

Die Rolle von p38 und des TNF-Rezeptors I
bei der TNF α - induzierten
Apoptose CD4+ T-Lymphozyten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Westphal, Dominik Sebastian
aus Ebersberg

Gießen 2018

aus dem medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Berghoff
2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Bein

Tag der Disputation: 07.06.2018

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
I.1 Immunsystem	1
I.2 Angeborenes Immunsystem	1
I.3 Adaptives Immunsystem	2
I.4 T-Lymphozyten.....	3
I.5 CD4+ T-Lymphozyten.....	3
I.6 Zellapoptose.....	6
I.7 Apoptoseregulierung in T-Lymphozyten	9
I.8 TNF α und seine Rezeptoren.....	11
I.9 Der TNF-Rezeptor 1 und seine Signalkaskade.....	12
I.10 Mitogenaktivierte Proteinkinasen.....	15
I.11 p38 als downstream target des TNFR1	16
I.12 p38 und seine Rolle bei der Apoptose CD4+ T-Lymphozyten.....	17
I.13 Zielsetzung der Arbeit.....	18
II. METHODEN	20
II.1 Zellkultur.....	20
II.2 Durchflusszytometrie	21
II.3 Semiquantitative RNA-Messung.....	24
II.4 Nachweis von Proteinen	27
II.5 ELISA.....	32
II.6 Zellproliferationsassay (WST-1).....	33
II.7 Zytotoxizitätsassay (LDH).....	33
II.8 Statistik.....	34
III. MATERIAL	35
IV. ERGEBNISSE	41
IV.1 TNF α führt zu einer erhöhten Rate apoptotischer Jurkat-Zellen in der Durchflusszytometrie	41
IV.2 Der Western-Blot als Methode zur Quantifizierung der Expression apoptoserelevanter Proteine in Jurkat-Zellen.....	43
IV.2.1 Die Stimulation durch TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die zelluläre Proteinkonzentration von cleaved PARP in Jurkat-Zellen.....	43
IV.2.2 Die Stimulation durch TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von cFlip in Jurkat- Zellen	44

IV.2.3 Die Stimulation mit TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Caspase 3 und cleaved Caspase 3 in Jurkat-Zellen	45
IV.2.4 Die Stimulation mit TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Caspase 8 in Jurkat-Zellen	48
IV.2.5 Die Stimulation mit TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Caspase 9 in Jurkat-Zellen	49
IV.3 Die zelluläre mRNA kodierend für Caspase 8 und cFlip ist nicht verändert	51
IV.4 TNF α führt zu einer Verminderung der Proliferation von Jurkat-Zellen	55
IV.5 Der durch TNF α induzierte Zelltod der Jurkat-Zellen ist nicht durch Zytotoxizität bedingt.....	57
IV.6 TNF α führt zu einer Reduktion des TNFR1 an der Zelloberfläche CD4+ T-Lymphozyten.....	59
IV.7 Die Stimulation mit TNF α hat keinen Einfluss auf die zelluläre Gesamtproteinmenge des TNFR1	61
IV.8 Die Stimulation mit TNF α führt zu einer konzentrationsabhängigen Änderung des sTNFR1	63
V. DISKUSSION	65
V.1 Apoptoseverhalten von Jurkat-Zellen unter steigender TNF α -Konzentration	65
V.2 p38 hat keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Jurkat-Zellen	68
V.3 Regulierung und Interpretation der Lokalisation des TNFR1.....	70
V.4 Klinische Bedeutung des TNFR1 und des TNF α -Signals.....	75
V.5 Das Versuchsdesign.....	77
VI. SCHLUSSFOLGERUNG.....	82
VII. ZUSAMMENFASSUNG	83
VIII. SUMMARY.....	84
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	86
QUELLEN	88
ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....	100
DANKSAGUNG	101
TABELLARISCHER LEBENS LAUF.....	102

I. EINLEITUNG

I.1 Immunsystem

Ein Organismus muss vor den pathogenen Mikroorganismen, welchen er täglich ausgesetzt ist, geschützt werden sowie in der Lage sein, maligne entartete Zellen zu eliminieren. Dazu ist ein System notwendig, das körperfremde beziehungsweise irreguläre Muster als solche erkennt, während es die körpereigenen Strukturen toleriert. Das menschliche Immunsystem, welches diese Aufgabe übernimmt, ist ein komplexes System, das sich in verschiedene Elemente unterteilen lässt. Es existiert die humorale, das heißt über lösliche Komponente wie Antikörper oder das Komplementsystem vermittelte sowie die zelluläre Immunabwehr. Außerdem finden sich das angeborene und das adaptive, das heißt über die Jahre entwickelte, Immunsystem (Rassow, Hauser et al. 2016).

I.2 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist bereits zu Beginn des Lebens voll entwickelt und zeichnet sich durch das schnelle Erkennen von bestimmten körperfremden Strukturen unterschiedlichster Art, sogenannter PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), wie zum Beispiel bakterielle oder virale Zuckermoleküle oder DNA/RNA Fragmente, über bestimmte Rezeptoren, wie die Toll-like Rezeptoren, aus. Die durch diese PAMPs aktivierten Zellen, zu denen unter anderem Makrophagen und neutrophile Granulozyten gehören, beginnen mit der Synthese und Freisetzung von verschiedenen Zytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukinen (ILs), um weitere Zellen des Immunsystems zu stimulieren und eine Entzündungsreaktion in Gang zu setzen. Eine weitere Komponente der angeborenen Immunabwehr ist das Komplementsystem, dessen lösliche Komponenten durch eine kaskadenartige Aktivierung in kleinere Fragmente gespalten werden und schließlich durch Porenbildung auf bakteriellen Oberflächen diese schädigen oder durch Opsonierung phagozytären Zellen als Marker dienen können. Der Vorteil des angeborenen Immunsystems ist, dass es schnell und trotzdem durch die Erkennung pathogener Strukturen spezifisch agieren kann. Ergänzt wird dieses System durch das erworbene oder auch adaptiv genannte Immunsystem. In diesem Zusammenhang seien auch zwei weitere Zellklassen erwähnt, welche dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden, dabei jedoch stark mit dem erworbenen Immunsystem interagieren: die dendritischen Zellen sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zelle). Die dendritischen Zellen sind, ähnlich wie die Makrophagen, zur Phagozytose pathogener Keime fähig. Die Mikroorganismen werden anschließend in den Lysosomen der Zellen

abgebaut und die dadurch freigesetzten Bestandteile über Major Histocompatibility Complex (MHC)-Klasse-II-Proteine den Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert, welche dadurch eine Aktivierung erfahren. Es handelt sich aus diesem Grund um sogenannte antigenpräsentierende Zellen. Die NK-Zellen hingegen können virusinfizierte Körperzellen erkennen und diese durch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen eliminieren. Um solche Zielzellen zu erkennen, dienen ihnen MHC-Klasse-I-Proteine, die von allen Zellen des menschlichen Körpers an deren Zelloberfläche exponiert werden. Werden diese Proteine durch die Infizierung der Zelle durch ein Virus vermindert oder in veränderter Form an der Zelloberfläche dargestellt, werden die betroffenen Zellen durch die NK-Zellen erkannt und in der Folge dessen eliminiert. Zum Teil erfolgt diese Identifizierung auch durch die Opsonierung der Zielzelle durch Antikörper. (Rassow, Hauser et al. 2016).

I.3 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem gliedert sich in zwei große Zellpopulationen auf: die B- und die T-Lymphozyten. Die aus dem Knochenmark stammenden B-Zellen wurden nach ihrem Bildungsort beim Menschen, dem *bone marrow* (engl. Knochenmark), benannt. Ihre Aufgabe besteht dabei hauptsächlich aus der Produktion und Freisetzung von Antikörpern (Immunglobuline, Igs) gegen zuvor erkannte Antigene. Für die Produktion von Antikörpern benötigt eine B-Zelle zusätzlich zu Ihrem Stimulus durch das Antigen eine Interaktion mit T_H2-Zellen. Diese setzt ein Prozessieren des Antigens in den Lysosomen der B-Zellen, die Präsentation der Fragmente über MHC-Klasse-II-Proteine seitens der B-Zelle und deren Erkennung durch einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) der T_H2-Zelle voraus. Die Antikörper werden dabei spezifisch auf einen erkannten Erregertyp durch somatische Rekombination, das heißt durch Neuordnung bestimmter Genabschnitte in somatischen Zellen, geprägt und spezifisch vermehrt, so dass eine hochselektive Immunantwort möglich wird. Die Vielfalt der Antikörper wird zusätzlich durch sogenannte somatische Hypermutation erhöht. Das bedeutet, dass durch Punktmutationen in bestimmten Genregionen während der Rekombination zu jedem der Antigene ein hochspezifischer Antikörper kreiert werden kann. Dabei unterscheiden sich die synthetisierten Igs in ihrem Aufbau und Typ je nach Bildungsort oder zeitlichem Auftreten und Art der Infektion. Diese effektive, durch Antikörper vermittelte Immunantwort wird durch die T-Zellen, welche regulatorische sowie zytotoxische Funktionen einnehmen können, aktiviert und unterstützt. Dabei bleibt nach jeder abgelaufenen Immunreaktion ein „immunologisches Gedächtnis“ der aktivierten B-Zellen in Form von Plasmazellen zurück.

Dieses ist es möglich nach erneutem Kontakt mit dem gleichen Erreger sofort eine spezifisch auf das Antigen gerichtete Produktion von Antikörpern zu starten, ohne dabei eine Aktivierung durch T-Zellen zu benötigen (Rassow, Hauser et al. 2016).

I.4 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten werden ursprünglich im Knochenmark gebildet, erhalten jedoch ihre Prägung und Reifung in dem für ihre Namensgebung verantwortlichen Thymus. Sie entstammen dabei der gleichen lymphoiden Stammzelle wie die B- und NK-Zellen. Während ihrer Reifung im Thymus beginnen die T-Zellen ihren charakteristischen, antigen-erkennenden T-Zell-Rezeptor zu exprimieren. Dies geschieht, wie bei den B-Zellen die Bildung neuer Antikörper, durch somatische Rekombination. Die einzelnen Abschnitte der für den T-Zell-Rezeptor kodierenden DNA werden dabei, angeregt durch das die Zellen umgebende Thymusgewebe, zufällig neu angeordnet. In einem ersten Schritt findet eine sogenannte positive Selektion statt: Ausschließlich T-Zellen, welche mit Ihren exprimierten T-Zell-Rezeptoren an MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Proteinen der kortikalen Epithelzellen des Thymusgewebes binden können, überleben diesen Schritt. Alle weiteren T-Lymphozyten werden durch Aktivierung der Apoptose, den programmierten Zelltod, aussortiert. Makrophagen und dendritische Zellen präsentieren zudem im Thymusgewebe körpereigene Proteine. In einem nächsten Schritt werden nun durch negative Selektion all jene T-Zellen vernichtet, welche mit Ihrem T-Zell-Rezeptor Proteine erkennen, die im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert werden. Auf diese Art und Weise werden naive T-Zellen mit einem funktionstüchtigen und zugleich autotoleranten T-Zell-Rezeptor in die Peripherie entlassen. Die T-Lymphozyten werden dabei in zwei Klassen, bestimmt nach ihren gebildeten Oberflächenproteinen, eingeteilt. Dabei handelt es sich um CD4 positive (CD4+) und CD8 positive (CD8+) T-Zellen (Rassow, Hauser et al. 2016).

I.5 CD4+ T-Lymphozyten

Die Klasse der CD4+ T-Lymphozyten zeigt Subgruppierungen auf und kann in die nativen T_H0 -, die T_H1 -, T_H2 -, T_H9 -, T_H17 - sowie die regulatorischen T_{reg} -Zellen eingeteilt werden (Pennock, White et al. 2013). Die CD4+ T-Helferzellen werden dabei nicht direkt durch bestimmte Antigene aktiviert, sondern bekommen durch antigenpräsentierende Zellen (APC) Peptidfragmente von zuvor phagozytierten und prozessierten Erregern über MHC-II-Komplexe präsentiert und erkennen diese mit ihrem spezifischen T-Zellrezeptor (Rassow, Hauser et al. 2016). Die Polarisierung der ursprünglich ruhenden T_H0 -

Zellen hängt dabei unter anderem von den stimulatorischen Effekten bestimmter Zytokine ab. Unter dem Einfluss von Interferon(INF)- α , - β und IL-12, welche bei einer Infektion mit intrazellulären Erregern sezerniert werden, kommt es in der nativen T_{H0}-Zelle durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet zur Polarisierung zur T_{H1}-Zelle (Szabo, Kim et al. 2000; Mullen, High et al. 2001). Diese T_{H1}-Zellen ihrerseits schütten Zytokine wie TNF α und IFN- γ aus, um durch diese weitere Zellen wie die Makrophagen zu aktivieren (Pennock, White et al. 2013). Unter dem Einfluss von IL-4, welches von Zellen des angeborenen Immunsystems als Antwort auf parasitäre Infektionen gebildet wird (Taylor-Robinson, Phillips et al. 1993), kommt es hingegen durch die Vermittlung des Transkriptionsfaktors GATA3 (Yagi, Zhu et al. 2011) zur Polarisierung zu T_{H2}-Zellen (Fields, Kim et al. 2002). Diese sind in der Lage IL-4, -5 und -13 auszuschütten, wodurch es ihnen möglich ist, Zellen wie die basophilen oder eosinophilen Granulozyten zu aktivieren (Taylor-Robinson, Phillips 1992). Werden T_{H0}-Zellen neben dem bereits erwähnten IL-4 mit dem *transforming growth factor* (TGF)- β stimuliert, bilden sie eine weitere Subgruppe der CD4+ T-Lymphozyten aus: die T_{H9}-Zellen (Veldhoen, Uyttenhove et al. 2008). Diese sind in der Lage durch die Bildung von IL-9 (Goswami, Kaplan 2011) Mastzellen zu rekrutieren (Pennock, White et al. 2013). Wenn naive T_{H0}-Zellen der Wirkung von TGF- β und IL-6 ausgesetzt sind, welche vom angeborenen Immunsystem als Reaktion auf extrazelluläre Bakterien ausgeschüttet werden, und zusätzlich eine Stimulation durch IL-21 und -23 erfahren, werden diese zu T_{H17}-Zellen polarisiert (Mangan, Harrington et al. 2006). Dieser Polarisierung erfolgt dabei durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t (Ivanov, McKenzie et al. 2006). Das von diesen Zellen sezernierte, namensgebende IL-17 führt zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Pennock, White et al. 2013). Die Aufgabe der T_{reg}-Zellen ist es, in erster Linie die Immunreaktion zu regulieren und wenn nötig, einzubremsen (Kuniyasu, Takahashi et al. 2000). Sie können entweder direkt aus dem Thymus als solche entlassen werden oder durch die Wirkung von TGF- β und Retinsäure aus polarisierten T_{H0}-Zellen entstehen (Chen, Jin et al. 2003). Diese wiederum sind selbst in der Lage TGF- β oder IL-10 auszuschütten (Pennock, White et al. 2013). Eine Übersicht über die verschiedenen Subpopulationen der CD4+ T-Lymphozyten zeigt folgende Grafik (Abbildung 1):

