindungshemmung anderer TRAF-Moleküle direkt am Rezeptor gleichzusetzen wäre, oder ob TRAF3 eigene Signalaktivität besitzt. Auch über den Einfluss der TRAF3/TRAF5-Heteromerbildung bei der Aktivierung von NF- κ B sollte dieses Experiment Aufschluss geben.

6.5.2. NF- κ B-Suppression durch TRAF3

Aufgrund des NF- κ B-Signalverhaltens in Zellen mit hoher TRAF3-Expression ließen sich die getesteten Rezeptoren zwei Gruppen zuordnen. Das NF- κ B-Signal der einen Rezeptorgruppe ließ sich durch hohe TRAF3-Spiegel reduzieren, wohingegen die DN-Mutante keinen Effekt auf das NF- κ B-Signal der Rezeptoren zeigte. Rezeptoren der zweiten Gruppe ließen sich weder durch TRAF3 noch durch DNTRAF3 in ihrem NF- κ B-Signal beeinflussen. Das in Abbildung 13 gezeigte Experiment wurde bei einer konstanten Rezeptorexpression durchgeführt.

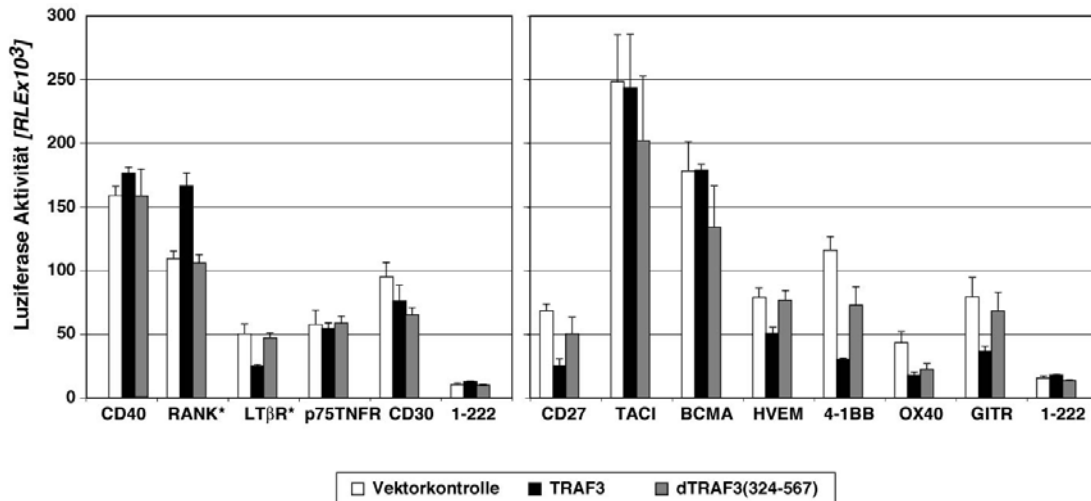


Abbildung 13: Beeinflussung der NF- κ B-Signaltransduktion durch TRAF3. Die NF- κ B-Signalaktivität ist für die gezeigten Rezeptoren bei einer Rezeptorexpression von 10ng/ml dargestellt. Weiße Balken zeigen die Luziferaseaktivität bei normaler TRAF-Expression (pCDNA 3.1). Schwarze Balken zeigen die NF- κ B-Aktivität nach Expresssion in Zellen mit hoher TRAF3-Expression. Grau zeigt die NF- κ B-Aktivität in Zellen, die DNTRAF3 exprimieren. CD40₁₋₂₂₂, als nicht signalisierender Vektor ist die Negativkontrolle des Systems.

Den stärksten hemmenden Effekt hatte TRAF3 auf CD27, 4-1BB und GITR. Allerdings war auch bei LT β R, HVEM und OX40 eine deutliche Hemmung durch hohe zelluläre TRAF3-Spiegel zu beobachten.

Keine Änderung der NF- κ B-Signalaktivität nach TRAF3 Überexpression zeigten CD40, CD30, TACI, BCMA und p75TNFR. RANK bildete unter den hier getesteten Rezeptoren eine Ausnahme. In Zellen mit hoher TRAF3-Expression wies er als einziger Rezeptor eine erhöhte Signalaktivität auf.

Verglichen mit der NF- κ B-Aktivität der Rezeptoren in Zellen mit normaler TRAF-Expression zeigten die DNTRAF3-Mutanten keinen Effekt auf das NF- κ B-Signal der Rezeptoren.

6.5.3. Regulierung von TRAF2-, TRAF5- und TRAF6-abhängiger NF- κ B-Aktivierung durch TRAF3

Diese Ergebnisse legten nahe, dass TRAF3 auf die NF- κ B-Translokation über TRAF2/5 eine negativ regulatorische Funktion ausübt. Es fiel auf, dass alle

Rezeptoren, die sich in ihrer NF- κ B-Aktivität durch TRAF3 reduzieren ließen, niedrige TRAF6-Bindungskapazität aufwiesen (Abb.13), während sich Rezeptoren mit mittlerer TRAF6-Rekrutierung nicht beeinflussen ließen und solche mit hoher TRAF6-Rekrutierung sogar eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung zeigten. Da die Rezeptoren allerdings hinsichtlich ihrer NF- κ B-Aktivierung über die TRAF-Rekrutierung nur Mischbilder darstellen, sollte diese TRAF3-Wirkung in einem eindeutigen Modellsystem überprüft werden. Inwieweit sich hohe zelluläre TRAF3-Spiegel regulierend auf das TRAF2/5- bzw. das TRAF6-vermittelte NF- κ B-Signal auswirken, müsste dasselbe Experiment mit CD40-Mutanten, die definierte Ausfälle in ihren TRAF-Bindungsstellen aufweisen, zeigen.

6.6. TRAF3 als regulatorisches Element des NF- κ B-Signalwegs im CD40-Modell

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass TRAF3 regulierend in den NF- κ B-Signalweg eingreift. Der NF- κ B-Signalweg wird, wie oben beschrieben, über die Bindung von TRAF2, -5 und -6 an die Mitglieder der TNFR-SF induziert und teilt sich in einen klassischen und einen alternativen Signalweg auf (Bonizzi and Karin, 2004). Die Bindung der NF- κ B-induzierenden TRAFs an die unterschiedlichen Mitglieder der TNFR-SF ist in der Literatur sowohl am Kristallmolekül (McWhirter et al., 1999) sowie in Mutationsanalysen (Pullen et al., 1998) beschrieben. Folgende Experimente sollen den Angriffspunkt des TRAF3 im NF- κ B-Signalweg beleuchten. Wie in Abbildung 13 gezeigt, hatte das DNTRAF3 keine Auswirkung auf den NF- κ B-Signalweg der getesteten Rezeptoren. Somit ist eine kompetitive Hemmung um Bindungsstellen am Rezeptor, über den TRAF3 diesen Signalweg inhibiert, unwahrscheinlich. Insbesondere interessierte daher, ob durch TRAF3 der alternative oder der klassische Signalweg beeinflusst wird. Dies sollte ein Experiment mit CD40-Mutanten, die definierte Ausfälle in ihren TRAF-Bindungsstellen besitzen, zeigen.

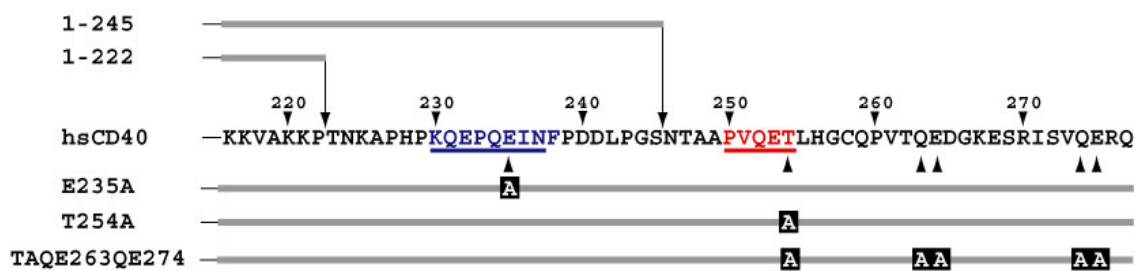
6.6.1. TRAF-Bindung an CD40-Mutanten

Aus früheren Studien an CD40 standen dem Labor Rezeptor-Mutanten zur Verfügung, die definierte Ausfälle in ihrem TRAF-Rekrutierungsmuster aufwiesen.

Die Deletionsmutante CD40₁₋₂₄₅ bindet ausschließlich TRAF6. CD40_{E235A} besitzt eine definierte Punktmutation in der TRAF6-Bindungsstelle. Sie weist einen Ausfall in der TRAF6-Bindung auf und rekrutiert nur noch TRAF2, -3 und -5. In der Rezeptormutante CD40_{T254A} ist das Bindungsmotiv für TRAF2, -3 und -5 mutiert. Ihr TRAF-Rekrutierungsmuster wird von TRAF6 dominiert.

Die Negativkontrolle unserer Testsysteme CD40₁₋₂₂₂ ist eine CD40-Mutante ohne Intrazellulärdomäne. Sie bindet keines der fünf getesteten TRAFs.