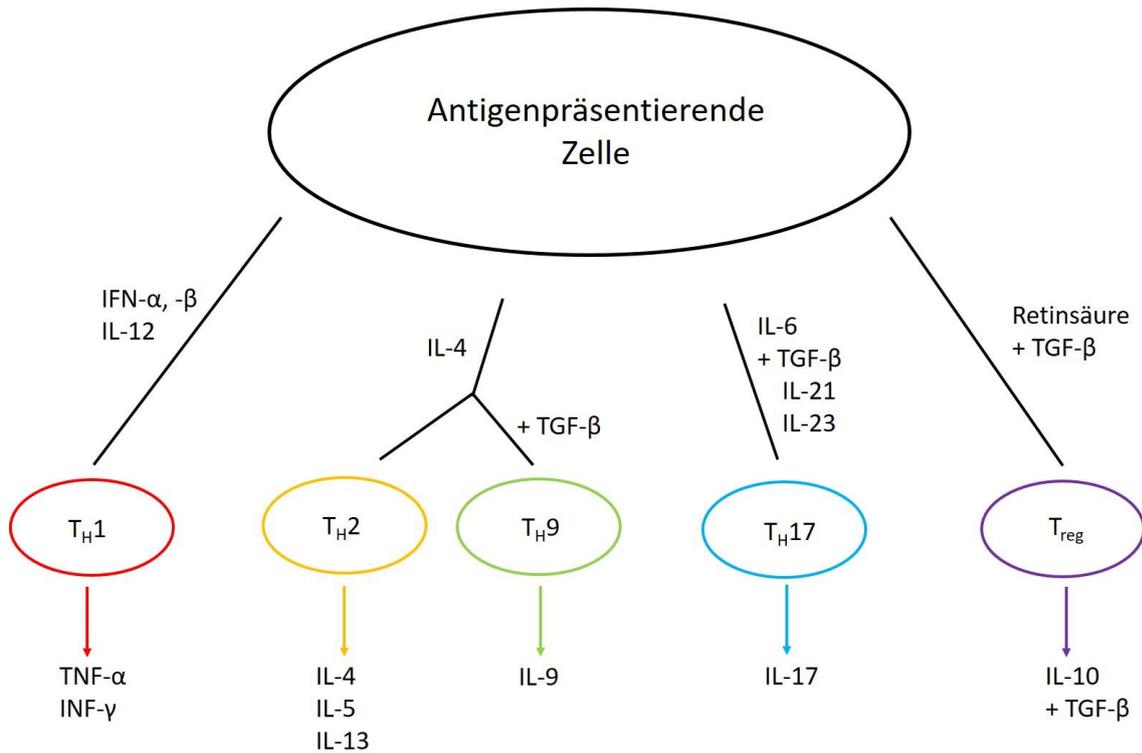


Abbildung 1: Bildliche Darstellung der Polarisierung CD4+ T-Lymphozyten.

Die Polarisierung der naiven CD4+ T-Lymphozyten hängt neben der Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen von den einwirkenden, sie umgebenden Zytokinen ab. Unter dem Einfluss von $IFN-\alpha, -\beta$ und $IL-12$ bilden sich $TNF\alpha$ und $INF-\gamma$ produzierende $TH1$ -Zellen aus. Die Stimulation durch $IL-4$ und gegebenenfalls zusätzlich durch $TGF-\beta$ führt zu einer Polarisierung zu $TH2$ - beziehungsweise $TH9$ -Zellen, welche $IL-4$, $IL-5$, $IL-13$, oder aber $IL-9$ sezernieren. Die Wirkung von $IL-6$, gepaart mit der von $TGF-\beta$, $IL-21$ und -23 führt zu einer Polarisierung zu einer $IL-17$ produzierenden $TH17$ -Zelle. Die regulatorischen $Treg$ -Zellen werden unter der Wirkung von Retinsäure und $TGF-\beta$ gebildet. Sie nehmen über die Zytokine $IL-10$ und $TGF-\beta$ Einfluss auf die Immunreaktion. (modifiziert aus Pennock et. al., Adv Physiol Educ., December 2013 (Pennock, White et al. 2013))

Dieses fein abgestimmte Immunsystem mit seinen Subgruppierungen kann bei einer Fehlregulation direkte Effekte auf den eigenen Organismus haben. Als ein Beispiel seien an dieser Stelle die Multiple Sklerose (MS) beziehungsweise deren experimentellen Tiermodell, die *Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis* (EAE), genannt. So konnte nachgewiesen werden, dass Mäuse, die nicht in der Lage waren $IL-17$ zu produzieren, bei einer ausgelösten EAE mildere Symptome, einen späteren Beginn der Krankheit und eine schnellere Erholung aufwiesen (Komiyama, Nakae et al. 2006). Dazu passend wurden bei MS-Patienten eine erhöhte Anzahl $IL-17$ mRNA exprimierender, mononukleärer Zellen im Blut und Liquor gefunden. Zusätzlich war die Zahl dieser Zellen im Falle einer klinischen Exazerbation der Erkrankung im Blut erhöht (Matusevicius, Kivisakk et al. 1999). Dieses Beispiel kann dabei jedoch nicht die gesamte Komplexität der noch nicht abschließend geklärten Pathogenese der MS erfassen und soll lediglich als ein exemplarischer Teilaspekt dieser betrachtet werden.

CD8+, oder auch zytotoxisch genannte, T-Zellen haben die Aufgabe körpereigene Zellen, welche durch intrazelluläre, häufig virale, Erreger infiziert wurden zu erkennen und zu eliminieren. Die Erkennung solcher infizierten Zellen geschieht durch die von allen kernhaltigen Zellen exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle. Über diese Moleküle werden Proteine der intrazellulären Erreger an der Zelloberfläche jener Zellen präsentiert. Über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor können CD8+ T-Lymphozyten diese körperfremden Fragmente erkennen ohne dabei eine autoimmune Reaktion auszulösen, da autoreaktive T-Zellen zuvor während ihrer Reifung im Thymus eliminiert wurden. Erkennt eine CD8+ T-Zelle eine solche infizierte Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor, schüttet sie entweder Perforine und Granzyme aus oder exponiert den Fas Liganden (FasL), welcher dazu führt, dass in der Zielzelle der Vorgang der Apoptose initiiert wird. Ebenso können auf diese Weise Tumor- oder transplantierte Zellen erkannt und in den programmierten Zelltod geführt werden (Rassow, Hauser et al. 2016). Die CD8+ T-Lymphozyten werden an dieser Stelle der Vollständigkeit wegen erwähnt und nicht näher diskutiert.

1.6 Zellapoptose

In jedem lebenden, mehrzelligen Organismus gibt es einen ständigen *turn over* von alten Körperzellen, welche im Rahmen der Teilung von Vorläuferzellen durch neue Zellen ersetzt werden und so dem Körper die Möglichkeit der Regeneration geben. Dieser Zyklus der Zellteilung kann in folgende Phasen eingeteilt werden: die G1-, S-, G2- und M-Phase. Zellen, die sich im Ruhezustand bei aktiver Stoffwechsellage befinden, werden der G0-Phase zugeordnet. Die G1-Phase ist geprägt von der Synthese von Proteinen, die für die Durchführung der Mitose benötigt werden, während in der S-Phase das Genom der Zelle dupliziert wird. In der sich anschließenden G2-Phase werden die letzten Schritte vor der eigentlichen Mitose, der M-Phase, vorbereitet. Nach erfolgter Teilung können die Zellen in die ruhende G0-Phase gehen oder erneut den Zyklus durchlaufen. Dabei gibt es in diesem Zellzyklus mehrere Kontrollpunkte, sogenannte Restriktionspunkte. Diese können nur bei Erfüllung bestimmter Kriterien durchlaufen werden und stellen sicher, dass der Vorgang der Mitose fehlerfrei ablaufen kann. Besonders die makellose Replikation der Zell-Desoxyribonukleinsäure (*engl.* DNA) steht im Fokus der Kontrolle, da Fehler in der Basenfolge dieser, entstanden durch exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung oder endogen im Rahmen der Replikation, zum Beispiel zu der Entstehung einer entarteten Tumorzelle führen können. DNA-Reparaturmechanismen sind dabei in der Lage kleinere DNA-Schäden zu korrigieren. Ist dies jedoch nicht möglich, wird die betroffene Zelle über den Zelltod eliminiert. Dieser programmierte, gewollte Zelluntergang wird als Apoptose bezeichnet. Dabei kann die Zelle ihr Todessignal über

folgende zwei Wege erhalten: einen intrinsischen, aus der Zelle selbst aktivierten oder einen extrinsischen, über Zellrezeptoren vermittelten, Weg (Rassow, Hauser et al. 2016).

Der intrinsische Befehl zum Zelluntergang wird in erster Linie über die Mitochondrien der Zelle vermittelt. Durch intrazelluläre Schädigungen, wie die oben genannten DNA-Schäden oder oxidativen Stress, wird das Gleichgewicht zwischen dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 und den pro-apoptotischen Proteinen, wie Bax, Bak und Bid, welche sich in der mitochondrialen Membran befinden, zu Gunsten der apoptoseauslösenden Proteine gestört. Dies geschieht durch proteolytische Aktivierung von Bid oder gesteigerter Expression von Bax. Es folgt eine durch Proteinkomplexbildung der pro-apoptotischen Proteine geförderte Porenbildung, die ihrerseits zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung von apoptosefördernden Proteinen, wie zum Beispiel Cytochrom c, in das Zytoplasma führt. Diese Signalkaskade vermittelt letzten Endes durch die Bildung von Apoptosomen, bestehend aus Cytochrom c und *apoptotic peptidase activating factor-1* (Apaf-1), eine Aktivierung von *cysteine-dependent aspartate-specific protease* (Caspase) 9. Diese liegt vor der proteolytischen Aktivierung, wie alle anderen Caspasen auch, in ihrer inaktiven Form als sogenannte Pro-caspase im Zytoplasma vor. Die aktivierte Caspase 9 ist daraufhin selbst in der Lage die Pro-Caspase 3 proteolytisch zu spalten und setzt somit eine kaskadenartige Aktivierung weiterer Pro-caspasen in Gang. Die Caspasen-Gruppe der Proteasen spielt dabei in der Vermittlung der Apoptose eine Schlüsselrolle. So kommt es über ihre Aktivierungen schließlich zur Wirkung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7, zu deren Substraten unter anderem das Zytoskelett der Zelle sowie Inhibitoren der zellulären Endonukleasen gehören. Es folgen ein systematischer Abbau und eine Fragmentierung der Zelle, deren Reste durch die phagozytäre Funktion der Makrophagen beseitigt wird (Rassow, Hauser et al. 2016).

Zusätzlich zum intrinsischen Aktivierungsweg gibt es einen ergänzenden extrinsischen Weg, der durch rezeptorvermittelte Signalkaskaden ausgelöst wird. Die sogenannten Todesrezeptoren zählen zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor(TNFR)-Superfamilie und wurden zum Beispiel wie folgt benannt: TNFR1 und -2, Fas-Rezeptor (FasR) oder *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL)-Rezeptor. Diese Rezeptoren werden durch ihre zugehörigen Liganden, welche von umgebenden Zellen als Antwort auf bestimmte Reize produziert werden, stimuliert (Rassow, Hauser et al. 2016). Anschließend kommt es, abgesehen von der Stimulierung des TNFR2 (Aggarwal 2003), über eine Proteinkomplexbildung zur Spaltung und Aktivierung der Pro-Caspase 8. Analog zur intrinsisch aktivierten Caspase 9 führt die gesteigerte Aktivität von Caspase 8 zu

einer proteolytischen Spaltung der Pro-Caspasen 3, 6 und 7 zu ihren aktiven Formen und deren Eigenschaften als Effektorcaspasen. Dabei arbeiten der extrinsische und intrinsische Weg nicht unabhängig voneinander. So führt Caspase 8 zu einer Aktivierung von Bid, dem pro-apoptotischen Protein und Bestandteil des intrinsischen Apoptosewegs und somit zu einer Verstärkung des Apoptosesignals (Abbildung 2) (Rassow, Hauser et al. 2016).

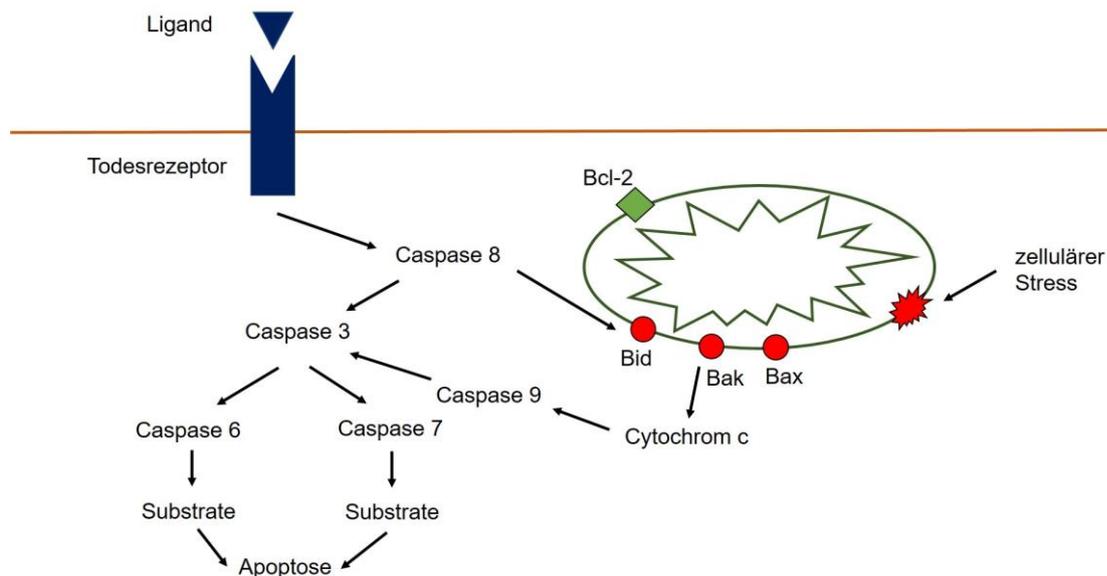


Abbildung 2: Schematische Darstellung der intrazellulären Apoptose-Signalkaskaden.

Wird ein Todesrezeptor, wie zum Beispiel FasR oder TNFR1, einer Zelle mit seinem Liganden stimuliert, wird das extrinsische Apoptosesignal ausgelöst. Es kommt zu einer Spaltung und Aktivierung von Pro-Caspase 8, die ihrerseits wiederum *downstream* Caspasen aktiviert bis letzten Endes die eigentlichen Effektorcaspasen ihre Substrate (Endonukleasen, Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren) rekrutieren und folglich die eigentliche Apoptose in Gang setzen. Kommt es zu zellulärem Stress, wird der intrinsische Apoptoseweg ausgelöst. Dabei wird das Gleichgewicht der pro- (Bid, Bak, Bax) und anti-apoptotischen (Bcl-2) Proteine zu Gunsten der Ersteren verschoben. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c, das in einem Komplex (Apoptosom) die Pro-Caspase 9 aktiviert, die sich direkt *upstream* von Caspase 3 befindet. Dabei gibt es eine Querverbindung zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Weg durch die Aktivierung von Bid durch Caspase 8. (modifiziert aus Rassow et. Al, Duale Reihe: Biochemie, 4. Auflage, 2016 (Rassow, Hauser et al. 2016))

Nicht zu verwechseln mit der Apoptose ist dabei die Zellnekrose, unter welcher man die unstrukturierte Zellstörung durch von außen wirkende Noxen versteht, welche im Gegensatz zur Apoptose durch den Austritt des Zellinhaltes in die extrazelluläre Umgebung eine Entzündungsreaktion mit sich bringt (Rassow, Hauser et al. 2016). Ebenfalls soll an dieser Stelle die Nekroptose erwähnt werden, deren Mechanismus erst vor wenigen Jahren entdeckt und weiter charakterisiert wurde. Es handelt sich dabei um eine durch die Zelle kontrolliert ausgelöste Nekrose mit Freisetzung des Zellinhaltes, die unter anderem von Caspase 8 aktiv gehemmt wird (Kaczmarek, Vandenabeele et al. 2013). Die Nekroptose scheint dabei unter anderem eine Rolle bei Entzündungsreaktionen gegen pathogene Erreger einzunehmen (Ting, Bertrand 2016).

I.7 Apoptoseregulierung in T-Lymphozyten

Die Apoptose bei T-Lymphozyten wird über zwei Wege vermittelt. Zum einen findet die Apoptoseaktivierung antigengesteuert über die Vermittlung der sogenannten *death* Zytokine, vor allem über FasL (Dhein, Walczak et al. 1995) und TNF α (Zheng, Fisher et al. 1995), welche an ihre spezifischen Rezeptoren binden, im Zusammenspiel mit dem stimulierten T-Zell-Rezeptor statt (Lenardo 1991). Bei der zweiten Möglichkeit handelt es sich um eine passive Initiierung des programmierten Zelltodes durch den Entzug von für die Zelle überlebenswichtiger Lymphokine, von denen als Hauptvertreter IL-2 zu nennen ist (Duke, Cohen 1986). Dieser Lymphokinentzug führt zu einer zytoplasmatischen Caspasenspaltung und nutzt somit den intrinsischen Apoptoseweg (Deng, Podack 1993; Tamura, Katsumata et al. 1996). IL-2 spielt dabei in beiden Arten, der rezeptor- sowie der lymphokinentzugvermittelten Apoptose, eine tragende Rolle. Dabei wird davon ausgegangen das T-Zellen im Allgemeinen resistent gegenüber möglicher apoptoseauslösender Faktoren sind (Zheng, Fisher et al. 1995; Tucek-Szabo, Andjelic et al. 1996). Ausgenommen davon ist der Zeitpunkt, an dem sich die T-Lymphozyten gerade im wiederholten Zellzyklus und somit in einer starken, durch eine Antigenstimulation ausgelösten Proliferationsphase befinden (Russell, White et al. 1991). So scheint die Apoptose-sensibilität mit der Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen anzusteigen (Boehme, Lenardo 1993). Das von den T-Lymphozyten auf Antigenkontakt selbst produzierte IL-2 übernimmt hierbei zwei Funktionen: Einerseits wirkt es proliferativ auf die Zellen (Lenardo, Boehme et al. 1995), während es andererseits ihre Apoptosensibilität fördert (Lenardo 1991). Letzteres scheint über eine vermehrte Transkription der Gene für TNF α und FasL durch Aktivierung des TCR nach Stimulation durch IL-2 vermittelt zu werden (Zheng, Trageser et al. 1998). Es ergibt sich schließlich folgende Regulation der T-Zell-Apoptose/Proliferation im Sinne eines Feedback-Mechanismus (Abbildung 3): T-Lymphozyten, welche über ihren TCR mit einem Antigen stimuliert wurden beginnen mit einer vermehrten Produktion von IL-2 und starten so in mehrere Zellzyklen, die zu einer Zellproliferation und somit einer Immunantwort führen. Gleichzeitig führt die IL-2-Stimulation zu einer vermehrten aktiven Apoptosensibilität, so dass eine überschießende Immunantwort eingebremst wird. Kommt es schließlich zur Elimination einer bestehenden Infektion durch das Immunsystem und somit zur Beendigung der Antigenstimulation, wird auch die Immunreaktion durch den Zytokinentzug, das heißt der fallenden IL-2 Konzentration, beendet. Es kommt zur passiven Apoptose, welche über den intrinsischen, mitochondrialen Weg vermittelt wird (Lenardo, Chan et al. 1999). Ein kleiner Anteil der Zellen kann sich dieser dargestellten Apoptose entziehen und bleibt auf diese Weise als

sogenannte Gedächtniszellen zurück. Bei erneutem Kontakt mit gleichem Antigen können diese eine schnelle Immunantwort auslösen (Kaech, Wherry et al. 2002; Sprent, Surh 2002).

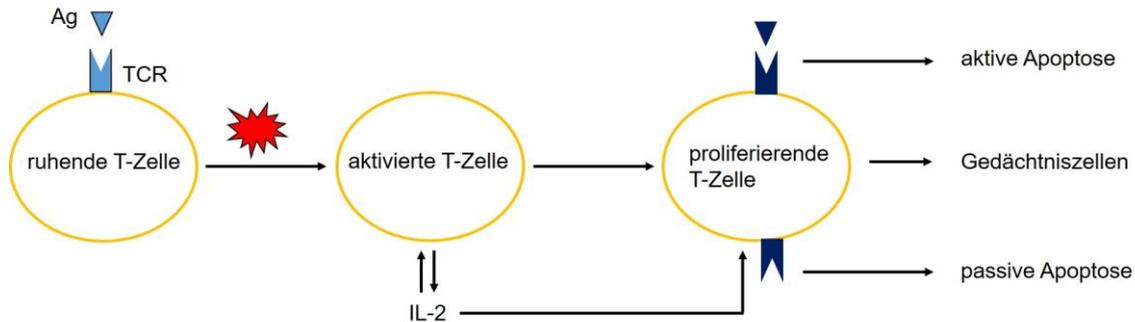


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Feedback-Mechanismus bei der Apoptose von T-Lymphozyten.

Nachdem die T-Zelle über ihren TCR mit dem bekannten Antigen stimuliert wurde, geht sie in ihren aktivierten Zustand über und beginnt mit der Produktion von IL-2. Das freigesetzte IL-2 wirkt auto- sowie parakrin und führt dazu, dass die T-Zelle in die Zellteilung übergeht und es zu einer Immunantwort kommt. Bleibt der Stimulus über das Antigen vorhanden, geht die T-Zelle, sensibilisiert durch das IL-2, schließlich in die aktive Apoptose über, vermittelt durch Zytokine wie FasL oder TNF- α . Sinkt die, die T-Zelle umgebende, IL-2 Konzentration, geht die Zelle hingegen in die zytokinenzugvermittelte, passive Apoptose. Ein Teil der T-Zellen entzieht sich dieser Apoptose und bleibt als Gedächtniszellen erhalten. (modifiziert nach Lenardo, Chan et al., Annu. Rev. Immunol., 1999 (Lenardo, Chan et al. 1999)).

Zur erwähnen sei hierbei, dass auch weitere Zytokine wie IL-4, -7 und -15 eine Rolle bei der passiven Apoptose spielen; IL-2 nimmt diesbezüglich jedoch die größte Stellung ein (Kung, Beller et al. 1998). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass in T-Zellen, welche einer IL-2 Stimulation ausgesetzt wurden, die intrazelluläre Konzentration an *Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein* (cFlip), das als ein Inhibitor von Caspase 8 bekannt ist (Safa 2012), abnahm (Irmiler, Thome et al. 1997). Dies deutet auf einen weiteren Mechanismus hin, über welchen IL-2 die Apoptose in T-Lymphozyten fördern kann. Befinden sich die T-Zellen jedoch in einem ruhenden Zustand wird eine mögliche Apoptose vor allem über das Protein Bcl-2, welches in der äußeren mitochondrialen Membran verankert ist, effektiv gehemmt (Lenardo, Chan et al. 1999). Zusätzlich kann es durch die Stimulation des TNFR1 durch TNF α zu einer Aktivierung des Signalweges von NF- κ B kommen, der ebenfalls eine anti-apoptotische und zellproliferative Wirkung auf die Zelle hat (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003; Scheidereit 2006; Hayden, Ghosh 2008). Auf diesen Signalweg wird an einer späteren Stelle dieser Arbeit spezifischer eingegangen. Die Apoptose der CD4+ T-Lymphozyten ist dabei nicht nur durch den Einfluss umgebender Zytokine oder Stimulationen durch Antigene reguliert. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung immortalisierter CD4+ T-Lymphozyten (Jurkat-Zellen) an Kollagen durch das Integrin α 2 β 1 zu einem erhöhten Zellüberleben in der

Abwesenheit von Wachstumsfaktoren führten. Zudem kam es durch die Bindung an Kollagen zu einer erhöhten Aktivität der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKs) p38 und *extracellular-signal regulated kinase* (ERK). Es war jedoch lediglich ERK für dieses kollagen-induzierte Zellüberleben der CD4⁺ T-Lymphozyten verantwortlich (Naci, Aoudjit 2014).

I.8 TNF α und seine Rezeptoren

Bei TNF α handelt es sich um einen der vermutlich meist untersuchten Entzündungsmediatoren, dessen Bedeutung sich in seinen pleiotropen Funktionen widerspiegelt. So nimmt es eine bedeutende Rolle im Bereich der Immunologie, Entzündung, Zelldifferenzierung sowie in der Entscheidung der Zelle über Proliferation oder Apoptose ein (Ashkenazi, Dixit 1998; Wallach, Varfolomeev et al. 1999). Jedoch bleiben viele Details seiner Wirkmechanismen bisher unbekannt. Dies zeigte sich eindrucksvoll als die hoffnungsvoll gestarteten Versuche, die demyelinisierende Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose mit gegen TNF α gerichtete Antikörper zu behandeln, aufgrund der Exazerbation der Symptome der Patienten nach Einnahme der Medikation abgebrochen werden mussten (van Oosten, Barkhof et al. 1996). Das in einer membrangebundenen oder einer löslichen Form vorliegende TNF α (Kriegler, Perez et al. 1988) bildet Homotrimere (Tang, Hung et al. 1996). Der genaue Wirkmechanismus, der zu dieser Bildung der Homotrimere führt, bleibt bisher jedoch ungeklärt. Die gebundene Form des TNF α kann zudem durch die Metalloprotease *TNF α Converting Enzyme* (TACE) in die lösliche Form überführt werden (Black, Rauch et al. 1997) und ist, wie bereits genannt, Teil der TNF-Superfamilie, zu deren weiteren Mitgliedern zum Beispiel FasL und TRAIL gehören (Rassow, Hauser et al. 2016). Zu seinen apoptoseauslösenden Todesrezeptoren werden unter anderen TNFR1, FasR, TRAMP, TRAIL-R1 und -R2 gezählt. Sie alle teilen sich nicht nur eine für sie typische cysteinreiche Domäne (CRD), welche für die Ligandenspezifität verantwortlich ist (Bodmer, Schneider et al. 2002), sondern auch einen Bereich von 60 - 70 Aminosäuren, der für die Auslösung der Apoptose eine tragende Rolle spielt und als *death domain* (DD) bezeichnet wird (Ashkenazi, Dixit 1998). Ausgenommen davon ist jedoch der TNFR2, der aufgrund seiner fehlenden DD nicht in der Lage ist durch seinen vermittelten Stimulus direkt Apoptose auszulösen (Aggarwal 2003; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003).

I.9 Der TNF-Rezeptor 1 und seine Signalkaskade

Der auf eukaryontischen Zellen ubiquitär vorkommende TNFR1, welcher neben dem TNFR2 als einer der wichtigsten Rezeptoren für TNF α dient, besitzt, wie bereits genannt, entgegengesetzte Eigenschaften: Zum einen löst er als *death* Rezeptor in einigen Zellen die Apoptose aus, zum anderen führt er über eine Aktivierung von NF- κ B zur Zellproliferation (Aggarwal 2003; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Der Mechanismus, auf dessen Basis die Entscheidung über den einen oder den anderen Weg getroffen wird, ist dabei bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Zusätzlich ist der TNFR1 in der Lage, die MAPKs *c-Jun N-terminale kinase* (JNK) und p38 zu aktivieren, denen eine Rolle in der Zelldifferenzierung und eine pro- sowie antiapoptotische Funktion zugeschrieben werden kann (Yuasa, Ohno et al. 1998; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Nach der Stimulation mit TNF α konnte beobachtet werden, dass sich am TNFR1 ein sogenannter Komplex I bildet (Micheau, Tschopp 2003): Im Anschluss an die Stimulierung des Rezeptors folgte eine Rekrutierung des die DD enthaltenden Adaptormoleküls *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD). Diesem schließt sich die ebenfalls eine DD enthaltende Rezeptor-interagierende Serin-Threonin-Protein-kinase-1 (RIP1) an (Ashkenazi, Dixit 1998; Chen, Goeddel 2002). Diese Assemblierung wird benötigt, um letzten Endes den genannten Komplex I zusammen mit *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2) und *cellular inhibitor of apoptosis protein* (cIAP)-1 und -2 zu bilden. Dieser ist dabei in der Lage einen proliferationsfördernden NF- κ B-Signalweg zu aktivieren (Baud, Karin 2001). Dies geschieht über die Rekrutierung des *inhibitor of kappa* (I κ B)-Kinase(IKK)-Komplexes (Zhang, Kovalenko et al. 2000), der über eine Phosphorylierung von I κ B α die Inhibition von NF- κ B durch dieses aufhebt (Karin 1999). Es konnte gezeigt werden, dass IKK γ (syn. NEMO), das Teil des IKK-Komplexes ist (Yamaoka, Courtois et al. 1998), in Jurkat-Zellen nicht nur zur Aktivierung von NF- κ B führt, sondern ebenfalls die Interaktion von RIP1 und Caspase 8 inhibiert. Auf diesem Weg findet eine zusätzliche Inhibition der Apoptose in Jurkat-Zellen statt (Legarda-Addison, Hase et al. 2009). Neuere Untersuchungen zeigten zudem, dass RIP1 neben weiteren Komponenten des Komplexes I eine Polyubiquitinierung durch die cIAPs (Park, Yoon et al. 2004) und den *linear ubiquitination assembly complex* (LUBAC) (Draber, Kupka et al. 2015) erfährt, die der Rekrutierung des IKK-Komplexes neben weiteren Proteinen dient (Haas, Emmerich et al. 2009). Diese Polyubiquitinierung wird ebenfalls für die Aktivierung von p38 und JNK durch die Vermittlung von *TGF β -activated kinase 1 and MAP3k7-binding protein* (TAB) 2 und 3 (Kanayama, Seth et al. 2004) über TGF β -activated kinase 1 (TAK1) (Wang, Deng et al. 2001) benötigt (Ting, Bertrand 2016).