A



B

	CD40wt	1-222	1-245	E235A	T254A	TAQE263QE274
TRAF2 Rekrutierung [%CD40wt Kontrolle]	100	3	8	107	57	8
TRAF3	100	0	7	70	107	8
TRAF5	100	2	3	100	15	2
TRAF6	100	2	32	2	118	120

Abbildung 14: Aminosäuresequenz mit TRAF1-, TRAF2-, TRAF3-, TRAF5- und TRAF6-Rekrutierung der getesteten CD40-Mutanten

(A) Aminosäuresequenz der CD40_{WT} intrazytoplasmatischen Domäne: Die Bindemotive von TRAF6 bzw. TRAF2, -3, -5 sind unterstrichen.

(B) Rekrutierung von TRAF2, -3, -5 und -6 an die CD40-Mutanten: Die Daten sind relativ zur korrespondierenden TRAF-Rekrutierung des CD40_{WT} dargestellt.

6.6.2. Regulation der NF- κ B-Aktivität durch TRAF3 im CD40-Modell

In dem folgenden Experiment wurden nun die Rezeptoren CD40_{E235A}, der nur eine Bindungsstelle für TRAF2, -3 und -5 aufweist, CD40_{T254A} mit dominierender TRAF6-Bindung und CD40₁₋₂₄₅ mit ausschließlicher TRAF6-Bindung in Zellen mit hohen TRAF3-Spiegeln auf ihre NF- κ B-Aktivität getestet.

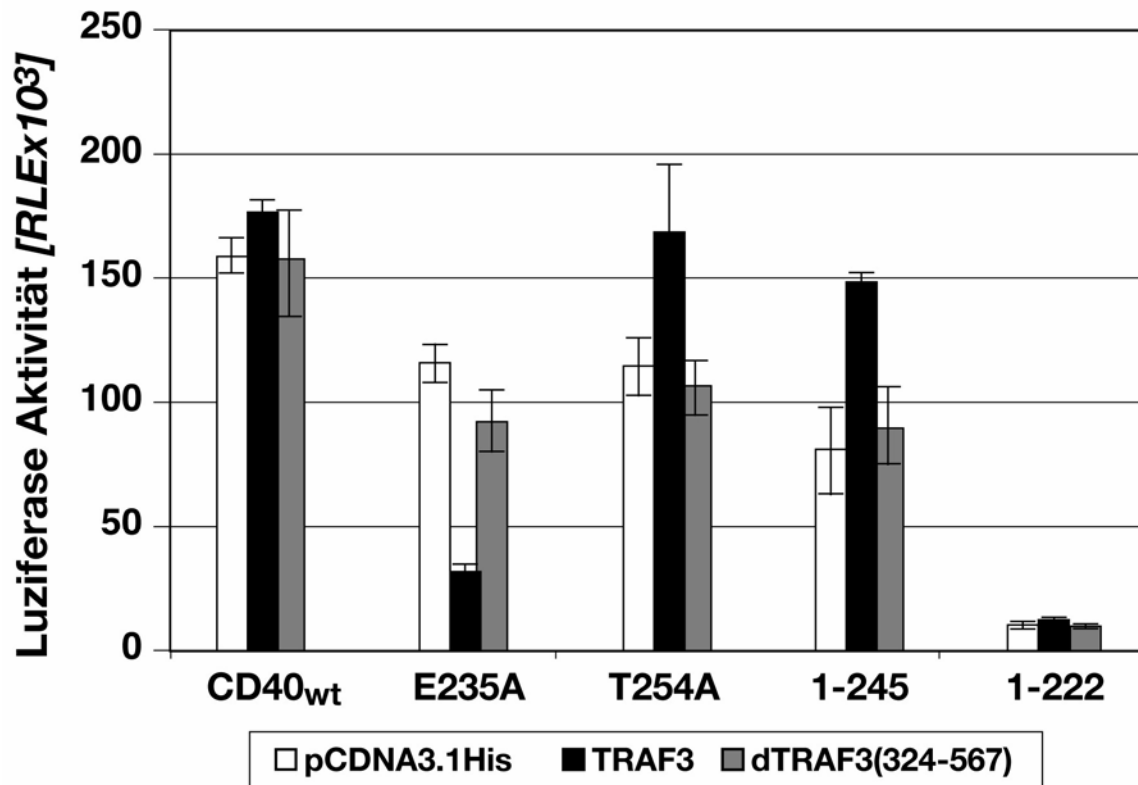


Abbildung 15: CD40-Mutanten mit definierten TRAF2/5 (T254A, 1-245) bzw. TRAF6 (E235A) Rekrutierungsdefizite werden durch TRAF3 im NF- κ B-Signal verstärkt bzw. gemindert. NF- κ B-Aktivität der getesteten Rezeptoren ist dargestellt als Luziferaseaktivität relativ zu der CD40_{WT}-Aktivität. CD40₁₋₂₂₂ ist die Negativkontrolle des Systems. Der weiße Balken stellt die Luziferaseaktivität unter normaler TRAF-Expression dar (pCDNA 3.1). Schwarz ist die NF- κ B -Aktivität mit TRAF3-Überexpression. Der graue Balken stellt die NF- κ B-Aktivität nach Überexpression der DN-Mutanten von TRAF3 dar.

Der CD40-Rezeptor ließ sich, wie aus dem vorherigen Experiment zu erwarten war, nicht durch TRAF3-Überexpression beeinflussen. Diejenige CD40-Mutante, die lediglich TRAF2, -3 und -5 rekrutiert (E235A) konnte nach Überexpression von TRAF3 in ihrer NF- κ B-Aktivität weitgehend reduziert werden. Diejenige Mutante, die

von der TRAF6-Bindung dominiert wird (T254A), wurde in ihrer NF- κ B-Translokation leicht erhöht. Die Mutante CD40₁₋₂₄₅, welche ausschließlich TRAF6 bindet, zeigte in Zellen mit hoher TRAF3-Expression ein signifikant erhöhtes NF- κ B-Potential. Die DN-Mutante von TRAF3 zeigte, wie in dem vorherigen Experiment dargestellt, keinen Effekt auf das NF- κ B-Aktivierungspotential der Rezeptoren. Als Kontrolle wurde die NF- κ B-Aktivierung in Zellen mit physiologischen TRAF-Spiegeln getestet (Abb.15).

Dieses Experiment zeigte, dass TRAF3 das von TRAF2/5 vermittelte NF- κ B-Signal reduziert. Es zeigte sich auch, dass Rezeptoren mit besserer TRAF6-Bindung geringer auf den hemmenden Effekt von TRAF3 ansprachen. Rezeptoren, deren TRAF-Rekrutierungsmuster von TRAF6 dominiert waren, zeigten in Gegenwart hoher zellulärer TRAF3-Spiegel sogar erhöhte NF- κ B-Signale.

6.7. Aktivierung von NF- κ B über TRAF2 trotz starker TRAF6-Bindung

Trotz hoher TRAF6-Bindefähigkeit zeigten HVEM und LT β R als einzige Rezeptoren in Zellen mit hohen TRAF3-Spiegeln verringerte NF- κ B-Signalaktivität. Dies war überraschend, da die Experimente mit den CD40-Mutanten eine deutliche Reduzierbarkeit des NF- κ B-Signals nur bei dominierender TRAF2/5-Bindung zeigten. In unserem System wurde jedoch nur die potenziell mögliche TRAF-Rekrutierung gemessen. Es wurde nicht berücksichtigt, welche TRAFs rekrutiert wurden und in welcher Menge sie auch tatsächlich von den unterschiedlichen Rezeptoren für die Aktivierung bestimmter Signalwege benutzt wurden. Inwieweit HVEM und LT β R tatsächlich über TRAF2 NF- κ B aktivieren, wurde im folgenden Experiment gezeigt.

Hierfür sollte eine genauere Analyse der NF- κ B-Aktivierung durch die Rezeptoren in Zellen mit hoher Konzentration von DNTRAF2 erfolgen. DNTRAF2 verhält sich analog zu DNTRAF3. Dieses Protein besitzt zwar Bindungseigenschaften wie das Wildtyp-TRAF2, vermittelt jedoch keine Signalaktivität mehr.

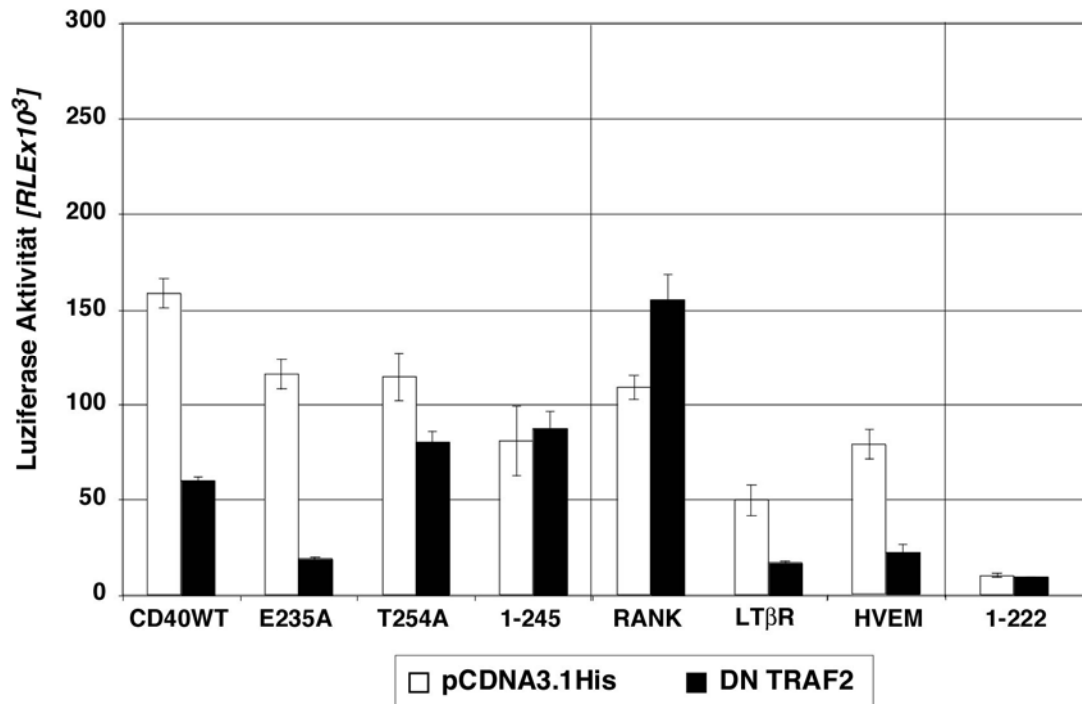


Abbildung 16: Dominant negatives TRAF2 supprimiert das NF- κ B-Signal von LT β R und HVEM. NF- κ B-Aktivität ist dargestellt als Luziferaseaktivität relativ zu den getesteten Rezeptoren. CD40₁₋₂₂₂ ist die Negativkontrolle des Systems. Der weiße Balken stellt die Luziferaseaktivität unter normaler TRAF-Expression dar (pCDNA 3.1). Schwarz ist die NF- κ B-Aktivität nach Überexpression von dominant negativem TRAF2.