Im weiteren Verlauf unterliegt der Rezeptorkomplex einer Endozytose in sogenannten *clathrin-coated pits*, die - entgegen der ursprünglichen Annahme - das Rezeptorsignal nicht beendet, sondern modifiziert (McPherson, Kay et al. 2001). Ein Modell sieht nun im zeitlichen Verlauf eine Dissoziation der Proteine TRADD, RIP1 und TRAF2 vom TNFR1 unter der Rekrutierung von FADD und Caspase 8 als den apoptoseauslösenden Komplex II, ohne Einbeziehung des ursprünglichen Rezeptors, der daraufhin in der Lage ist Pro-Caspase 8 sowie Pro-Caspase 10 zu spalten und zu aktivieren (Micheau, Tschopp 2003). Eine davon abweichende Modellvorstellung zeigt, dass eine nach der TNF α Stimulation durchgeführte Temperaturerhöhung den Komplex I ebenfalls zur Endozytose und Bildung des Komplexes II fördert, wobei dieser jedoch in diesem Fall den TNFR1 in seinem Komplex inkludiert (Abbildung 4) (Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Vermittelt wird die durch TNF α initiierte Apoptose durch EVER2, das mit TRADD interagiert und somit die Rekrutierung von TRAF2 und RIP1 beeinträchtigt (Gaud, Guillemot et al. 2013).

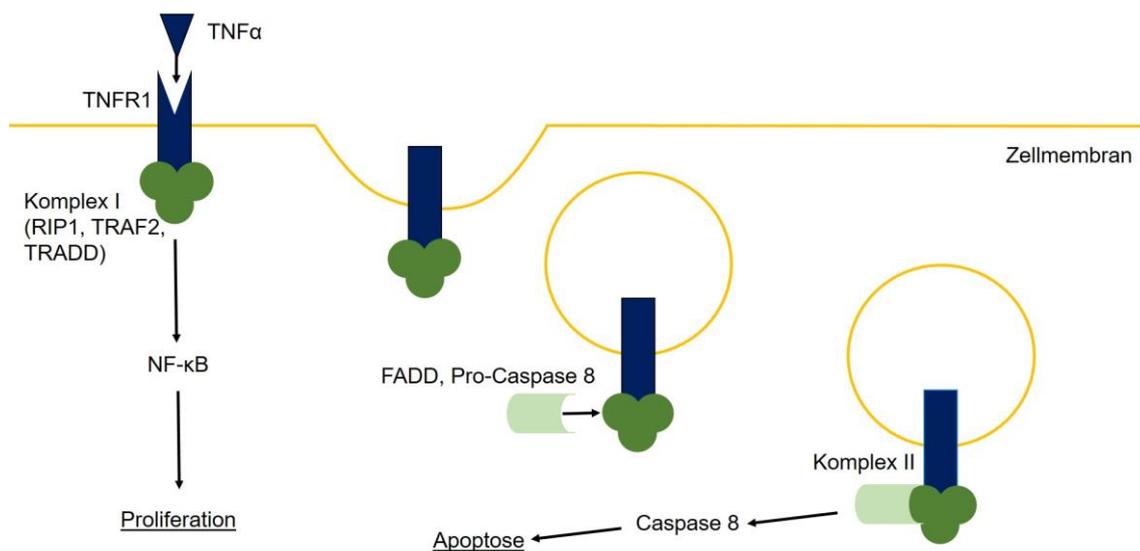


Abbildung 4: Schematisch vereinfachte Darstellung des TNFR1-Signalwegs.

Nachdem der TNFR1 durch TNF α stimuliert wurde aktiviert der am Rezeptor gebundene Komplex I, unter anderem bestehend aus TNFR1, RIP1, TRAF2 und TRADD, den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dieser ist für die Transkription proliferationsfördernder Gene der Zelle verantwortlich. Wird der Rezeptor durch Endozytose internalisiert kommt es durch Rekrutierung von FADD und Pro-Caspase 8 zur Bildung des Komplexes II. Dieser spaltet und aktiviert Pro-Caspase 8, die daraufhin die apoptotische Signalkaskade und die Durchführung des Zelltods in Gang setzt. (modifiziert nach Schutze, Tchikov et. al., Nat Rev Mol Cell Bio 9, 2008 (Schutze, Tchikov et al. 2008))

Aktiv gehemmt wird solch ein Apoptosesignal durch cFlip und cIAP-1, welche beide wiederum einer NF- κ B-abhängigen Transkription unterliegen (Micheau, Lens et al. 2001).

Eine durch den Mechanismus der Nekroptose erweitertes Bild geht davon aus, dass sich der Komplex II in weitere Typen unterscheiden lässt, wie die Komplexe IIa und IIb (Kalilias, Ivashkiv 2015). So führt eine Deubiquitinierung von RIP1 durch cylindromatosis

(CYLD) zu einer Dissoziation von RIP1 vom ursprünglichen Komplex I (Wang, Du et al. 2008). Das freie, deubiquitinierte RIP1 fördert nun die Komplexbildung aus TRADD, FADD, einem homodimer bestehend aus Pro-Caspase 8 und einem heterodimer bestehend aus Pro-Caspase 8 und cFLIP_L, einer Isoform von cFLIP. Dieser sogenannte Komplex IIa spaltet und inaktiviert über cFLIP_L RIP1 und führt zu einer autokatalytischen Aktivierung von Pro-Caspase 8 zu Caspase 8, um somit die extrinsische Apoptose einzuleiten (Brenner, Blaser et al. 2015). Werden cIAP1 und -2 jedoch von dem aus dem im Rahmen der intrinsischen Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzten *second mitochondria-derived activator of caspases* (SMAC) abgebaut (Du, Fang et al. 2000), folgt daraus eine verminderte Ubiquitinyierung von RIP1 (Bertrand, Milutinovic et al. 2008). Dieses nicht-ubiquitinierte RIP1 formt einen Komplex inklusive RIP3, Pro-Caspase 8 und cFLIP_L, jedoch exklusive TRADD, welcher als Komplex IIb bezeichnet wird (Brenner, Blaser et al. 2015; Wang, Du et al. 2008). Die Heterodimerbildung bestehend aus Pro-Caspase 8 und cFLIP_L ist analog zum Komplex IIa notwendig, um eine Inaktivierung von RIP1 und RIP3 durchzuführen und eine autokatalytische Aktivierung von Pro-Caspase 8 einzuleiten (Dillon, Oberst et al. 2012; Oberst, Dillon et al. 2011; Pop, Oberst et al. 2011). Bildet cFLIP_s, bei welchem es sich ebenfalls um eine Isoform von cFlip handelt, ein Heterodimer mit Pro-Caspase 8, ist dieses im Gegensatz dazu nicht in der Lage RIP1 und -3 zu spalten und zu inaktivieren (Feoktistova, Geserick et al. 2011; Kavuri, Geserick et al. 2011). Es folgt über diesen, zum Teil auch Komplex IIc genannten, Komplex zu einer RIP3-abhängigen Aktivierung der Nekroptose in der stimulierten Zelle (Kalliolias, Ivashkiv 2015). Der Übersicht wegen soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Komplex I als der proliferationssignalgebende und die Gesamtheit des Komplexes II als der zell-todsignalgebende Komplex betrachtet werden (Abbildung 4).

Zusätzlich zu den bereits genannten Signalwegen kann das Signal des TNFR1 durch sogenanntes *Rezeptorshedding* reguliert werden. Der Rezeptor wird hierzu durch Metalloproteasen, wie das bereits bei der Lösung von TNF α von der Zellmembran genannte TACE (ADAM17) (Black, Rauch et al. 1997), oder ADAM 8 (Bartsch, Wildeboer et al. 2010), proteolytisch gespalten und dadurch in das umgebende Medium entlassen. TACE wird unter anderem von ERK durch eine Phosphorylierung der Aminosäure Threonin (Thr735) reguliert (Diaz-Rodriguez, Montero et al. 2002) und beeinflusst auf diesen Weg die zelluläre Lokalisation von TACE (Soond, Everson et al. 2005). Es wurden jedoch auch Einflüsse der MAPK p38 auf die Regulation von TACE beobachtet (Fan, Derynck 1999; Weskamp, Schlondorff et al. 2004). So konnten Ogura et al. zeigen, dass das Acetoxycycloheximid (Ac-CHX)-abhängige *Shedding* des TNFR1 durch die Inhibition von p38 und die indirekte Inhibition von ERK durch die *upstream* gelegene *mitogen-*

activated protein kinase kinase (MAPKK) nahezu vollständig aufgehoben werden konnte (Ogura, Tsukumo et al. 2008). Das *Rezeptorshedding* findet dabei als Reaktion verschiedener Stimuli, wie zum Beispiel TNF α , bakterielle Lipopolysaccharide, IL-10 sowie nach Aktivierung von Neutrophilen oder T-Lymphozyten statt (Leeuwenberg, Dentener et al. 1994; Pedron, Girard et al. 2003). Die Funktion des *Sheddings* ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch könnte dieser Mechanismus dazu dienen, als Feedback nach einer vorangegangenen Rezeptorstimulation das Signal zu beenden, indem freies TNF α aus der Umgebung zu gebunden wird und somit nicht mehr als Ligand zur Verfügung steht und der Rezeptor selbst nicht mehr an der Signaltransduktion beteiligt werden kann. Dadurch könnte gleichermaßen auf die Aktivierungen von NF- κ B und Pro-Caspase 8 und auf diesem Wege auf die Zellproliferation und den Zelltod Einfluss genommen werden (Ogura, Tsukumo et al. 2008).

Der ebenfalls über TNF α stimulierbare TNFR2 wird an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Er ist überwiegend auf Zellen des Immunsystems zu finden und besitzt im Gegensatz zum TNFR1 keine DD. Es besteht Uneinigkeit darüber, ob er selbst in der Lage ist die Apoptose auszulösen (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Allerdings konnte durch alleinige Stimulation des Rezeptors mit Antikörpern der Zelltod in HeLa-Zellen, das heißt menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, ausgelöst werden (Bigda, Beletsky et al. 1994). Ebenso konnte eine Studie zeigen, dass die Aktivierung des TNFR2 zu einer gesteigerten Synthese von TNF α führt und folglich in der Lage ist den TNFR1 indirekt zu stimulieren (Grell, Zimmermann et al. 1999).

I.10 Mitogenaktivierte Proteinkinasen

Bei einem der durch TNF α aktivierten Signalwege, handelt es sich um den der MAPK p38 (Roulston, Reinhard et al. 1998). Zu der Familie der MAPK, bei welchen es sich um Protein-Serin/Threonin-Kinasen handelt, gehören neben bereits erwähnten p38 die weiteren Mitglieder ERK1 und 2, sowie JNK1, 2 und 3 (Liu, Guyton et al. 1996). Es handelt sich bei den durch MAP-Kinasen vermittelten Signalwegen in der Regel um Reaktion der Zelle auf externe Stimuli. Dabei kann es sich um zellulären Stress, chemischer sowie physikalischer Natur, äußere Signale durch Zytokine oder anderen wachstumsfördernden Stimuli handeln (Pearson, Robinson et al. 2001). Damit es zur Aktivierung der *upstream* der MAPK gelegenen MAPKK-Kinase kommt, benötigt es eine Phosphorylierung dieser. Diese Phosphorylierung kann zum Beispiel durch das zur Familie der G-Proteine gehörende Ras-Protein (Kolch 2000) oder wie im Beispiel von p38 durch den aktivierten

TNFR1 geschehen (Roulston, Reinhard et al. 1998). Die Kinasekaskade läuft anschließend entsprechend der Namensgebung, so dass die bereits erwähnte MAPKKK eine MAPKK und diese wiederum letzten Endes die eigentliche MAPK an einem Tyrosin- und Threoninrest phosphoryliert (Alberts 2002). Mit diesem letzten Schritt werden die MAPK als die eigentlichen Effektorinasen aktiviert (Brancho, Tanaka et al. 2003). Eine Regulation im Sinne eines Feedbackmechanismus findet auf der Ebene MAPK über dualspezifische Phosphatasen statt, welche zwei Phosphatbindungen ihres Substrates parallel hydrolysieren und damit die jeweilige MAPK in ihren inaktiven Zustand überführen (Farooq, Zhou 2004). Zu den Substraten der MAPK gehören schließlich weitere Proteinkinase aktivierten-Proteinkinase (MAPKAPK) 2 und 3 (Stokoe, Campbell et al. 1992; McLaughlin, Kumar et al. 1996). Ebenso können Transkriptionsfaktoren, über welche zelluläre Prozesse reguliert werden, wie im Beispiel des *cAMP response element binding* (CREB) Transkriptionsfaktors durch p38 aktiviert werden (Wilkinson, Millar 2000). Es konnte gezeigt werden, dass ein *knockdown* von CREB in Jurkat-Zellen durch shRNA (*small hairpin ribonucleic acid*) das Wachstum der Zellen stark reduzierte. Die Jurkat-Zellen befanden sich vermehrt in der apoptotischen G0/G1-Phase und es konnte nach 144 h eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (van der Sligte, Kampen et al. 2015).

I.11 p38 als downstream target des TNFR1

P38, welches auch im Fokus dieser Arbeit steht, wird, wie bereits erwähnt, durch den TNFR1 aktiviert und ist dabei selbst in der Synthese von TNF α involviert (Lee, Laydon et al. 1994). Als Auslöser der p38 Signalkaskade wird dabei überwiegend zellulärer Stress angesehen (Kyriakis, Avruch 1996). P38 wird in folgende vier Isoformen eingeteilt: p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ (Cuenda, Rousseau 2007). Zwei der Isoformen, p38 γ und δ , werden unterschiedlich in verschiedenen Zellpopulationen, abhängig von dem entstammenden Organ, exprimiert. So findet sich p38 γ vor allem im Skelettmuskel wieder (Lechner, Zahalka et al. 1996; Zhuangjie Li 1996), während p38 δ in erster Linie in den Geweben der Lunge, der Hoden, des Pankreas, der Nieren und des Dünndarms exprimiert wird (Kumar, McDonnell et al. 1997). P38 α und β kommen dem gegenüber ubiquitär in allen Zellen des menschlichen Organismus vor (Jiang, Chen et al. 1996; Wang, Diener et al. 1997; Ono, Han 2000). Direkt aktivierende Kinasen *upstream* von p38 sind dabei die *dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3* (MAPKK3 alias MKK3) und *dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6* ((MAPKK 6 alias MKK6) (Kyriakis, Avruch 2001).