In diesem Experiment konnte die Aktivität von CD40_{WT}, einem Rezeptor, der sein Signal sowohl über TRAF2 als auch über TRAF6 generiert, in seiner NF- κ B-Translokation um ca. 50% reduziert wurden. Derjenige Rezeptor mit fast ausschließlicher TRAF2-, TRAF3- und TRAF5-Bindung (CD40_{E235A}) konnte mit DNTRAF2 fast bis auf die Signalaktivität der Negativkontrolle (CD40₁₋₂₂₂) reduziert werden. Je stärker die NF- κ B-Aktivierung über die TRAF6-Bindung generiert wurde, desto weniger beeinflusste DNTRAF2 den Rezeptor in seiner Signalaktivität (CD40_{T254A}, CD40₁₋₂₄₅). So konnte auch RANK mit dominierender TRAF6-Bindung durch DNTRAF2 nicht negativ beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu konnten HVEM und LT β R wie der Rezeptor CD40_{E235A} mit DNTRAF2 in ihrer NF- κ B-Aktivität fast bis auf das Hintergrundsignal des Testsystems reduziert werden. Dieses Experiment zeigt, dass die Rezeptoren HVEM und LT β R trotz hoher TRAF6-Bindungs-fähigkeit ihr NF- κ B-Signal hauptsächlich über TRAF2 generieren und

deshalb auch in Zellen mit hoher TRAF3-Expression in ihrem Signal supprimiert werden konnten.

6.8. Regulation der p50-, p52-, RelA- und RelB-Translokation durch TRAF3

Wie unter 6.4 im Reporterassay gezeigt, lässt sich ein Rezeptor wie CD40, der TRAF2/5 aber auch TRAF6 bindet, durch TRAF3 in der Induktion seines Reportergens nicht beeinflussen. CD40_{E235A}, ein TRAF6-defizienter Rezeptor, wird allerdings in Anwesenheit von TRAF3 gänzlich in seiner NF- κ B-Aktivität supprimiert. CD40₁₋₂₄₅ ein Rezeptor, der nur TRAF6 bindet, wird von einer hohen TRAF3-Expression in seiner induzierten Luziferaseaktivität nicht beeinflusst.

In den gezeigten Experimenten konnte im Reporterassay jedoch nur die durch die Gesamtheit der NF- κ B-Komponenten induzierte Aktivität des Reportergens gezeigt werden. Von Interesse war aber, welchen Einfluss TRAF3 auf die beiden unterschiedlichen NF- κ B-Signalwege ausübt. Bonizzi und Karin et al. zeigen die Bedeutung des klassischen Signalwegs für die angeborene Immunantwort. Dieser ist IKK γ -abhängig und führt zur Translokation von p50/RelA in den Zellkern (Bonizzi and Karin, 2004). Der alternative Signalweg reguliert verschiedene Aspekte der erworbenen Immunantwort und benötigt die Funktion der IKK α . Seine Aktivierung führt zur nukleären Translokation von p52/RelB (Senftleben et al., 2001). Das folgende Experiment zeigt, inwieweit die Aktivierung des klassischen Signalwegs über p50/RelA bzw. die des alternativen Signalwegs über p52/RelB mit dem Rekrutierungsverhalten der TRAFs an die Rezeptoren korreliert.

Dass die p52- und p50-Translokation durch TRAF3 beeinflusst wird, konnte im folgenden Experiment anhand von Kernextrakten und Western-blotting-Analysen gezeigt werden.

6.8.1. Translokation von p50 und p52 über die unterschiedlichen TRAFs

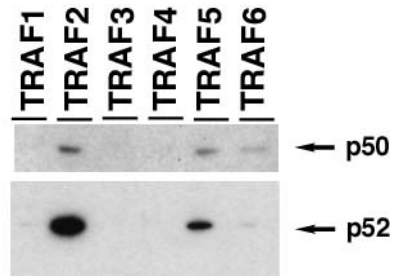


Abbildung 17: TRAF-induzierte p52- und p50-Translokation HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für TRAF1-6 transfiziert. 28 Stunden nach Transfektion wurden Kernextrakte, wie in Material und Methoden beschrieben bereitet. Zehn Mikrogramm Protein von jedem Extrakt wurden wie unter Material und Methoden beschrieben, im Westernblot analysiert.

Im Westernblot zeigten Zellen mit einer hohen TRAF2- oder TRAF5-Expression ein starkes p52-Signal und somit eine deutliche Aktivierung des alternativen Signalweges. Hingegen zeigten TRAF1, TRAF3, TRAF4 und TRAF6 keine Translokation für p52 in den Zellkern.

Die Translokation von p50, der Komponente des klassischen Signalweges hingegen konnte eindeutig bei Expression von TRAF2, TRAF5 und TRAF6 gezeigt werden. Für TRAF1, TRAF3 und TRAF4 konnte keine Translokation von p50 in den Zellkern gezeigt werden.

6.8.2. Inhibition der TRAF2/5-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch TRAF3 im CD40-Modell

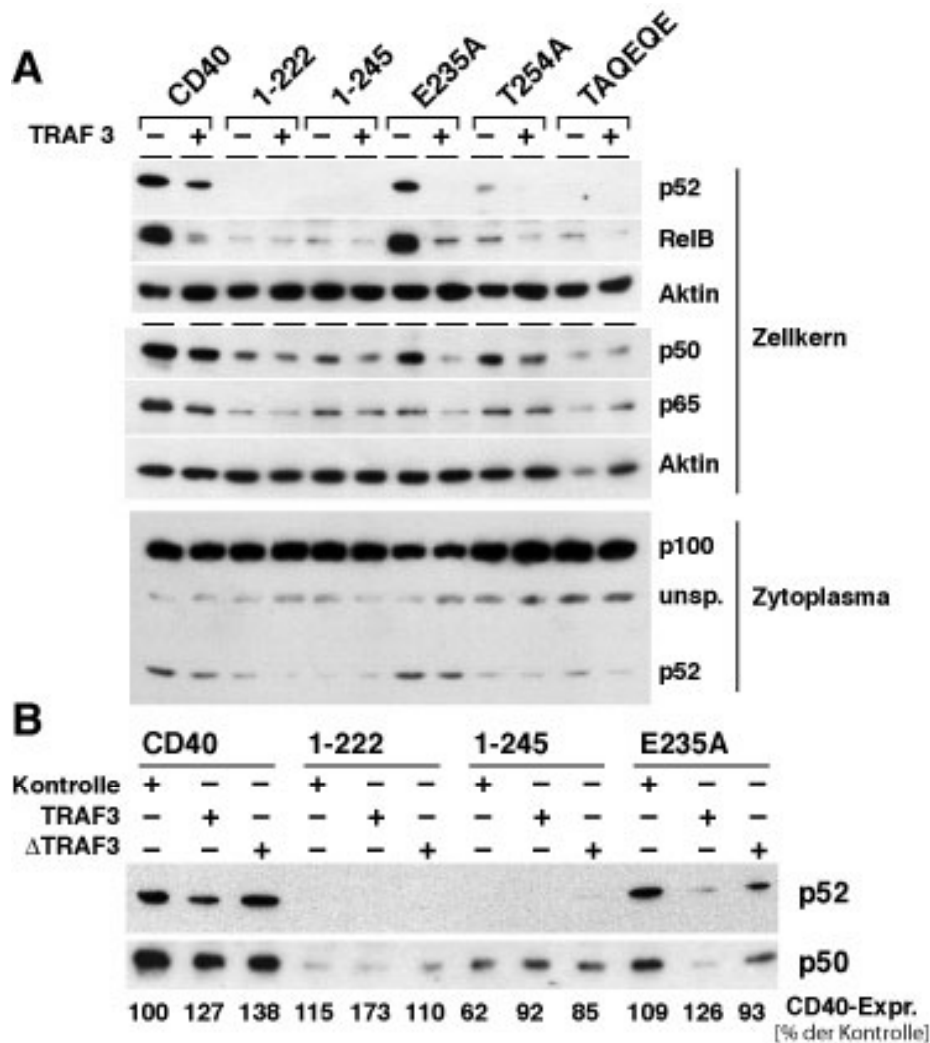


Abbildung 18: TRAF3 inhibiert NF- κ B-Aktivierung über TRAF2/5 aber nicht über TRAF6.

HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für CD40 oder den beschriebenen Mutanten (CD40₁₋₂₂₂, CD40_{E235A}, CD40_{T245A}, CD40_{TAQE263QE274} und CD40₁₋₂₄₅) zusammen mit TRAF3WT (A), Δ TRAF3 (B) oder einem Kontrollplasmid (A und B) transfiziert. Die Zellen wurden 26 Stunden nach Transfektion abgelöst und Kernextrakte wurden wie beschrieben hergestellt (Pullen et al., 1999b). Um die Gleichmäßigkeit der Ladung des Gels zu beurteilen wurde Aktin mit anti-Aktin-Antikörpern nachgewiesen. Fünf Mikrogramm Protein eines jeden Extrakts wurden im Westernblot hinsichtlich der NF- κ B-Komponenten p52, RelB, p50 und RelA analysiert. Die p100 Degradierung wurde in der Zytoplasmafraktion desselben Experiments gemessen. CD40- oder CD40mut-Expression wurde

ebenfalls in der Zytoplasmafraktion der Kernextrakte bestimmt und ist als Prozentangabe zu dem Kontrollexperiment mit CD40_{WT} dargestellt.

Wie in Abbildung 18 gezeigt, reduzierte die Inaktivierung der TRAF2/3/5-Bindungsstelle, wie für die CD40-Mutanten CD40_{T254A} und CD40₁₋₂₄₅ gezeigt, die Translokation des p52/RelB-Komplexes. Dies korrelierte mit reduzierter oder fehlender p100-Prozessierung im Zytoplasma. Eine Inaktivierung der TRAF6-Bindungsstelle hatte andererseits keinen Effekt auf die CD40-induzierte nukleäre Translokation von p52 oder die zytoplasmatische p100-Prozessierung. Die Translokation der p50/RelA-Heteromere schien sowohl durch TRAF6 als auch durch TRAF2/5 aktiviert zu werden. Weder eine Mutation in der TRAF6-Bindungsstelle, noch das Fehlen der TRAF2/5-Bindung verhinderte komplett die Translokation des p50/RelA-Komplexes in den Zellkern.

Eine Betrachtung des CD40-induzierten NF- κ B-Signals in Zellen mit hoher TRAF3-Expression ergab, dass TRAF3 die nukleäre Translokation von p52 und RelB inhibiert. Diese Reduktion war für CD40 inkomplett. Eine komplette Suppression konnte für die CD40-Mutante E235A, die ausschließlich TRAF2, -3 und -5 bindet gezeigt werden. Dabei inhibierte TRAF3 sowohl die von CD40_{E235A}-vermittelte Translokation von p52/RelB als auch die von p50/RelA. Dieses Experiment zeigte somit außerdem, dass TRAF2/5 sowohl den alternativen als auch den klassischen NF- κ B-Signalweg aktiviert. TRAF3 inhibiert als negativ regulatorisches Element sowohl den alternativen als auch den von TRAF2/5 abhängigen klassischen Signalweg. TRAF6 induziert dagegen nach Bindung an CD40 ausschließlich den klassischen Signalweg.

Die Spezifität dieses TRAF3-Effekts auf den TRAF2/5-bindungsabhängigen Signalweg zeigte sich anhand der CD40₁₋₂₄₅-Mutante, die ausschließlich TRAF6 bindet. Diese Mutante konnte keine p100-Degradierung im Zytoplasma oder p52/RelB-Translokation in den Zellkern induzieren. Dennoch vermittelte CD40₁₋₂₄₅, wenn auch auf niedrigerem Niveau als CD40_{WT}, die Translokation von p50/RelA in den Zellkern. Dieses NF- κ B-Signal wurde nicht vom TRAF3-Expressionsniveau in der Zelle beeinflusst. Dies demonstriert, dass TRAF3 das TRAF6-induzierte NF- κ B-Signal nicht beeinflusst.

6.8.3. Regulation der NF- κ B-Aktivität der Mitglieder der TNFR-SF durch TRAF3 auf den alternativen Signalweg

Geninaktivierungsexperimente zeigen, dass TRAF3 wichtig für das Überleben des erwachsenen Organismus ist. Daher waren wir daran interessiert herauszufinden, ob und in wie weit die regulatorische Funktion des TRAF3 auf den alternativen NF- κ B-Signalweg auf CD40 beschränkt ist.

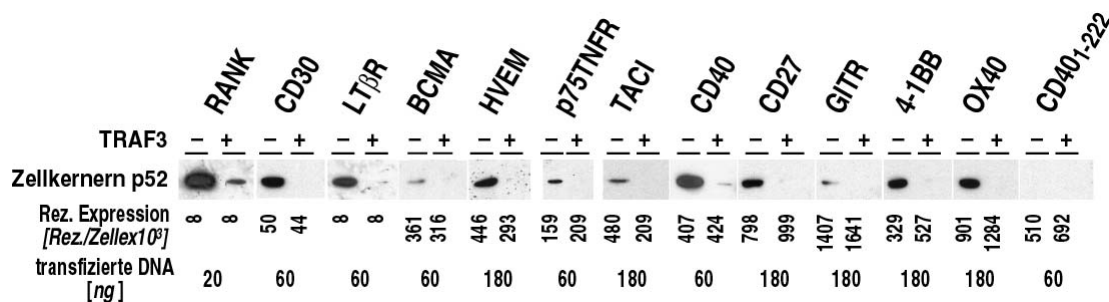


Abbildung 19: TRAF3 inhibiert die Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs der TNFR-SF. Zu sehen ist die nukleäre Translokation von p52 der verschiedenen Mitglieder der TNFR-SF in HEK293T-Zellen bei physiologischer und hoher TRAF3-Expression. Transfektionen wurden durchgeführt, wie oben beschrieben. Die Rezeptorexpression wurde in vorherigen Experimenten an eine mittlere p52-Signalintensität angeglichen. Die Menge des eingesetzten Rezeptor-Expressionsplasmids, die in diesem Experiment verwendet wurden, und die resultierende Rezeptorexpression sind erkennbar. Die Rezeptorexpression wurde in der Zytoplasmafraktion der Kernextrakte bestimmt, die für die Detektion von nukleärem p52 verwendet wurden.

Übereinstimmend mit den Rekrutierungsdaten aktivierten alle 12 getesteten Rezeptoren den alternativen NF- κ B-Signalweg. Wie in Abb.19 gezeigt, signalisierten sie über die Translokation von p52. Die Aktivität des alternativen Signalwegs korrelierte annähernd mit der TRAF5-Rekrutierung (Abb.19). RANK zeigte das stärkste Signal, wobei eine Expression von 4000 Rezeptoren/Zelle ausreichte, um ein p52-Signal zu detektieren. Ein ähnlich starkes Signal konnte für den LT β R gezeigt werden. Für CD30 und p75TNFR war eine 10-15-fach höhere Rezeptorexpression notwendig. Eine weitere 5-fach höhere Expression war nötig, um für die Rezeptoren BCMA, HVEM, CD40, TACI und 4-1BB eine messbare p52-

Translokation zu erzielen. Die höchste Rezeptorexpression von ca. 10^6 /Zellen war für CD27, GITR und OX40 notwendig. Als Nächstes testeten wir das NF- κ B-Signal in Zellen mit hoher TRAF3-Expression. Wie erwartet, war der alternative Signalweg in Zellen mit hoher TRAF3-Expression in allen Fällen vollständig unterdrückt. Die einzige Ausnahme bildete RANK, der das stärkste Signal zeigte, bei dem nur eine Reduktion des NF- κ B-Signals erreicht wurde.

7. DISKUSSION

7.1. Vergleich des ELISA-Systems mit etablierten Methoden

In dieser Studie wurde ein neu etabliertes ELISA-Testsystem zur Messung der TRAF-Rekrutierung an die unterschiedlichen Mitglieder der TNFR-SF verwendet.

Bereits bekannte TRAF-Rekrutierung konnte bestätigt werden (Dempsey et al., 2003; Bradley and Pober, 2001; Inoue et al., 2000). Außerdem gelang es, bisher unbekannte TRAF-Bindungsmuster aufzuzeigen. Zum Beispiel ließ sich eindeutig nachweisen, dass der p75TNFR neben TRAF1, -2 und -5 auch TRAF3 und TRAF6 bindet. Für den LT β R konnte neben den bereits bekannten TRAF-Interaktionen TRAF1- und TRAF6-Bindung demonstriert werden (Abb. 10).

Wahrscheinlichste Erklärung für die von der Literatur abweichenden Befunde ist eine überlegene Sensitivität, des hier für die TRAF-Rekrutierung benutzten Messsystems. Während in früheren Studien Testsysteme bevorzugt wurden, bei denen eine Interaktion zwischen TRAF und der Rezeptorsignaldomäne unter reinen In-vitro-Bedingungen stattfindet, wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, dass die Rezeptor-TRAF-Interaktionen in einer intakten Zelle stattfinden. Damit stehen alle benötigten Kofaktoren für die TRAF-Rezeptor-Bindung zur Verfügung und es ist sichergestellt, dass die TRAF-Rekrutierung in den korrekten Zellkompartimenten stattfindet. Die hier präsentierten Befunde belegen eindeutig, dass es in der intakten Zelle zu einer effizienteren Rezeptor-TRAF-Bindung kommt. Daraus resultiert eine überlegene Sensitivität des Messsystems.