Betrachtet man die Aktivierung des p38 Signalweges durch den TNFR1, fällt auf, dass es gewisse Gemeinsamkeiten zu der ebenfalls zu den MAPK gehörenden JNK gibt. Beide Kinasen werden nur vorübergehend durch eine TNF α -Stimulation aktiviert, zeigen jedoch ein verlängertes Signal unter dem Zustand der Apoptose. Außerdem sind TRAF2, ASK1 und MEKK1, welche bei der TNF α -induzierten Aktivierung von JNK eine Rolle spielen, ebenfalls Induktoren von p38 (Ichijo, Nishida et al. 1997; Carpentier, Declercq et al. 1998; Yuasa, Ohno et al. 1998). Trotzdem gibt es *up-* sowie *downstream* dieser beiden MAPK Unterschiede in ihren Signalwegen. So konnte gezeigt werden, dass eine Deletion in RIP1 die TRAF2 vermittelte Aktivierung von p38, nicht jedoch von JNK störte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass RIP1 eine größere Rolle im p38 Signalweg spielt (Yuasa, Ohno et al. 1998). Ebenso konnte in Fibroblasten aus MKK3-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass lediglich p38 und nicht JNK durch TNF α -induziertes *Signaling* vermindert aktiviert wurde (Wysk, Yang et al. 1999). *Downstream* vermittelt p38 wiederum selbst die Synthese von TNF α (Lee, Young 1996). Dies geschieht, wie sich zu einem späteren Zeitpunkt herausstellte, durch die MAPKAPK 2 (Kotlyarov, Neininger et al. 1999). Zu weiteren *downstream* targets von p38 gehören, neben den bereits erwähnten MAPKAPK 2 und 3, Transkriptionsfaktoren, wie ATF2, CHOP, CREB und ELK1 (Martin-Blanco 2000). Zusätzlich wurde p38 als ein möglicher Aktivator von NF- κ B diskutiert (Vanden Berghe, Plaisance et al. 1998), das selbst eine Rolle in der Synthese von inflammatorischen Zytokinen wie TNF α einnimmt (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003).

I.12 p38 und seine Rolle bei der Apoptose CD4+ T-Lymphozyten

Wie bereits erwähnt ist p38 Teil des TNF α -induzierten Signalweges und somit auch in den zellulären Proliferations- und Apoptoseprozessen involviert. Dabei konnte jedoch beobachtet werden, dass p38 entsprechend seiner Isoformen unterschiedliche Funktionen einnimmt. So spielt p38 α , im Gegensatz zum anti-apoptotischen p38 β , eine pro-apoptotische Rolle, die sich im unterschiedlichen Phosphorylierungsverhalten von cFlip_s widerspiegelt. p38 α ist in der Lage die Phosphorylierung und Anwesenheit von cFlip_s in Jurkat-Zellen zu verhindern (Tourian, Zhao et al. 2004). Bei cFlip_s handelt es sich um eine der bereits erwähnten Isoformen von cFlip, die ein Inhibitor der Apoptose (Krueger, Schmitz et al. 2001) im *death-inducing signal complex* (DISC), bei dem es sich um den apoptoseauslösenden Proteinkomplex der Todesrezeptoren handelt (Guicciardi, Gores 2009), ist. Durch p38 α wird auf diesem Weg eine FasL-induzierte Apoptose und die Aktivierung von Pro-Caspase 8 ermöglicht. Im Gegensatz dazu ist p38 β nicht in der Lage

diese Art der Inhibierung der Apoptose auszulösen (Tourian, Zhao et al. 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass MAPKK 3 und 6, welche wie bereits erwähnt *upstream* gelegene Kinasen der p38 Signalkaskade sind, die Apoptose in Jurkat-Zellen induzieren können. Diese Initiierung der Apoptose läuft dabei jedoch ohne eine Vermittlung durch p38 ab (Huang, Jiang et al. 1997; Juo, Kuo et al. 1997). Eine weitere Veröffentlichung konnte jedoch darstellen, dass es bei chemisch- sowie ligandeninduzierter Apoptose, in diesem Fall durch TRAIL und durch einen gegen den FasR gerichteten Antikörper, in Jurkat-Zellen zu einer Aktivierung von JNK und p38 kam (MacFarlane, Cohen et al. 2000). Eine in unserem Labor durchgeführte *in vivo* Studie konnte zusätzlich hervorheben, dass es in MAPKAPK 2-defizienten Mäusen zu einem verlängerten Verlauf der EAE, dem Tiermodell der humanen Multiplen Sklerose, kam. Dabei waren die TNF α -Spiegel reduziert und vermehrt autoreaktive Entzündungszellen im ZNS registrierbar (Tietz, Hofmann et al. 2014). Da die MAPKAPK 2 die TNF α -Synthese reguliert (Kotlyarov, Neining et al. 1999) und selbst ein *downstream* Substrat von p38 ist (Stokoe, Campbell et al. 1992; McLaughlin, Kumar et al. 1996), besteht die Möglichkeit, dass p38 in dem Apoptoseverhalten von T-Lymphozyten und folglich in deren autoimmunen Rolle bei inflammatorischen Krankheiten ein entscheidender Faktor ist (Tietz, Hofmann et al. 2014). Die genauen Regulationsmechanismen der Apoptose CD4+ T-Lymphozyten und die Rolle von p38 bei dieser bleiben dabei jedoch bisher unbekannt.

I.13 Zielsetzung der Arbeit

Da der von TNF α über den TNFR1 ausgelöste Signalweg über solch eine große Bandbreite an Folgekaskaden verfügt, die zu unterschiedlichen, gar gegensätzlichen Ergebnissen für die Zelle führen, nämlich Zelltod oder –proliferation (Aggarwal 2003; Wajant, Pfizenmaier et al. 2003), hat dieser Mechanismus Bedeutung für viele zelluläre Vorgänge bis hin zur Pathogenese verschiedener Krankheiten. Trotz ausgiebiger Forschung in diesem Gebiet ist es bisher nicht gelungen, diese Abläufe gänzlich zu entschlüsseln. Es wurde zum einen von einer zeitabhängigen Regulation des TNF-Signals ausgegangen (Micheau, Tschopp 2003). Zum anderen konnte auch eine durch eine Temperaturerhöhung ausgelöste Internalisierung des TNFR1 mit einem daraus resultierenden veränderten, pro-apoptotischen Signalweg beobachtet werden (Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Durch die neuen Erkenntnisse im Bereich der durch den TNFR1 ausgelösten Nekroptose konnten weitere Regulationsmechanismen, wie die Phosphorylierung von RIP1 (McQuade, Cho et al. 2013), entschlüsselt werden. Gleichzeitig ließen diese gewonnenen Erkenntnisse die Komplexität des TNF-Signalings weiter zunehmen (Ting,

Bertrand 2016). Diese bisher entdeckten Mechanismen werden dabei der Vielschichtigkeit der aus dem TNF α -Stimulus folgenden Signalwege noch nicht gerecht. Aus diesem Grund liegt die Zielsetzung dieser Arbeit darin, näher zu beleuchten, ob einer dieser Schlüsselmechanismen in der Regulierung des Signalweges des TNFR1 in CD4+ T-Lymphozyten in der TNF α -konzentrationsabhängigen Stimulation liegt. Die daraus folgende mögliche Regulierung des Apoptoseverhaltens der Zellen könnte damit einen Beitrag bei der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen leisten. In diesem Zusammenhang liegt zudem ein Augenmerk auf die Rolle von p38 als Schlüsselenzym des TNF α -Signalwegs. Zu diesem Zweck wurden immortalisierte CD4+ T-Lymphozyten, das heißt Jurkat-Zellen, in Kultur mit steigenden TNF α -Konzentrationen stimuliert und das Apoptoseverhalten der Zellen - jeweils mit oder ohne Inhibition von p38 - zu zwei verschiedenen Zeitpunkten auf molekularbiologischer Ebene gemessen und quantifiziert. Dabei sollte neben der Apoptose auch das Verhalten des TNFR1 - speziell dessen Lokalisation an der Zelloberfläche - im Zellinneren oder frei im Zellmedium unter den verschiedenen Stimulationskonzentrationen im Fokus stehen.

II. METHODEN

II.1 Zellkultur

Zur Gewinnung von CD4+ T-Lymphozyten wurden immortalisierte Jurkat-Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten. Die Zellen wurden in einem speziellen Kulturmedium in 250 ml fassenden 75 cm² Kulturflaschen in je 12 ml Medium kultiviert. Die Zellen wurden in der Regel 3 Mal pro Woche aufgeteilt und zu experimentellen Zwecken mit je ca. 2×10^5 Zellen in 2 ml Medium pro Well in 6-Well-Platten (Durchflusszytometrie, Western Blot, RT-PCR) beziehungsweise 1×10^5 Zellen in 0,5 ml Medium pro Well in 24-Well-Platten (ELISA, WST-1 Assay, LDH Assay) angesetzt.

Einfrieren und Auftauen von Jurkat-Zellen:

Die Jurkat-Zellen wurden bei -80 °C in einem speziellen Einfriermedium versetzt gelagert. Um die Zellen kultivieren zu können, wurden sie im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in ein 15 ml Falcon mit 9 ml erwärmten Medium pipettiert und bei 1400 rpm 3 min lang abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen, erneut abzentrifugiert und das in 12 ml erwärmten Medium resuspendierte Pellet in einer Kulturflasche angesetzt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium erneut gewechselt und Experimente erst nach zwei weiteren Passagen durchgeführt. Um einen Vorrat an Zellen zu sichern, wurden niedere Passagen nach dem Splitten in 15 ml Falcons überführt und 3 min bei 1400 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen gegeben und erneut unter einem kontrollierten Temperaturabfall von 1 °C/min bei -80 °C eingefroren.

Mediumwechsel und Zellzahlreduktion:

Um die Zellzahl möglichst konstant zu halten, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen ihrer Dichte nach aufgeteilt (in der Regel im Verhältnis 1:6) und im Zuge dessen das Medium erneuert. Dazu wurden aus den Kulturflaschen jeweils von den enthaltenen 12 ml Medium die entsprechende zu reduzierende Menge abpipettiert und durch die gleiche Menge an neuen, zuvor im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmten Medium ersetzt. Dies wurde 2 – 3 Mal pro Woche durchgeführt.

Bestimmung der Zellzahl:

Um die Zellzahl in der Zellkultur zu ermitteln, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierzu wurden 10 µl des Mediums mit den Zellen aus der Kultur um das 10-fache mit Trypanblau verdünnt. Von dieser Lösung wurden 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer gegeben, welche zuvor mit einem Deckplättchen abgedeckt wurde und dadurch auf die eingebrachte Lösung eine kapillare Sogwirkung ausübte. Anhand der auf der Neubauer-Zählkammer angebrachten vier Quadranten konnte unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung die Anzahl der Zellen pro Quadrant gezählt werden, wobei ein Quadrant einem Volumen von 0,1 µl entspricht. Aus den vier Werten wurde der Mittelwert errechnet und über die Verdünnung, sowie das vorgegebene Volumen pro Quadrant die Zellzahl pro 1 ml bestimmt.

Zellstimulation mit TNF α :

Das rekombinant erzeugte, humane TNF α wurde in PBS gelöst und bei 4 °C in der Konzentration 10 µg/ml gelagert. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten, beziehungsweise 24-Well-Platten ausgesät und nach mindestens 6 h Erholungszeit mit folgenden Konzentrationen stimuliert: 0, 10, 50, 100, 300, oder 500 ng/mL.

Die Inhibition von p38:

Die Inhibition des Enzyms p38 wurde mit dem InSolution Inhibitor SB203580 durchgeführt. Die Stocklösung mit der Konzentration 1,0 mg/ml wurde im Verhältnis 1:1000 auf die angesetzten Wells mit den Jurkat- Zellen gegeben (2 µl Inhibitor bei 2 ml beziehungsweise 0,5 µl bei 0,5 ml Medium pro Well). Die Inhibition wurde 1 h vor der Stimulation mit TNF α durchgeführt. Da SB203580 bereits in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst war, wurde die gleiche Menge reines DMSO als Kontrolle parallel auf eine weitere Zellkulturplatte gegeben.

II.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden Zellen auf ihre Größe, Granularität sowie durch Antikörper vermittelte spezifische Fluoreszenzen hin untersucht. Hierzu passieren die Zellen in einer speziellen Lösung einen Laserstrahl und das Zytometer, in diesem Fall das *FACSCalibur-Durchflusszytometer*, misst das abgelenkte beziehungsweise ausgestrahlte Licht mit unterschiedlichen Detektoren. Zum einen handelt es sich um den *Forwardscatter (FSC)*, welcher das von den Zellen flach gestreute Licht detektiert und

Informationen über die Zellgröße liefert, zum anderen um den *Sidewardscatter* (SSC) mit Hilfe dessen die Zellgranularität über das seitwärts abgelenkte Laserlicht bestimmt werden kann. Zusätzlich kann über an Zellen gebundene, fluoreszierende Antikörper oder andere Farbstoffe, wie interkalierende Substanzen, das von diesen absorbierte und emittierte Licht gemessen und somit Rückschlüsse auf bestimmte, durch diese Fluoreszenzen markierte, Strukturen gezogen werden (Abbildung 5).

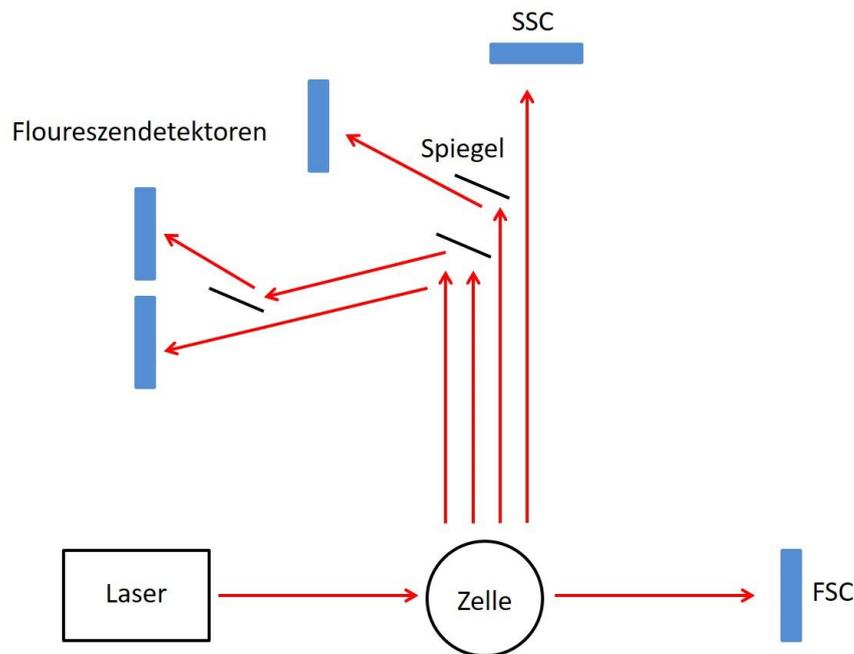


Abbildung 5: Schema einer Durchflusszytometriemessung.