Die bisherigen Erkenntnisse zu TRAF-TNFR-SF-Interaktionen beruhen fast ausschließlich auf In-vitro-Experimenten. Hier wurden zum einen GST-Fusionsproteine verwendet, und TRAF und Rezeptor wurden in getrennten Zellen exprimiert. Die anschließende Komplexbildung erfolgte im Reagenzglas (Abb.9). Der Einfluss von Kofaktoren oder zellulärer Kompartimente auf die TRAF-TNFR-SF-Interaktion wird dabei nicht berücksichtigt. Andere Arbeitsgruppen benutzen das YTH-System, um die Interaktion zwischen TRAF-Proteinen und Mitgliedern der TNFR-SF nachzuweisen (Ansieau et al., 1996; Arch and Thompson, 1998; Gedrich

et al., 1996; Hsu et al., 1997; Jang et al., 1998; Rothe et al., 1995; Xia et al., 2000). Voraussetzung für die Funktion dieses Systems ist die Kerngängigkeit beider Bindungspartner. Um dies zu gewährleisten, müssen sowohl TRAF als auch der Rezeptor von Interesse als Fusionsprotein mit adäquaten DNA-Binde- bzw. Transaktivierungsdomänen exprimiert werden. Zusätzlich ist in den meisten Fällen auch die Einführung einer Kerntranslokationssequenz vonnöten. Die daraus resultierenden Strukturveränderungen an den Bindedomänen der einzelnen Proteine sind nur schwer einschätzbar. Dazu kommt noch, dass Hefezellen als Eukaryonten menschlichen Zellen zwar sehr ähnlich sind, aber trotzdem keine Garantie gegeben ist, dass die molekulare Ausstattung so konserviert ist, dass TRAF-TNFR-SF-Interaktionen auch tatsächlich stattfinden können. Aufgrund dieser Nachteile ist das YTH-System ausgesprochen anfällig für Fehlinterpretationen.

Wiederum andere Gruppen verwendeten für den Rekrutierungsnachweis Proteine verschiedener Spezies. So wurde zum Beispiel das TRAF-Rekrutierungsmuster des humanen OX40-Rezeptors mit murinen TRAF1-, TRAF2- und TRAF5-Proteinen bestimmt (Kawamata et al., 1998), obwohl Speziespezifitäten bei TRAF-TNFR-SF-Interaktionen nicht auszuschließen sind (Bishop, 2004; Ahonen et al., 2002).

Die hier präsentierten Daten zeigen, dass die Expression von TRAFs und Mitgliedern der TNFR-SF in einer Zelle zu einer effizienteren Komplexbildung führt und die Messung der TRAF-TNFR-SF-Interaktion sowohl über direkte als auch über indirekte Bindung erlaubt.

Dieser Ansatz hat jedoch auch Nachteile. Unspezifische Bindung aufgrund zu starker Überexpression der Bindungspartner könnte zum Beispiel zu falsch positiven Ergebnissen führen. Kontrollexperimente mit Rezeptormutanten zeigten jedoch, dass zum Beispiel die Mutation einzelner Aminosäuren ausreichte, um die Bindung bestimmter TRAFs komplett zu blockieren (Daten nicht veröffentlicht). Dies wäre bei unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen nicht zu erwarten und bestätigt, dass es sich bei den gezeigten TRAF-Rezeptor-Interaktionen mit hoher Sicherheit nicht um Artefakte der Überexpression handelt.

7.2. Bestätigung die Funktionalität der Hybridrezeptoren durch Kontrollexperimente

Die vergleichende TRAF-Bindungsanalyse wurde hier mit Rezeptorhybriden durchgeführt. Die funktionelle Vergleichbarkeit der verwendeten Hybride mit den jeweiligen Wildtyprezeptoren wurde bereits früher demonstriert (Hess et al., 1995). In dieser Arbeit wurde darüber hinaus anhand von CD27 und p75TNFR gezeigt, dass sich die Hybridrezeptoren sowohl hinsichtlich TRAF-Rekrutierung (Abb.8) als auch im Bezug auf NF- κ B-Aktivierung wie die jeweiligen Wildtyprezeptoren verhalten. Einflüsse einer veränderten TM-Domäne auf die Funktion des Hybridrezeptors, wie sie zum Beispiel von Weiner et al demonstriert wurden, konnten ebenfalls durch den Vergleich der CD40TMRezeptorI_{ZD}- mit den CD40EZDRezeptorTM-Hybriden ausgeschlossen werden (Abb.7/8) (Weiner et al., 1989).

Die Kontrollexperimente mit p75TNFR und CD27 zeigten auch, dass die Ligand-Rezeptor-Interaktion in der TNFR-SF sehr ähnlichen molekularen Grundgesetzen folgt. Die hier gezeigten Experimente wiesen nach, dass es für die Funktion der Signaldomäne keinen Unterschied macht, ob der Rezeptor mit der EZD des Wildtyprezeptors versehen war und von dem korrespondierenden Liganden stimuliert wurde, oder ob es sich um einen Hybridrezeptor handelte, dessen CD40-Extrazellulärdomäne mit CD40-Liganden stimuliert wurde.

Damit scheint weder die TRAF-Rekrutierung an die Signaldomänen der unterschiedlichen Rezeptoren noch deren Fähigkeit, NF- κ B zu induzieren, davon abzuhängen, über welche EZD-Ligandkombination der TNFR-SF bzw. der TNFL-SF die Aktivierung erfolgt. Die Aktivierung der Signaldomänen der unterschiedlichen Rezeptoren scheint somit nicht von der Stimulation durch unterschiedliche Liganden oder Zytokine abzuhängen.

7.3. Quantitative Unterschiede in der Rezeptor-TRAF-Rekrutierung

Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen (Tab.1) der hier untersuchten Rezeptoren war zu erwarten, dass sich die TRAF-Rekrutierungsmuster einzelner Rezeptoren deutlich voneinander unterscheiden. Paradoxerweise ist dies nach den hier erhobenen Befunden nicht der Fall. Jeder untersuchte Rezeptor hatte die Fähigkeit, jedes TRAF zu binden. Allerdings ergaben sich enorme quantitative Unterschiede

von bis zu 5 logarithmischen Größenordnungen. Besonders deutlich wurde dies z.B. für den Rezeptor RANK, welcher 30000-fach mehr TRAF6 bindet als der CD27-Rezeptor (Abb.10).

Die unterschiedlich starke Bindung der TRAFs an den Rezeptor kann von der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen abhängen. Es sind aber auch unterschiedliche Bindungsmotive mit unterschiedlichen AS-Sequenzen für ein und dasselbe TRAF beschrieben, die unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen TRAFs besitzen. Daraus könnte eine stärkere bzw. schwächere Bindung resultieren. Ebenfalls könnte eine direkte oder indirekte Bindung des einen TRAFs an die Rezeptoren Einfluss auf die Bindungsstärke eines anderen TRAFs nehmen. Um dies zu unterscheiden, müsste das bestehende Testsystem jedoch modifiziert und weiter ausgearbeitet werden.

Quantitative Unterschiede bei der TRAF-Rekrutierung könnten die unterschiedlichen biologischen Funktionen der Mitglieder der TNFR-SF erklären. Es ist aber unwahrscheinlich, dass diese Rekrutierungsunterschiede alleine für die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden und unterschiedlicher Zellfunktionen wie z.B. Proliferation, Differenzierung oder Apoptose verantwortlich sind. Vielmehr ist die Zelle neben der TRAF-Rekrutierung auch von der Aktivierung durch eine ligandtragende Zelle abhängig, sowie von der Ausstattung und Menge der in den unterschiedlichen Zellen zur Verfügung stehenden TRAFs. Eine solche unterschiedliche Ausstattung der Zellen mit TRAFs kann zu Veränderungen der Zellsignale führen. So zeigten Yeh et al. z.B. dass in TRAF2-defizienten Zellen ein Signal, das normalerweise NF- κ B-Translokation hervorruft, zu Apoptose führt (Yeh et al., 1997).

7.4. NF- κ B-Aktivierung über TRAF2, TRAF5 und TRAF6

Die Signalaktivität der Rezeptoren wurde hier am Beispiel des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht. Rothe et al. beschrieben erstmals vor 10 Jahren, dass CD40 den NF- κ B-Signalweg aktiviert (Rothe et al., 1995). Mit der Isolierung der TRAF-Proteine zeigte sich, dass TRAF2, -5 und -6 an dieser Signalaktivität partizipieren (Ishida et

al., 1996a; Ishida et al., 1996b; Rothe et al., 1995). Dennoch ist es trotz ausgedehnter Struktur-Funktions-Analysen auch weiterhin unklar, wie das Zusammenspiel der drei TRAFs funktioniert, um NF- κ B zu aktivieren (Devergne et al., 1996; McWhirter et al., 1999; Ni et al., 2000; Park et al., 1999; Pullen et al., 1999a). Paradoxe Weise hatte die isolierte Elimination der TRAF6 oder der TRAF2/3/5-Bindungsstelle geringen oder gar keinen Effekt auf das NF- κ B-Signal von CD40. Dies führte zu der Spekulation, dass CD40 zusätzliche TRAF-unabhängige Mechanismen benützt, um diesen Transkriptionsfaktor zu aktivieren (Devergne et al., 1996).