Die Zellen werden mit einem Laser (zum Beispiel Argon $\lambda=488\text{nm}$) bestrahlt. Dabei wird der Laser vorwärts beziehungsweise seitwärts gestreut und über die jeweiligen Detektoren gemessen (vorwärts über FSC, seitwärts über SSC). Dadurch werden Informationen über Größe und Beschaffenheit der Zellen ermittelt. Zusätzlich kann das von fluoreszierenden Farbstoffen emittierte Licht über Fluoreszenzdetektoren quantifiziert und somit Daten über die von ihnen oberflächlich gebundenen Mustern erhalten werden. (modifiziert aus: Luttmann, W./ Bratke, K./ Küpper, M./ Myrtek, D.: Der Experimentator Immunologie, 2. Auflage, 2006 (Luttmann, Bratke et al. 2006))

Folgende, mit fluoreszierenden Farbstoffen versehene, Antikörper beziehungsweise interkalierende Farbstoffe zur Markierung von bestimmten Strukturen mit ihren zugehörigen Absorptions- und Emissionsmaxima wurden bei den durchgeführten Messungen verwendet:

Apoptosemarker 7-AAD (7-Aminoactinomycin):

- interkalierender Farbstoff
- Absorptionsmaximum: 488 nm
- Emissionsmaximum: 647 nm

CD120a (TNFR1) Antikörper:

- an Biotin gekoppelter Antikörper gegen TNF-Rezeptor-1

Streptavidin PerCP(Peridiniumchlorophyll-Protein)-Cy5.5:

- an PerCP-Cy5.5 gekoppeltes, biotinbindendes Protein
- Absorptionsmaximum: 488 nm
- Emissionsmaximum: 695 nm

Mit Hilfe der 7-AAD und CD120a Färbungen, welche unabhängig voneinander durchgeführt wurden, sollten die stimulierten Jurkat-Zellen auf ihr Apoptoseverhalten und ihren an der Oberfläche exprimierten TNFR1 hin quantifiziert werden. Hierzu wurden die mit TNF α stimulierten Jurkat-Zellen nach 24 beziehungsweise 48 h aus der Kultur entnommen, das Medium abzentrifugiert (1600 rpm, 5 min) und die Zellen in jeweils 50 μ l FACS-Puffer in einer 96-Well-Platte gelöst.

7AAD:

Bei 7AAD handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, der ausschließlich in Zellen, bei welchen die Integrität der Zellmembran verloren gegangen ist, gelangen kann. Dieser Verlust der Zellmembrandichte findet bei apoptotischen Ereignissen statt. Nach Durchdringen der Zellmembran bindet 7AAD infolgedessen spezifisch an GC-reiche Regionen der DNA. Aufgrund dieser Eigenschaft dient er zur Markierung von DNA apoptotischer Zellen. 7AAD wurde auf die resuspendierten Zellen gegeben (Verdünnung 1:10) und bei 4 °C für 5 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die markierten Zellen in zwei Schritten mit jeweils 200 μ l FACS-Puffer gewaschen und daraufhin erneut in 200 μ l FACS-Puffer gelöst. Anschließend wurden die gefärbten Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert und im *FACSCalibur-Durchflusszytometer* gemessen. In einer der jeweils drei Messungen wurden 120.000 Events registriert.

CD120a:

Ähnlich dem oben genannten Schema von 7AAD wurden die resuspendierten Zellen mit dem TNFR1 (CD120a) Antikörper (Verdünnung 1:100) für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zwei Mal mit je 200 μ l FACS-Puffer pro Well gewaschen. Da es sich bei dem an Biotin gekoppelten CD120a Antikörper jedoch nicht um einen selbstfluoreszierenden Antikörper handelt, wurden die markierten Zellen anschließend in 50 μ l FACS-

Puffer resuspendiert, mit Streptavidin PerCP-Cy 5.5 (Verdünnung 1:100) sekundär markiert und mit diesem für 20 min bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 200 µl FACS-Puffer mit anschließender Lösung der Zellen in erneuten 200 µl FACS-Puffer in FACS-Röhrchen. Die Messung wurde unabhängig von der mit 7AAD ebenfalls mit dem *FACSCalibur-Durchflussszytometer* durchgeführt. Es wurden in jeweils einer der drei Messungen ebenfalls 120.000 Events registriert.

Um unspezifische Signale des CD120a Antikörpers auszuschließen beziehungsweise in die Auswertung mit einzuberechnen, wurde jeweils eine Probe mit unstimulierten Jurkat-Zellen anstelle des CD120a Antikörpers mit einer sogenannten Isotypkontrolle markiert. Dabei handelte es sich um einen an Biotin gekoppelten Mausantikörper (IgG2a), der an humane Lymphozyten bindet. Das entsprechende Signal wurde mit Hilfe des *FACSCalibur-Durchflussszytometers* gemessen.

II.3 Semiquantitative RNA-Messung

Um das Apoptoseverhalten der Jurkat-Zellen auch auf der Ebene der mRNA-Expression näher untersuchen zu können, wurde die RNA aus den Zellen zuerst isoliert, anschließend über eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und zuletzt über eine *real-time* Polymerasen Ketten Reaktion (RT-PCR) exponentiell vermehrt. So konnten Rückschlüsse auf die Transkription bestimmter Gene, in diesem Fall jene kodierend für cFlip und Caspase 8, gezogen werden.

RNA-Isolation:

Zur RNA-Isolation wurde das *QIAampTM RNA Blood Mini Kit* verwendet und die Durchführung erfolgte nach dem beigelegten Herstellerprotokoll. Die Jurkat-Zellen wurden entsprechend der Inkubationszeiten nach 24 h beziehungsweise 48 h nach der Stimulation mit TNF α aus der Kultur entnommen, 5 min bei 1600 rpm abzentrifugiert und das Medium abpipettiert. Die Zellen wurden in 350 µl RLT-Puffer gelöst und anschließend durch die Zentrifugation durch *QIAampTM shredder Säulen* lysiert. Daraufhin folgte die Ausfällung der RNA durch 70% Ethanol, deren Bindung an *QIAampTM Säulen* und mehrere Waschriffe mit verschiedenen Puffern (RW1 und RPE). Nach dem Trocknen der Säulen durch erneute Zentrifugation wurde die isolierte RNA letzten Endes in 50 µl DNase/RNase freiem Wasser gelöst.

Reinheitsbestimmung der RNA:

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe eines Spectrophotometers auf ihre Reinheit hin untersucht. Hierzu wurden jeweils 50 µl der Proben mit der Verdünnung 1:10 angesetzt. Im Spectrophotometer wurden diese anschließend mit Licht der Wellenlänge 260 beziehungsweise 280 nm bestrahlt und das jeweilige Absorptionsvermögen gemessen. Aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} konnten schließlich Rückschlüsse auf Kontaminationen gezogen werden, wobei ein Wert von circa 1,9 für eine reine RNA Probe stand. Als Referenzwert wurde gegen reines Wasser gemessen.

cDNA-Synthese:

Unmittelbar auf die Isolierung und Reinheitsbestimmung der RNA folgte die cDNA-Synthese aus den Proben. Bei den dabei verwendeten Substanzen handelte es sich um das *RevertAidTM First Strand Synthesis Kit*. Die Synthese bestand aus drei Schritten, wobei es sich bei dem ersten dieser Schritte um das *Annealing* der Oligo(dT) Primer handelte. Hierzu wurden für jede Probe jeweils zwei Eppendorfcups mit dem Volumen von 0,1 ml nach folgendem Pipettierschema vorbereitet:

- 11,5 µl der RNA Probe
- 1 µl Oligo(dT) Primer (entspricht 0,5 ng)

Das Annealing erfolgte 5 min lang bei 70 °C, gefolgt von einer Abkühlung der Proben auf 4 °C. Im nächsten Schritt wurden folgende Substanzen hinzugefügt:

- 4 µl Reaktionspuffer
- 2 µl dNTP (Konzentration: 10^{-3} mol/L)
- 0,5 µl *RiboLockTM* (Ribonuklease Inhibitor)

Es folgte eine Inkubation von 5 min bei 37 °C mit einer erneuten Abkühlung auf 4 °C. Im letzten Schritt wurde die Reverse Transkriptase *RevertAidTM M-MuLV* (1 µl = 200 U) hinzugegeben und die endgültige Synthese der cDNA fand über 1 h bei 42 °C statt. Beim anschließenden Erhitzen auf 70 °C wurde die Reaktion schließlich beendet und die cDNA bei 4 °C gelagert.

Real Time-PCR:

Zur semiquantitativen Messung der synthetisierten cDNA wurde eine RT-PCR verwendet, bei der das exponentiell zunehmende Produkt, das heißt die neu synthetisierte DNA, durch einen interkalierenden Farbstoff, im Rahmen dieser Dissertation *SYBR Green I*, in

Echtzeit verfolgt werden kann. Gemessen wird hierbei letzten Endes der CT-Wert, bei dem es sich um den Zyklus in der *Annealing*-Phase der RT-PCR handelt, bei dem der Fluoreszenzwert des Produkts den des Hintergrundes signifikant übersteigt. Um eine ungefähre Abschätzung über die Richtigkeit des ermittelten CT-Wertes und mögliche Verunreinigungen, die sich in einem veränderten CT-Wert bemerkbar machen würden, treffen zu können, wurden jeweils Doppelwerte gemessen. Die beiden Werte sollten sich dabei nicht wesentlich unterscheiden ($\Delta CT \leq 0,5$). Zur weiteren Analysierung wurde der kleinere Wert der beiden verwendet. Die RT-PCR wurde im *Light Cycler 1.5* der Firma *Roche* durchgeführt und es wurden bereits etablierte Primer mit bekannten Annealingtemperaturen (AT) und Amplifikationszeiten (AZ) verwendet.

Primer:

- Caspase 8 (AT: 60 °C, AZ: 10/15/20 = Denaturierung/Annealing/Extension, Angabe jeweils in Sekunden)
- cFlip (AT: 62 °C, AZ: 10/15/20)
- GAPDH (AT: 60 °C, AZ: 10/15/20)

Pipettierschema je Probe:

- 10 µl *Quanti Fast SYBR Green* (Mastermix aus PCR Kit)
- 7 µl DNase/RNase freies Wasser
- 1 µl Primer (*forward*)
- 1 µl Primer (*reward*)
- 1 µl cDNA der zu untersuchenden Probe

Relative DNA Quantifizierung:

Da es sich bei der eingesetzten, ursprünglich isolierten RNA um keine festgesetzte Menge handelte, wurde die draus synthetisierte DNA nur semiquantitativ gemessen. Das bedeutet, dass der gemessene CT-Wert für die mRNA eines bestimmten Gens (kodierend für Caspase 8 oder cFlip) zum Verhältnis eines *housekeeping* Gens gesetzt wurde, in diesem Fall kodierend für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), von dem ein konstant bleibendes Niveau vorausgesetzt werden sollte. Aus bereits etablierten, zu jedem Primer gehörenden Standardkurven, die ursprünglich durch 10-fache Verdünnungsschritte gewonnen wurden, wurden die CT-Mittelwerte ermittelt und aus diesen eine Gerade mit der definierten Steigung $m = \frac{\Delta y}{\Delta x}$ gebildet. Auf diese Art und

Weise wurde bereits für jedes zugehörige Gen ein Referenzwert (CT_R) über folgende Formel berechnet:

$$CT_R = (\sum y + (m \times \sum x))/n$$

Diese Referenzwerte für die jeweils für bestimmte Proteinsequenzen kodierenden mRNA Abschnitte waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und mussten deshalb in dieser Arbeit nicht neu ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Referenzwerte konnte für jede gemessene mRNA (Caspase 8, cFlip, GAPDH) aus dem gemessenen CT-Wert (CT_M) der Absolutwert ermittelt werden:

$$\text{Absolutwert} = \frac{10^{(CT_M - CT_R)}}{m}$$

Die Absolutwerte von Caspase 8 sowie cFlip wurden anschließend jeweils durch den dazu gehörenden Absolutwert von GAPDH der Probe geteilt, um eine relative Aussage über die Menge der ursprünglich transkribierten RNA der Zelle treffen zu können. Da in dieser Arbeit das Apoptoseverhalten der Zellen im Mittelpunkt stand, wurde schließlich noch der gemessene Wert von cFlip in Relation zu dem von Caspase 8 gesetzt, da dieser die Apoptose auf dem Level der transkribierten mRNA widerspiegelt.

II.4 Nachweis von Proteinen

Die Methode der Wahl zur Darstellung und Quantifizierung von Proteinen ist der Western Blot bei dem die Proteine zuerst denaturiert und über einen Ladepuffer negativ geladen werden. Über eine Gelelektrophorese werden die Proteine daraufhin ihrer Größe nach aufgetrennt, indem sie aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch ein Gel laufen. Abhängig von ihrer Größe wandern sie dabei besser oder schlechter durch die Poren im Acrylamidgel, das heißt, dass ihre Laufgeschwindigkeit variiert (Abbildung 6).

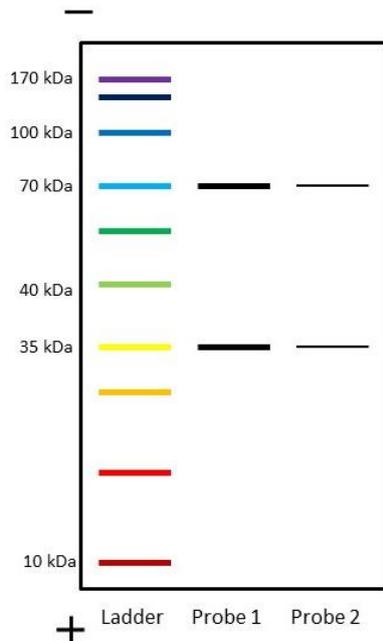


Abbildung 6: Schema einer Gelelektrophorese.

Die negativ geladenen Proteine aus den Proben wandern im Gel von der Kathode (- Pol) zur Anode (+ Pol). Je nach ihrer Größe bewegen sich die Proteine langsamer oder schnell durch die Poren des Gels. Hier seien beispielhaft je Proteine der Größe 70 kDa (kilo Dalton) und 35 kDa dargestellt. Als Vergleich wird dabei immer eine Größenkontrolle (Ladder) durch das Gel mitlaufen gelassen. Durch an die Proteine gebunden Antikörper mit gekoppelten Enzymen können zum Beispiel über Chemilumineszenz die einzelnen Banden sichtbar gemacht und quantifiziert werden (hier: Menge Protein Probe 1 > Protein Probe 2). (modifiziert aus: Luttmann, W./ Bratke, K./ Küpper, M./ Myrtek, D: Der Experimentator Immunologie, 2. Auflage, 2006 (Luttmann, Bratke et al., 2006))

Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Auf dieser Membran können sie durch Antikörper gegen die zu interessierenden Strukturen markiert werden. Durch einen an ein Enzym, das einen Farbstoff umsetzt, wie zum Beispiel Meerrettichperoxidase, gekoppelten Sekundäntikörper können die entstandenen Banden über Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

Proteinisolation:

Die Jurkat-Zellen wurden nach ihren Inkubationszeiten mit TNF α (24 h und 48 h) mit ihrem Medium in 2 ml Eppendorfcups pipettiert und bei 1600 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die verbleibenden Zellen mit 1 ml PBS einfach gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entnahme des PBS wurden 70 μ l Lysierpuffer sowie 10 μ l Proteaseinhibitor und 1 μ l Phosphataseinhibitor auf die Zellen gegeben und diese auf Eis für 1 h inkubiert, so dass die Zellen lysiert wurden. Abschließend wurde das Lysat bei 14000 rpm für 20 min zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand mit den enthaltenen Proteinen abpipettiert, um bei - 20 °C gelagert zu werden.

Bradford Assay:

Um die Proteinmenge der Probe bestimmen zu können, damit in den nachfolgenden Schritten eine möglichst konstante Proteinmenge eingesetzt werden konnte, wurde ein Bradford Assay durchgeführt, bei welchem photometrisch ein proteinkonzentrationsabhängiger Farbumschlag gemessen wurde. Hierzu wurde zuerst eine Standardreihe mit

Hilfe von BSA (Stocklösung: 1,35 mg/ml) in den folgenden Konzentrationen angesetzt: 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml und 0,6 mg/ml. Anschließend wurden zu jeweils 20 µl der Standardreihe beziehungsweise der Proben oder Wasser als Leerwert 1 ml *Roti®-Quant*, welches zuvor im Verhältnis 1:5 verdünnt wurde, gegeben und 10 min lichtgeschützt inkubiert. Durch die Komplexbildung, welche der im *Roti®-Quant* enthaltene Triphenylmethanfarbstoff mit den kationischen und ungeladenen Seitenketten der Proteine eingeht, ändert sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Dieser Farbumschlag ist konzentrationsabhängig und konnte in Küvetten im Spectrophotometer gemessen werden.

Gelelektrophorese:

Zuerst wurden die benötigten Gele für die Elektrophorese gegossen. Dazu wurden zwei verschiedene Gele, Trenn- und Sammelgel, nach folgenden Schemata pipettiert:

Trenngel (12 %, 10 ml):

■ H ₂ O	3,3 ml
■ 30 % Acryl-bisacrylamid mix	4,0 ml
■ 1,5 M Tris (pH 8.8)	2,5 ml
■ 10 % SDS	0,1 ml
■ 10 % APS	0,1 ml
■ TEMED	0,004 ml

Sammelgel (6 ml):

■ H ₂ O	4,1 ml
■ 30 % Acryl-bisacrylamid mix	1,0 ml
■ 1,5 M Tris (pH 6.8)	0,75 ml
■ 10 % SDS	0,06 ml
■ 10 % APS	0,06 ml
■ TEMED	0,006 ml

Die Proteinproben wurden so angesetzt, dass sich darin pro Probe 50 µg Protein befanden. Diese wurden mit je 5 µl Ladepuffer versetzt und die Proteine 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die dafür vorgesehenen Taschen in den Gelen mit den Proben befüllt, wobei jeweils eine Tasche mit 7 µl *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* als Größenkontrolle beladen wurde. Die Gelelektrophorese lief anschließend in einer

Sammelphase 30 min bei 90 V und in einer Trennphase 2:30 h bei 120 V in einem Laufpufferbad.

Blotting:

Die Proteine wurden *semidry* mit Transferpuffer getränkt 1 h bei 25 V/ 400 mA (bei einer Membran 350 mA) auf Nitrocellulose Membranen geblottet. Anschließend wurden die Membranen mit TBST gewaschen und 1 h in Milch geblockt.

Antikörper:

Die Membranen wurden mit folgenden Antikörpern inkubiert:

Antikörper	Lösungsmittel	Inkubationszeit	Gewicht (kDa)
■ Caspase 3	Milch (1:1000)	6 h	17, 19, 35
■ Caspase 8	BSA-Lösung (1:1000)	6 h	10, 57
■ Caspase 9	BSA-Lösung (1:1000)	6 h	17, 35, 37, 47
■ cFlip	BSA-Lösung (1:1000)	6 h	55
■ PARP	Milch (1:1000)	6 h	89, 116
■ TNF-R1	BSA-Lösung (1:1000)	6 h	55
■ β -Actin	BSA-Lösung (1:1000)	1 h	45
■ Tubulin β	BSA-Lösung (1:1000)	1 h	55
■ GAPDH	BSA-Lösung (1:1000)	1 h	37
■ anti-Rabbit	BSA-Lösung (1:1000)	1 h	-

Die Antikörper wurden in Milch beziehungsweise BSA-Lösung in der Verdünnung 1:1000 gelöst. Bei dem anti-Rabbit Antikörper handelte es sich dabei um einen an Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper. Zwischen den einzelnen Inkubationen folgten jeweils drei Waschgänge für 5 min mit TBST.

Entwicklung und Auswertung:

Die Membranen wurden 5 min mit der Entwicklungslösung inkubiert und die, über die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase erzeugte, Chemilumineszenz der Banden gemessen (Abbildung 7). Anhand der Intensität der Lumineszenz konnte auf die Menge der einzelnen markierten Proteine Rückschlüsse gezogen werden. Die eingesetzte Gesamtproteinmenge sollte bei 50 μ g liegen. Da jedoch mit Abweichungen gerechnet werden musste, wurden die Proteinkonzentrationen auf die Proteinkonzentration, translatiert aus der mRNA eines konstant exprimierten *housekeeping* Gen derselben Probe, wie zum Beispiel β -Actin, bezogen. Die Messungen wurden als Triplicate durchgeführt. Lediglich die Messung unter der Wirkung von DMSO wurde einfach angefertigt und sollte bei Auffälligkeiten in der Messung unter dem Inhibitor SB203580 zwei weitere Male wiederholt werden.

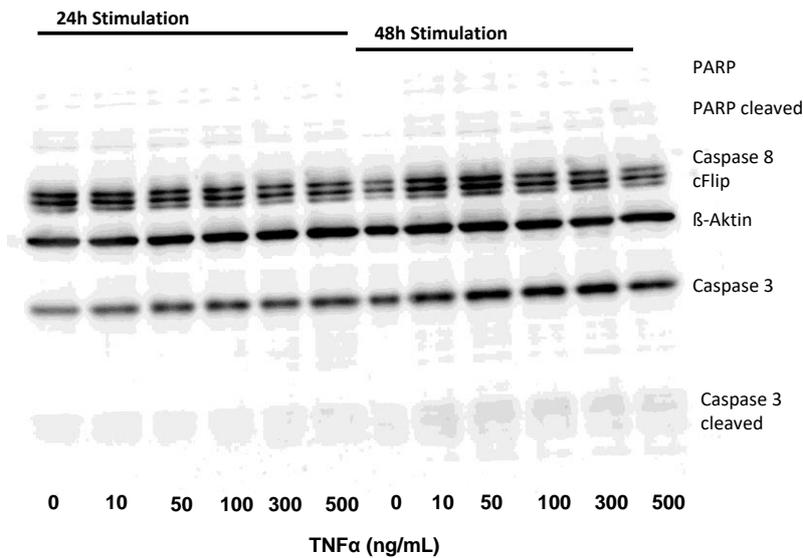


Abbildung 7: Beispiel einer entwickelten Membran.

Auf dieser Membran wurden die Proteine PARP, Caspase 8, cFlip, β-Aktin und Caspase 3 mit Primärantikörpern markiert und mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert. Je nach Menge des jeweiligen Proteins sind die Banden unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Proteine wurden nach ihren Stimulationszeiten und nach den steigenden Konzentrationen an TNFα geordnet aufgetragen.

II.5 ELISA

Um den von den Zellen in das Medium abgegebenen, löslichen TNFR1 darstellen und quantitativ beurteilen zu können, wurde ein ELISA Kit verwendet. Das Prinzip des Kits beruht dabei auf der „Sandwich-Methode“. Ein bereits auf der Mikroplatte immobilisierter und gegen das gesuchte Antigen gerichteter Antikörper bindet das Antigen, in diesem Fall den löslichen TNFR1. Ein zweiter Antikörper, welcher ebenfalls diese Struktur erkennt und an ein Enzym gekoppelt ist, vermittelt einen Farbumschlag, der abhängig von der gebundenen Menge des Antigens gemessen wird (Abbildung 8). Das Experiment wurde nach dem, dem Kit beigefügten Protokoll, durchgeführt.

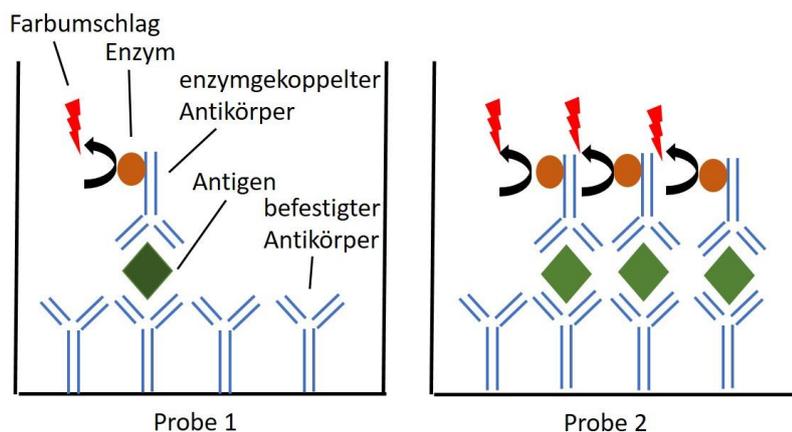


Abbildung 8: Schematische Darstellung zweier ELISA-Wells.

Die am Boden der einzelnen Wells befestigten Antikörper sind gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet, wie in dieser Arbeit den TNFR1. Je nach Menge des gebundenen Antigens bindet daraufhin ein zweiter Antikörper, an welchen ein Enzym gekoppelt ist, das einen Farbumschlag katalysiert. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen und somit die Menge des gebundenen Antigens quantitativ bestimmt werden. Nicht gebundene Antikörper werden zuvor abgewaschen. In der hier dargestellten Abbildung würde die erhöhte Konzentration an Antigen in Probe 2 zu einem höheren Farbumschlag als in Probe 1 führen.

Zuerst wurde die in dem Kit enthaltene Standardlösung in sechs Schritten jeweils um den Faktor 0,5 verdünnt und auf diese Weise eine Standardreihe erstellt. Auf die 96-Well Mikrotiterplatte, welche mit dem benötigten Antikörper beschichtet war, wurden jeweils 50 μl *Assay Diluent HD 1-7* sowie 200 μl der erstellten Standardlösungen beziehungsweise des aus der Zellkultur erhaltenen Überstandes des Zellmediums gegeben. Nach 2 h Inkubationszeit wurde die Platte zweimal mit jeweils 400 μl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 200 μl des *sTNFR1 Konjugats* gegeben und erneut für 2 h inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte und die Gabe der Substratlösung (200 μl), die den Farbumschlag einleitete. Die Reaktion lief 20 min unter Vermeidung von Lichtzufuhr ab und wurde nach der angegebenen Zeit durch eine durch den Hersteller bereitgestellte Lösung (50 μl) zum Stoppen gebracht. Die optische Dichte (OD) wurde im *ELISA Reader* bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt.

II.6 Zellproliferationsassay (WST-1)

Um eine quantitative Aussage über die mögliche, durch die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation veränderte, Zellproliferation der Jurkat Zellen treffen zu können, wurde ein *WST-1 Assay* der Firma Roche durchgeführt. Dabei wird das Tetrazolium Salz WST-1 durch die metabolisch aktiven Zellen in Formazan umgewandelt, wodurch ein Farbumschlag sichtbar wird. Dieser kann mit Hilfe des *ELISA Readers* quantifiziert werden. Die Durchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls.

Die für das Experiment benötigten Jurkat-Zellen wurden in 24-Well Platten kultiviert, mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert und gegebenenfalls mit SB203580 beziehungsweise DMSO versetzt. Nach 24 h Inkubation wurden sie direkt in den Wells mit dem WST-1 Reagenz im Verhältnis 1:10 behandelt, das heißt 50 μl WST-1 bei 0,5 ml Medium. Die Zellen wurden im Brutschrank belassen und jeweils nach 0,5 h, 1 h und 2 h 100 μl des inzwischen gefärbten Mediums entnommen um in einer 96-Well Platte im *ELISA Reader* bei Wellenlänge von 450 nm gemessen zu werden. Dabei wurde die OD bestimmt. Es wurden dabei jeweils Triplikate der Werte je $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration bestimmt.

II.7 Zytotoxizitätsassay (LDH)

Durchlaufen Zellen den nekrotischen Zelltod, werden durch die beschädigte Zellmembran bestimmte Enzyme freigesetzt, welche sich daraufhin im Zellmedium auffinden las-

sen. Eines davon ist die stabile Lactatdehydrogenase (LDH), die in allen Zellen vorkommt und im Folgenden zur Bestimmung der Zytotoxizität benutzt wurde (Abbildung 9). Zur indirekten Mengenbestimmung der LDH wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* der Firma Roche verwendet, unter Verwendung des beigefügten ein Protokoll zur Durchführung des Experiments.

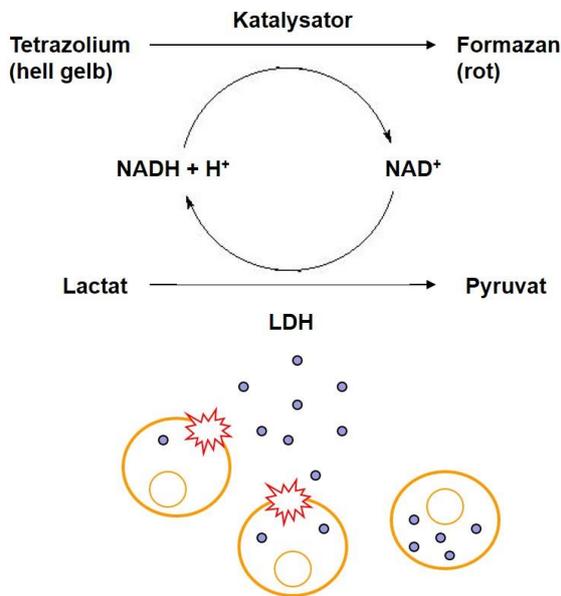


Abbildung 9: Messprinzip eines LDH-Assays.

Die von den sterbenden Zellen abgegebene Lactatdehydrogenase (LDH) setzt NAD⁺ zu NADH/H⁺ um, welches daraufhin mit Hilfe eines beigesezten Katalysators das hell gelbe Tetrazolium in tief rotes Formazan umwandelt. Dieser Farbumschlag wird mit dem ELISA quantitativ gemessen. (modifiziert aus: Herstellerprotokoll Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche, Version Juli 2005)

Die Jurkat-Zellen wurden in 24-Well Platten kultiviert und entsprechend des Versuchsaufbaus stimuliert beziehungsweise inhibiert. 24 h nach Stimulation wurden die Zellen in 1,5 ml Eppendorfcups überführt und bei 1600 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Überstandes entnommen und in eine 96-Well Platte pipettiert. Das nach Anleitung vorbereitete Reagenz wurde im Verhältnis 1:1, das heißt ebenfalls 100 µl, auf die vorbereiteten Überstände gegeben und 0,5 h beziehungsweise 1 h lichtgeschützt inkubiert. Der Farbumschlag wurde im ELISA Reader bei 490 nm gemessen und die OD bestimmt.