Es ist bekannt, dass TRAF2, -5 und -6 die Fähigkeit besitzen, NF- κ B zu aktivieren. Im Hinblick auf die hier gezeigten Rekrutierungsergebnisse, dass alle Rezeptoren TRAF2, -5 und -6 binden können, war es nicht überraschend, dass in unseren Experimenten alle getesteten Rezeptoren NF- κ B induzierten. Damit konnte das NF- κ B-Signalpotenzial der Rezeptoren weder einem einzelnen TRAF noch einer bestimmten TRAF-Kombination zugeordnet werden. Allein die Erwartung, dass Rezeptoren mit starker TRAF2-, TRAF5- und TRAF6-Bindung über ein hohes NF- κ B-Signalpotenzial verfügen, bestätigte sich. Rezeptoren mit hoher TRAF-Bindekapazität aktivierten NF- κ B schon bei einer sehr geringen Rezeptorexpression (Abb.11). Eine detailliertere Analyse der TRAF-Rekrutierung und der NF- κ B-Signalaktivität der Rezeptoren zeigte Feinheiten auf. So scheint z.B. die NF- κ B-Signalstärke von der Rekrutierung bestimmter TRAFs abhängig zu sein. Dementsprechend konnte für alle Rezeptoren mit hohem NF- κ B-Signalpotential auch eine starke TRAF5-Bindung nachgewiesen werden. RANK, CD30, p75TNFR und LT β R wiesen eine hohe TRAF2/5-Bindungskapazität auf und induzierten schon bei niedriger Expression ein deutlich nachweisbares NF- κ B-Signal. Neben TRAF5 rekrutierten sie auch TRAF6 erheblich besser als der Referenzrezeptor CD40_{WT}. TACI und BCMA sind dagegen durch hohe TRAF6-, jedoch eine niedrige TRAF2/5-Bindung charakterisiert. Bei TACI und BCMA konnte eine hohe NF- κ B-Induktion nur bei hohen Expressionsspiegeln beobachtet werden.

Eine mögliche Interpretation des Vergleichs der Rekrutierungsdaten mit den Signalstärken der Rezeptoren ist, dass TRAF2 ein qualitatives Basissignal induziert

und TRAF5 die Signalamplitude festlegt. Das Signalmaximum könnte von TRAF6 abhängen. Geht man davon aus, dass der Reporterassay nur klassisches NF- κ B misst, wäre ein alternativer Mechanismus, dass TRAF2/5 ein sehr schnelles, von p50 dominiertes NF- κ B-Signal aktiviert. TRAF6 induziert hingegen ein hohes, jedoch verzögertes NF- κ B Signal mit überwiegender RelA-Komponente. Welche Bedeutung TRAF2, -5 und -6 auf den Signalweg wirklich haben, kann mit dem hier verwendeten Reporterassay, der lediglich das Transkriptionsprodukt der unterschiedlichen NF- κ B-Komponenten misst, nicht gezeigt werden.

Mit der Entdeckung, dass neben dem klassischen auch noch ein zweiter, sogenannter alternativer NF- κ B-Signalweg existiert, wurde deutlich, dass die NF- κ B-Aktivierung durch Mitglieder der TNFR-SF erneut untersucht werden musste, da die bis dato verwendeten Reportertestsysteme nicht in der Lage sind, zwischen den einzelnen Komponenten des alternativen (p52/RelB) bzw. des klassischen Signalwegs (p50/RelA) zu differenzieren.

7.5. TRAF3 als regulatorisches Molekül im NF- κ B-Signalweg

Coope et al. waren die ersten, die zeigten, dass CD40 sowohl den alternativen als auch den klassischen Signalweg aktiviert (Coope et al., 2002). Diese Studie lieferte erste Beweise dafür, dass TRAF2-Rekrutierung und TRAF2-Funktion für die CD40-induzierte Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs von Bedeutung sind. Die hier gezeigten Daten unterstützen und ergänzen diese Beobachtung. Zwei CD40-Mutanten, die nur TRAF6 rekrutierten (CD40₁₋₂₄₅ und CD40_{TAQEQE}), waren nicht mehr in der Lage, den alternativen Signalweg zu aktivieren. Eine CD40-Mutante (CD40_{E235A}), die nur über TRAF2, -3 und -5 signalisiert, aktivierte andererseits den alternativen Signalweg und unerwarteterweise auch den klassischen NF- κ B-Signalweg (Abb.18). Ein Vergleich dieser Mutanten im Reporterassay bestätigte die Beobachtungen früherer Studien. Weder das Fehlen der TRAF6- noch das der TRAF2/3/5-Bindungsstelle hatte bedeutenden Effekt auf die Fähigkeit von CD40, die Transkription eines NF- κ B-responsiblen Reportergens zu aktivieren (Abb.15). Dennoch unterstützen die hier gezeigten Daten nicht die Hypothese, dass der CD40-

Rezeptor TRAF-unabhängige NF- κ B-Signalmechanismen nutzt. Die Translokation der NF- κ B-Heteromere in den Zellkern hängt eindeutig von intakten TRAF-Bindungsstellen ab. Ihre Eliminierung führt zu dem erwarteten Funktionsverlust des jeweiligen NF- κ B-Signalwegs (Abb.18). Ein Antagonismus zwischen TRAF6- und TRAF2/5-generiertem NF- κ B-Signal auf Transkriptionsebene würde erklären, warum TRAF-Rekrutierungsdefekte nicht mit den Ergebnissen des NF- κ B-Reporterexperimentes übereinstimmen. Beobachtungen mit dem LT β R unterstützen diese Möglichkeit. Es wurde gezeigt, dass die Inaktivierung der Kinase IKK α zu erhöhter NF- κ B-Signalaktivität des LT β R über den klassischen Signalweg führt (Leo et al., 1999). Eine ähnliche Beobachtung wurde in dieser Studie gemacht. Die Blockade des TRAF2/5-induzierten Signals über den alternativen Signalweg resultierte in einer erhöhten Expression eines NF- κ B-aktivierten Reportergens über den TRAF6-abhängigen klassischen Signalweg. Die molekulare Grundlage dieses Phänomens ist unklar und es werden weitere Studien nötig sein, um dies zu verstehen. Ein informativer Ansatz in dieser Hinsicht wäre zum Beispiel die Verwendung von NF- κ B-Reportergenkonstrukten, die spezifisch auf p50/RelA oder p52/RelB ansprechen.

Verschiedene Studien zeigten negativ regulatorische Effekte von TRAF3 auf das NF- κ B-Signal der Rezeptoren LT β R (Dejardin et al., 2002), OX40 (Force et al., 2000), BAFF (Takaori-Kondo et al., 2000), LMP (Hostager and Bishop, 1999; Cheng et al., 1995) und CD40 (Xu and Shu, 2002). Für p75TNFR existierten unterschiedliche Ergebnisse abhängig von den verwendeten Zelllinien, die zum Beispiel positiv und negativ regulatorische Effekte von TRAF3 postulieren (Rothe et al., 1995).

Die hier durchgeführten Experimente mit CD40-Mutanten zeigen, dass Rezeptoren, die NF- κ B ausschließlich über TRAF2/5 aktivieren, durch TRAF3 in ihrer Signalaktivität inhibiert werden, während Rezeptoren, die NF- κ B-Translokation über TRAF6 induzieren, nicht beeinflusst bzw. in ihrer Aktivität verstärkt werden (Abb.18). Dies stützt die Hypothese, dass TRAF3 als Regulator zwischen alternativem, TRAF2/5-abhängigem und klassischem, TRAF6-abhängigem NF- κ B dient. Wie hier gezeigt, kann der suppressive Effekt von TRAF3 auf das von CD40_{WT} induzierte NF- κ B-Signal im Reporterassay nicht nachgewiesen werden, da dieser Test nicht

zwischen den unterschiedlichen NF- κ B-Komponenten differenzieren kann. Erst die detaillierte Analyse der NF- κ B-Heteromere im Zellkern nach einer CD40-Aktivierung zeigte, dass das CD40-induzierte NF- κ B-Signal, das von TRAF2/5 ausgeht, das Ziel der regulatorischen Funktion von TRAF3 ist. Experimente mit einer CD40-Mutante, die nicht über TRAF6 signalisieren kann, bestätigten diese Befunde.

Frühere Studien führten diese Befunde der NF- κ B-Hemmung durch TRAF3 auf kompetitive Hemmung zurück. TRAF3 sollte nach dieser Theorie mit TRAF2 oder TRAF5 um die Bindungsstelle am CD40-Molekül konkurrieren (Rothe et al., 1995; Hostager and Bishop, 1999; Cheng et al., 1995; Takaori-Kondo et al., 2000; Xu and Shu, 2002). Mit Hilfe von TRAF3-Deletionsmutanten war es möglich zu zeigen, dass die inhibitorische Wirkung von TRAF3 nicht das Ergebnis einer Konkurrenz von TRAF3 bzw. TRAF2/5 um die Bindungsstelle ist, sondern dass ein intakter N-Terminus im TRAF3-Molekül notwendig ist. Der C-Terminus des TRAF3-Moleküls, der die Bindung an den Rezeptor vermittelt, war nicht ausschlaggebend in diesen Experimenten. Die Verwendung einer TRAF3-Deletionsmutante, die keinen intakten N-Terminus und somit keine funktionsfähigen Zink-Finger beinhaltet, zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf das NF- κ B-Signal mehr. Diese Beobachtung wird durch eine Studie von Takaori-Kondo et al. unterstützt, die als erste postulierten, dass die Zink-Finger im TRAF3-Molekül für die Inhibition, OX40-generierten NF- κ Bs ausschlaggebend sind (Takaori-Kondo et al., 2000).

Ein über TRAF2/5 generiertes NF- κ B-Signal benötigt die Kinase NIK (Haxhinasto et al., 2002). NIK ist damit das wahrscheinlichste Ziel des suppressiven Effekts von TRAF3 auf die NF- κ B-Aktivierung. In der Tat konnte die TRAF3-Bindung an NIK gezeigt werden (Song et al., 1997). Eine neuere Studie postuliert, dass diese Interaktion zur Ubiquitinierung und zur Degradierung von NIK führt (Xie et al., 2004). Weitere Beobachtungen anderer Kollegen unterstützen diese elegante Erklärung des TRAF3-Effekts nicht.

Takaori et al. zeigen, dass auch TRAF3-Mutanten, die keine Bindungsstelle für die NIK-Interaktion besitzen, immer noch in der Lage sind, die NF- κ B-Aktivierung über OX40 zu supprimieren (Takaori-Kondo et al., 2000). Ihre Experimente weisen darauf

hin, dass TRAF2 der wahrscheinlichere Angriffspunkt von TRAF3 ist (Force et al., 2000). Die Beobachtung von Ardila-Osorio et al., dass die TRAF-Degradierung in verschiedenen zellulären Kompartimenten von einander abweicht, trägt zu weiteren Unklarheiten bei (Ardila-Osorio et al., 2005; Liao et al., 2004). Weitere Studien werden nötig sein, um eine zufriedenstellende Erklärung für die gegensätzlichen Beobachtungen zu finden und den Mechanismus zu erklären, über den TRAF3 das TRAF2/5-vermittelte NF- κ B-Signal hemmt.

Hinsichtlich des letalen Ausgangs der Inaktivierung des TRAF3-Gens war es wichtig zu wissen, inwieweit die hier beschriebene TRAF3-Funktion weitere Bedeutung für den Signalweg der anderen Mitglieder der TNFR-SF besitzt. Wie hier gezeigt wird, unterstützen unsere Ergebnisse die Vorstellung, dass es die Funktion von TRAF3 ist, den alternativen Signalweg zu blockieren und den NF- κ B-Komplex, der in den Nukleus transloziert wird, in Richtung der p50/RelA-Konstellation zu verschieben. Inwieweit der Verlust eines Faktors wie TRAF3, der in die NF- κ B-Kaskade eingreift, letale Konsequenzen hat, kann im Moment nicht gezeigt werden. Wenn man jedoch die Bedeutung von NF- κ B für das Überleben bedenkt, ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Unfähigkeit, ein angemessenes NF- κ B-Signal zum richtigen Zeitpunkt zu generieren, letale Folgen haben kann, insbesondere wenn eine gesamte Rezeptorfamilie betroffen ist.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ahonen, C., Manning, E., Erickson, L. D., O'Connor, B., Lind, E. F., Pullen, S. S., Kehry, M. R., and 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., and Watanabe, T. (1997). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J. Biol. Chem.* 272, 2042-2045.

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., and *et al.* (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 259, 990-993.

Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., and Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.

Ansieau, S., Scheffrahn, I., Mosialos, G., Brand, H., Duyster, J., Kaye, K., Harada, J., Dougall, B., Hubinger, G., Kieff, E., *et al.* (1996). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-1, TRAF-2, and TRAF-3 interact in vivo with the CD30 cytoplasmic domain; TRAF-2 mediates CD30-induced nuclear factor kappa B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14053-14058.

Arch, R. H., Gedrich, R. W., and Thompson, C. B. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* 12, 2821-2830.

Arch, R. H., and 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.

Ardila-Osorio, H., Pioche-Durieu, C., Puvion-Dutilleul, F., Clause, B., Wiels, J., Miller, W., Raab-Traub, N., and Busson, P. (2005). TRAF interactions with raft-like buoyant complexes, better than TRAF rates of degradation, differentiate signaling by CD40 and EBV latent membrane protein 1. *Int. J. Cancer* 113, 267-275.

Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L. S., Stenkamp, R., Neubauer, M., and *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.

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

Bazzoni, F., and Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 334, 1717-1725.

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., and 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., and 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., and Mak, T. W. (1997). Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 592-600.

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

Brodeur, S. R., Cheng, G., Baltimore, D., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J. Biol. Chem.* 272, 19777-19784.

Brown, K. D., Hostager, B. S., and Bishop, G. A. (2002). Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 19433-19438.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.

Cheng, G., Cleary, A. M., Ye, Z. S., Hong, D. I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995). Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* 267, 1494-1498.

Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H., and 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., and 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., and Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* 21, 5375-5385.

Darnay, B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A., and Aggarwal, B. B. (1998). Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 20551-20555.

Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525-535.

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

Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* 16, 7098-7108.

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

Fessele, S., Boehlk, S., Mojaat, A., Miyamoto, N. G., Werner, T., Nelson, E. L., Schlondorff, D., and Nelson, P. J. (2001). Molecular and in silico characterization of a promoter module and C/EBP element that mediate LPS-induced RANTES/CCL5 expression in monocytic cells. *FASEB J* 15, 577-579.

Force, W. R., Glass, A. A., Benedict, C. A., Cheung, T. C., Lama, J., and Ware, C. F. (2000). Discrete signaling regions in the lymphotoxin-beta receptor for tumor necrosis factor receptor-associated factor binding, subcellular localization, and activation of cell death and NF-kappaB pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 11121-11129.

Franken, M., Estabrooks, A., Cavacini, L., Sherburne, B., Wang, F., and Scadden, D. T. (1996). Epstein-Barr virus-driven gene therapy for EBV-related lymphomas. *Nat. Med.* 2, 1379-1382.

Galibert, L., Tometsko, M. E., Anderson, D. M., Cosman, D., and Dougall, W. C. (1998). The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* 273, 34120-34127.

Garni-Wagner, B. A., Lee, Z. H., Kim, Y. J., Wilde, C., Kang, C. Y., and Kwon, B. S. (1996). 4-1BB is expressed on CD45RAhiROhi transitional T cell in humans. *Cell Immunol.* 169, 91-98.

Gedrich, R. W., Gilfillan, M. C., Duckett, C. S., Van Dongen, J. L., and 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.

Graf, D., Korthauer, U., Mages, H. W., Senger, G., and Kroccek, R. A. (1992). Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur. J. Immunol.* 22, 3191-3194.

Gravestein, L. A., Amsen, D., Boes, M., Calvo, C. R., Kruisbeek, A. M., and Borst, J. (1998). The TNF receptor family member CD27 signals to Jun N-terminal kinase via Traf-2. *Eur. J. Immunol.* 28, 2208-2216.

Gross, J. A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S. R., Madden, K., Xu, W., Parrish-Novak, J., Foster, D., Lofton-Day, C., *et al.* (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404, 995-999.

Gurney, A. L., Marsters, S. A., Huang, R. M., Pitti, R. M., Mark, D. T., Baldwin, D. T., Gray, A. M., Dowd, A. D., Brush, A. D., Heldens, A. D., *et al.* (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr. Biol.* 9, 215-218.

- Hatzoglou, A., Roussel, J., Bourgeade, M. F., Rogier, E., Madry, C., Inoue, J., Devergne, O., and Tsapis, A. (2000). TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF- κ B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* *165*, 1322-1330.
- Haxhinasto, S. A., Hostager, B. S., and Bishop, G. A. (2002). Cutting edge: molecular mechanisms of synergy between CD40 and the B cell antigen receptor: role for TNF receptor-associated factor 2 in receptor interaction. *J. Immunol.* *169*, 1145-1149.
- Heilig, J. S., Elbing, K. L., and Brent, R. (1998). Large Scale Preparation 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. 1.7.1-1.7.16.
- Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., and 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., Riethmüller, G., and 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., and Bishop, G. A. (1999). Cutting edge: contrasting roles of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and TRAF3 in CD40-activated B lymphocyte differentiation. *J. Immunol.* *162*, 6307-6311.
- Hsu, H., Solovyev, I., Colombero, A., Elliott, R., Kelley, M., and Boyle, W. J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J. Biol. Chem.* *272*, 13471-13474.
- Hu, H. M., O'Rourke, K., Boguski, M. S., and Dixit, V. M. (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J. Biol. Chem.* *269*, 30069-30072.
- Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.* *254*, 14-24.
- Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., *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. USA* *93*, 9437-9442.
- Israel, A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends Cell Biol.* *10*, 129-133.
- Jahnke, A., and Johnson, J. P. (1994). Synergistic activation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by TNF- α and IFN- γ is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat1 alpha (p91) that can be activated by both IFN- γ and IFN- α . *Febs Lett.* *354*, 220-226.

- Jahnke, A., Van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., and 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.
- Jang, I. K., Lee, Z. H., Kim, Y. J., Kim, S. H., and Kwon, B. S. (1998). Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-kappa B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 613-620.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621-663.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2, 301-310.
- Karin, M., and Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749-759.
- Kashiwada, M., Shirakata, Y., Inoue, J. I., Nakano, H., Okazaki, K., Okumura, K., Yamamoto, T., Nagaoka, H., and 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.
- Kawamata, S., Hori, T., Imura, A., Takaori-Kondo, A., and Uchiyama, T. (1998). Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF- kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 273, 5808-5814.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9150-9154.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J. Virol.* 69, 675-683.
- Khare, S. D., Sarosi, I., Xia, X. Z., McCabe, S., Miner, K., Solovyev, I., Hawkins, N., Kelley, M., Chang, D., Van, G., *et al.* (2000). Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3370-3375.
- Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Senba, E., and Kitamura, T. (2000). TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J. Biol. Chem.* 275, 20742-20747.
- Kuhne, M. R., Robbins, M., Hambor, J. E., Mackey, M. F., Kosaka, Y., Nishimura, T., Gigley, J. P., Noelle, R. J., and Calderhead, D. M. (1997). Assembly and regulation of the CD40 receptor complex in human B cells. *J. Exp. Med.* 186, 337-342.
- Kwon, B., Yu, K. Y., Ni, J., Yu, G. L., Jang, I. K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S. X., and Kwon, B. S. (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J. Biol. Chem.* 274, 6056-6061.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., *et al.* (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.

- Leo, E., Welsh, K., Matsuzawa, S., Zapata, J. M., Kitada, S., Mitchell, R. S., Ely, K. R., and 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.
- Li, Q., and Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 725-734.
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J. Biol. Chem.* *279*, 26243-26250.
- Ling, L., Cao, Z., and Goeddel, D. V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 3792-3797.
- 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.
- Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J. L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J. Exp. Med.* *190*, 1697-1710.
- Madry, C., Laabi, Y., Callebaut, I., Roussel, J., Hatzoglou, A., Le Coniat, M., Mornon, J. P., Berger, R., and Tsapis, A. (1998). The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Int. Immunol.* *10*, 1693-1702.
- Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* *385*, 540-544.
- Marsters, S. A., Ayres, T. M., Skubatch, M., Gray, C. L., Rothe, M., and Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* *272*, 14029-14032.
- McWhirter, S. M., Pullen, S. S., Holton, J. M., Crute, J. J., Kehry, M. R., and Alber, T. (1999). Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 8408-8413.
- Mosialos, G. (1997). The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin. Cancer Biol.* *8*, 121-129.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* *80*, 389-399.
- Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T., Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Yamamoto, T., and 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., and Okumura, K. (1996). TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J. Biol. Chem.* *271*, 14661-14664.

Nakano, H., Sakon, S., Koseki, H., Takemori, T., Tada, K., Matsumoto, M., Munechika, E., Sakai, T., Shirasawa, T., Akiba, H., *et al.* (1999). Targeted disruption of *Traf5* gene causes defects in CD40- and CD27- mediated lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 9803-9808.

Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Strober, W. (1996). Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat. Med.* *2*, 998-1004.

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

Opipari, A. W., Jr., Boguski, M. S., and Dixit, V. M. (1990). The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* *265*, 14705-14708.

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

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

Pullen, S. S., Dang, T. T., Crute, J. J., and Kehry, M. R. (1999a). 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., Labadia, M. E., Ingraham, R. H., McWhirter, S. M., Everdeen, D. S., Alber, T., Crute, J. J., and Kehry, M. R. (1999b). High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* *38*, 10168-10177.

Pullen, S. S., Miller, H. G., Everdeen, D. S., Dang, T. T., Crute, J. J., and 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.

Pype, S., Declercq, W., Ibrahim, A., Michiels, C., Van Rietschoten, J. G., Dewulf, N., de Boer, M., Vandenabeele, P., Huylebroeck, D., and 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.

Regnier, C. H., Tomasetto, C., Moog-Lutz, C., Chenard, M. P., Wendling, C., Basset, P., and Rio, M. C. (1995). Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* *270*, 25715-25721.

Reuther, J. Y., Reuther, G. W., Cortez, D., Pendergast, A. M., and 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., and 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.

Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., and Gross, V. (1998). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115, 357-369.

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

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

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

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.

Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.

Song, H. Y., Regnier, C. H., Kirschning, C. J., Goeddel, D. V., and 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. USA* 94, 9792-9796.

Stamenkovic, I., Clark, E. A., and Seed, B. (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* 8, 1403-1410.

Takaori-Kondo, A., Hori, T., Fukunaga, K., Morita, R., Kawamata, S., and Uchiyama, T. (2000). Both amino- and carboxyl-terminal domains of TRAF3 negatively regulate NF-kappaB activation induced by OX40 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 856-863.

Thompson, J. S., Bixler, S. A., Qian, F., Vora, K., Scott, M. L., Cachero, T. G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I. D., Mullen, C., *et al.* (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 293, 2108-2111.

Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 43-52.

Waldschmidt, T. J., and Noelle, R. J. (2001). Immunology. Long live the mature B cell--a baffling mystery resolved. *Science* 293, 2012-2013.

Weiner, D. B., Liu, J., Cohen, J. A., Williams, W. V., and Greene, M. I. (1989). A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339, 230-231.

Xia, X. Z., Treanor, J., Senaldi, G., Khare, S. D., Boone, T., Kelley, M., Theill, L. E., Colombero, A., Solovyev, I., Lee, F., *et al.* (2000). TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J. Exp. Med.* 192, 137-143.

Xie, P., Hostager, B. S., and Bishop, G. A. (2004). Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 199, 661-671.

Xu, L. G., and Shu, H. B. (2002). TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production. *J. Immunol.* 169, 6883-6889.

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

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3597-3602.

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

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., and Vincenz, C. (2001). A20 inhibits NF-kappa B activation downstream of multiple Map3 kinases and interacts with the IkappaB signalosome. *Cytokine* 15, 282-298.

9. DANKSAGUNG

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

Herrn Professor Dr. Gerd Riethmüller, der mir die Möglichkeit bot in seinem Institut meine Dissertation zu beginnen. Er unterstützte mich darin Stipendien für dieses Projekt zu erhalten und Kongresse zu besuchen. Ohne dies wäre es mir nur schwer möglich gewesen, angemessene Zeit in meine Dissertation zu investieren.

Gleichermaßen gilt mein Dank Herrn Professor Dr. rer. nat. Thomas Brocker, der mir als kommissarischer Leiter und neuer Vorstand des Instituts die Möglichkeit bot meine Dissertation in seinem Institut abzuschliessen.

Herrn P.D. Dr. Hartmut Engelmann danke ich für die hervorragende Einführung in die Molekularbiologie. Er weckte mein Interesse für die Immunologie und förderte mein wissenschaftliches Denken in zahlreichen Diskussionen. Ich möchte ihm danken für die Unterstützung bei Anträgen für Stipendien, die Betreuung in San Diego und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für seine Doktoranden hat.

Frau Christine Federle möchte ich danken und könnte seitenweise schreiben. Danke, für die unermüdliche Unterstützung, für dein Wissen über das garantierte Gelingen von Versuchen, das für mich manchmal immer noch ein Rätsel ist und dein stets positives Denken.

Stephanie Püschner danke ich für die kompetente Einführung, die kollegiale Zusammenarbeit und viele hilfreiche Tips.

Martin Herold, Martina Bongers und Maciek Lech danke ich für das gute Klima in der Arbeitsgruppe und für viele arbeitsreiche, spannende und lustige Tage im Labor.

10. LEBENSLAUF

Persönliches

Name:	Julia Christina Hauer
Geboren:	23.Nov.1977 in München
Staatsangehörigkeit::	Deutsch
Adresse:	Luisenstraße 67 80798 München

Ausbildung

Schulbildung:	
1988-1997	Franz-Marc-Gymnasium Markt-Schwaben, Bayern (Abiturnote 1,5)

1984-1988	Grundschule Poing: bei München
-----------	--------------------------------

Studium:

April 2004	3. Staatsexamen (Note 2,0)
------------	----------------------------

März 2003	2. Staatsexamen (Note 2,0)
-----------	----------------------------

Aug. 2000	1. Staatsexamen (Note 2,0)
-----------	----------------------------

Aug. 1999	Physikum (Note 3,0)
-----------	----------------------

Nov. 1997	Studienbeginn Humanmedizin
-----------	----------------------------

Anstellungen:

Mai-Juli 2004	wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Immunologie der LMU München
---------------	--

Seit August 2004	Assistenzärztin im Dr. von Haunerschen Kinderspital
------------------	---

Stipendien

Apr. 03-Juli 03	PJ-Stipendium für das Innere Medizin Tertial an der Harvard Medical School: Boston, USA durch die LMU München
-----------------	--

Juni 02	Sachmittelförderung durch das "Wissenschaftliche Herausgeberkollegium der Münchner Medizinischen Wochenzeitschrift e.V."
---------	--

Juni 01-Mai 02	Doktorandenstipendium der Boehringer Ingelheim Stiftung
----------------	---

Veröffentlichungen

- Feb. 05 Hauer et al. PNAS (2005) „TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF- κ B pathway by TRAF-binding TNFRs“

Vorträge

- Okt. 02 Vortrag auf dem “TNF-superfamily 2002“-Kongress in San Diego über “TRAF3 functions as a switch between TRAF2/5 and TRAF6 mediated NF- κ B activation”
- Juni 99 Posterpräsentation EULAR-Kongress, Glasgow “Expression and regulation of nitric oxide in scleroderma lung fibroblasts“: Centre of Rheumatology : Royal Free Hospital London

Wissenschaftliche Arbeit

Promotion

- Okt. 00 Promotion am Institut für Immunologie, LMU-München
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker
Arbeitsgruppe: PD Dr. med. Hartmut Engelmann

Praktika

- März 99 Laborpraktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried in München
Abteilung Strukturforschung, Prof. Dr. Robert Huber
- Aug.-Okt. 98 Praktikum am Royal Free Hospital: School of Medicine, London
Abteilung Rheumatologie, Prof. C.M. Black MD, FRCP

Lehrtätigkeit

- Jan04-Feb04 Tutorin im Harvard-Muskel-Kurs der LMU München