II.8 Statistik

Die Daten wurden durch eine one-way-ANOVA mit anschließendem Bonferroni's multiple comparison Post-HocTest innerhalb der GraphPad Prism4 Software ausgewertet.

III. MATERIAL

Zelllinie:

Name	Spezies	Zelltyp	Firma	Produktnummer
Jurkat	Mensch	T-Zell Leukämie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH	ACC-282

Fertige Arbeitskits:

Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim, Deutschland
QIAamp™ RNA Blood Mini Kit	Thermo Scientific (Pierce), Langenselbold, Deutschland
Quanti Fast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quantikine® Human sTNF RI/TNFRSF1A ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Revert Aid™ First Strand Synthesis Kit	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA

Primer: (5' → 3')

Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

hu Caspase 8	fw: AGGAGGAGATGGAAAGGGA ACTT rv: ACCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT
hu cFlip	fw: AAGCAGCAATCCAAAAGAGTC rv: CCCAGGGAAGTGAAGGTGT
hu GAPDH	fw: CCACATCGCTCAGACACCAT rv: GGCAACAATATCCACTTTACCAGA

Stimulantien/Inhibitoren:

Rekombinantes, humanes TNF-alpha	PELOBiotech, Planegg, Deutschland	#PB-Z3001-1000
InSolution™ SB 203580	Calbiochem, San Diego, USA	#559398

Antikörper:

Antigen	Quelle	Firma	Artikel-Nr.	Anwendung
anti-rabbit	Ziege	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#7074	Western Blot
β-Actin	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#4967	Western Blot
CD120a (Biotin Mouse Anti-Human)	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	550900	FACS
Caspase 3	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#9662	Western Blot
Caspase 8	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#4790	Western Blot
Caspase 9	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#9502	Western Blot
Flip	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#8510	Western Blot
GAPDH	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#2118	Western Blot
Isotypkontrolle IgG2a, κ (Biotin gekoppelt)	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	551074	FACS
PARP	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#9542	Western Blot
TNF-R1	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#3736	Western Blot
Tubulin β	Hase	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland	#2128	Western Blot

Interkalierender Farbstoff:

7AAD	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	559925	FACS
------	---	--------	------

Streptavidin:

Streptavidin PerCP Cy 5.5	Ebioscience, San Diego, USA	FACS
---------------------------	-----------------------------	------

Proteinladder:

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
---------------------------------------	--------------------------------------

Chemikalien:

Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovine Serum Albumine, Fraction V (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ecotrain® destilliertes Wasser	Braun, Melsungen, Deutschland
Ethanol (100 %)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Neolab, Heidelberg, Deutschland
non-fat Milchpulver	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
10fach PBS (steril)	Lonza, Köln, Deutschland
Rotiophorese Gel 30 (30 % Acrylamid-Mix)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution	Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution	Thermo Scientific, Rockford, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland

Puffer und Lösungen:

BSA-Lösung	TBST 5 % BSA
FACS-Puffer (10x, 1 L)	5 % BSA 0,2 % NaN ₃ gelöst in 1 L PBS (1x)
Ladepuffer (6x, 100 ml)	3,75 M Tris pH 6,8 55 % Glycerin 12 % SDS 5 M β-Mercaptoethanol 0,002 % Bromphenolblau

Laufpuffer (10x) (Rotiophorese® 10x SDS- PAGE)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysierpuffer (500ml für Proteinisolation)	300 mM NaCl 40 mM Tris pH 7,4 2 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % NP40 0,01 % NaN ₃
Milch	TBST 5 % non-fat Milchpulver
PBS (10x, 10 L)	800 g NaCl 20 g KH ₂ PO ₄ 144 g Na ₂ HPO ₄ 24 g KCL gelöst in 10 L dest. Wasser, pH=7,4
TBS (10x, 10 L)	246 g Tris 800 g NaCl gelöst in 10 L dest. Wasser, pH=7,6
TBST (1x, 10 L)	1 L TBS (10x) 9 L dest. Wasser 0,01% Tween 20
Transferpuffer	10 % Laufpuffer 20 % Methanol 70 % dest. Wasser

Zellmedien:

RPMI 1640	PAN™ BIOTECH GmbH, Aidenbach, Deutschland
Kulturmedium	RPMI 1640 10 % FBS
Einfrriermedium	FBS 10 % DMSO

Einwegmaterial:

Gewebekulturflaschen, 250ml, 75cm ² , mit Filter	GreinerBioOne, Frickenhausen, Deutschland
FACS-Röhrchen (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Küvette (RNA-Quantifizierung)	BIO RAD, München, Deutschland
Küvetten (Bradford Assay)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen CRYO.S™	GreinerBioOne, Frickenhausen, Deutschland
Hybond ECL (Nitrocellulosemembran)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäß PP (0,2 ml, RNase-, DNA- und Pyrogenfrei)	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Polycarbonatkapillaren (PCR)	Genaxxon, Ulm, Deutschland
6- bzw. 96-Well-Platten	GreinerBioOne, Frickenhausen, Deutschland
1,5 bzw. 2 ml Eppendorfcups	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
15 bzw. 50 ml BD Falcon™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Maschinelle Hilfsmittel:

FACSCalibur flow cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fusion FX7	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Light Cycler 1.5	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan EX	Thermo scientific, Waltham, USA
Neubauer improved Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
SmartSpec™ Pus Spectrophotometer	BIO RAD, München, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-dry transfer cell	BIO RAD, München, Deutschland
TPersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland

IV. ERGEBNISSE

IV.1 TNF α führt zu einer erhöhten Rate apoptotischer Jurkat-Zellen in der Durchflusszytometrie

Eine Methode zur Bestimmung der Apoptoserate von Zellen ist ihr Nachweis in der FACS-Analyse mit dem interkalierenden Farbstoff 7AAD. Der Nachweis 7AAD positiver Zellen ist ein Marker für den Verlust der Zellintegrität, welcher im Rahmen der Apoptose stattfindet. Zu diesem Zweck wurde die Apoptoserate der Jurkat-Zellen jeweils 24 h und 48 h nach der Stimulation mit TNF α in verschiedenen Konzentrationen (0, 10, 50, 100, 300, 500 ng/mL) als Suspension im *FACSCalibur* nach der Färbung mit 7AAD gemessen. Um einen möglichen Einfluss von p38 auf die TNF α -induzierte Apoptose CD4⁺ T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden ebenso Messungen nach der zusätzlichen Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 beziehungsweise DMSO als Kontrolle durchgeführt.

Im Vergleich von unbehandelten Jurkat-Zellen zu jenen, die mit TNF α stimuliert wurden, zeigte sich eine Steigerung der 7AAD positiven Zellen nach 24 h von 2 % auf bis zu 4 % ($p < 0,001$ %, Abbildung 10 A) beziehungsweise von 3 % auf bis zu 6 % nach 48 h ($p < 0,001$ %, Abbildung 10 B). Die dabei gemessene Apoptoserate nahm abhängig von der steigenden Stimulationskonzentration an TNF α zu. Ebenso führte eine steigende Stimulationskonzentration an TNF α auch bei Jurkat-Zellen, die mit SB103580 oder DMSO behandelt wurden, zu einer Zunahme 7AAD positiver Zellen ($p < 0,05$ %, $p < 0,01$ % sowie $p < 0,001$ %, Abbildung 10 C – F). Es konnte somit gezeigt werden, dass steigende Stimulationskonzentrationen an TNF α einen direkten Einfluss auf den Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen nehmen, dies jedoch ohne die Vermittlung von p38 geschieht. Ein erhöhter prozentualer Anteil 7AAD positiver Jurkat-Zellen nach der zusätzlichen Inhibition von p38 durch SB203580 im Vergleich zu jenen Jurkat-Zellen, die alleinig durch TNF α stimuliert wurden ($p < 0,01$ % sowie $p < 0,001$ %), konnte unter Berücksichtigung der Kontrollstimulation mit DMSO auf die Zytotoxizität des DMSOs zurückgeführt werden ($p > 0,05$ %).

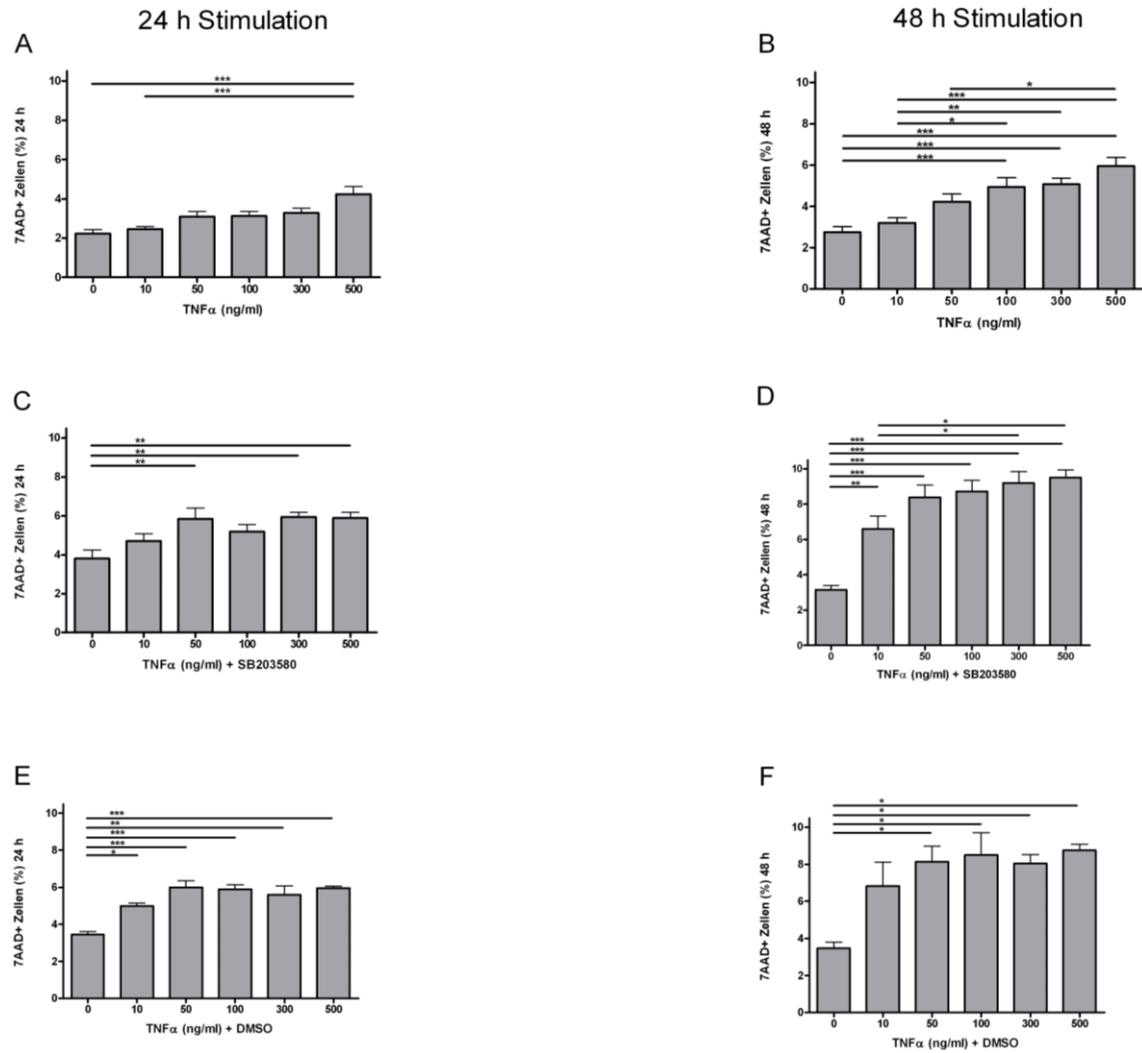


Abbildung 10: Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit TNFα und der Inhibition von p38 in der Durchflusszytometrie.

Um den Einfluss steigender Konzentrationen an TNFα und der Inhibition von p38 auf die Apoptoserate CD4+ T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden 7AAD positive Jurkat-Zellen 24 h und 48 h nach der durchgeführten Stimulation mit TNFα in der Durchflusszytometrie quantifiziert. Nach der alleinigen Behandlung mit TNFα konnte eine Zunahme der 7AAD positiven Jurkat-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an TNFα nach 24 h (A) und 48 h (B) beobachtet werden. Nach der zusätzlichen Inhibition von p38 mit SB203580 war nach 24 h (C) sowie 48 h (D) bei steigender Stimulationskonzentrationen an TNFα ebenfalls eine Zunahme der Apoptoserate erkennbar. Die Zunahme der 7AAD positiven Jurkat-Zellen nach der Inhibition von p38 (C, D) im Vergleich zu denen, welche eine alleinige Stimulation mit TNFα erfuhren (A, B), konnte unter Berücksichtigung der Kontrolle mit DMSO, das als Lösungsmittel für den Inhibitor diente, nach 24 h (E) und 48 h (F) als alleiniger DMSO-Effekt demaskiert werden. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001)

IV.2 Der Western-Blot als Methode zur Quantifizierung der Expression apoptoserelevanter Proteine in Jurkat-Zellen

Um das Apoptoseverhalten der Jurkat-Zellen auch auf Proteinebene messen zu können, wurden durch das Verfahren des Western Blots die apoptoserelevanten Proteine *cleaved* Poly ADP-ribose Polymerase (PARP), cFlip, (*cleaved*) Caspase 3, Caspase 8 sowie Caspase 9 bezogen auf ein *housekeeping* Protein (GAPDH, β -Aktin oder β -Tubulin), quantitativ gemessen. Die Darstellung der einzelnen Diagramme wurde dabei so gewählt, dass die Proteinmenge der unstimulierten Zellen als Ausgangswert, das heißt 1 = 100 % angesehen wurde und die jeweiligen Mengen der unterschiedlich stimulierten Zellen zu diesem ins Verhältnis gesetzt wurden.

IV.2.1 Die Stimulation durch TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die zelluläre Proteinkonzentration von *cleaved* PARP in Jurkat-Zellen

PARP ist ein Enzym, das den Körperzellen bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen in der DNA behilflich ist. Bei dem Vorgang der Apoptose wird es abgebaut und in seine gespaltene Form, *cleaved* PARP, überführt. Um eine mögliche Änderung im Apoptoseverhalten der Jurkat-Zellen zu untersuchen, wurden die Mengen an *cleaved* PARP normiert auf β -Aktin in den Jurkat-Zellen 24 h beziehungsweise 48 h nach der Stimulation mit TNF α und gegebenenfalls der Inhibition von p38 gemessen. Es konnte jedoch keine Veränderung in der zellulären Proteinkonzentration der gespaltene Form *cleaved* PARP (Abbildung 11 A und B) durch die Stimulation mit TNF α beobachtet werden ($p > 0,05$ %). Auch die Inhibition von p38 nahm darauf keinen messbaren Einfluss ($p > 0,05$ %, Abbildungen 11 C und D). Es wurde zusätzlich eine Kontrollmessung mit dem Lösungsmittel von SB203580, DMSO, durchgeführt (Abbildungen 11 E und F).

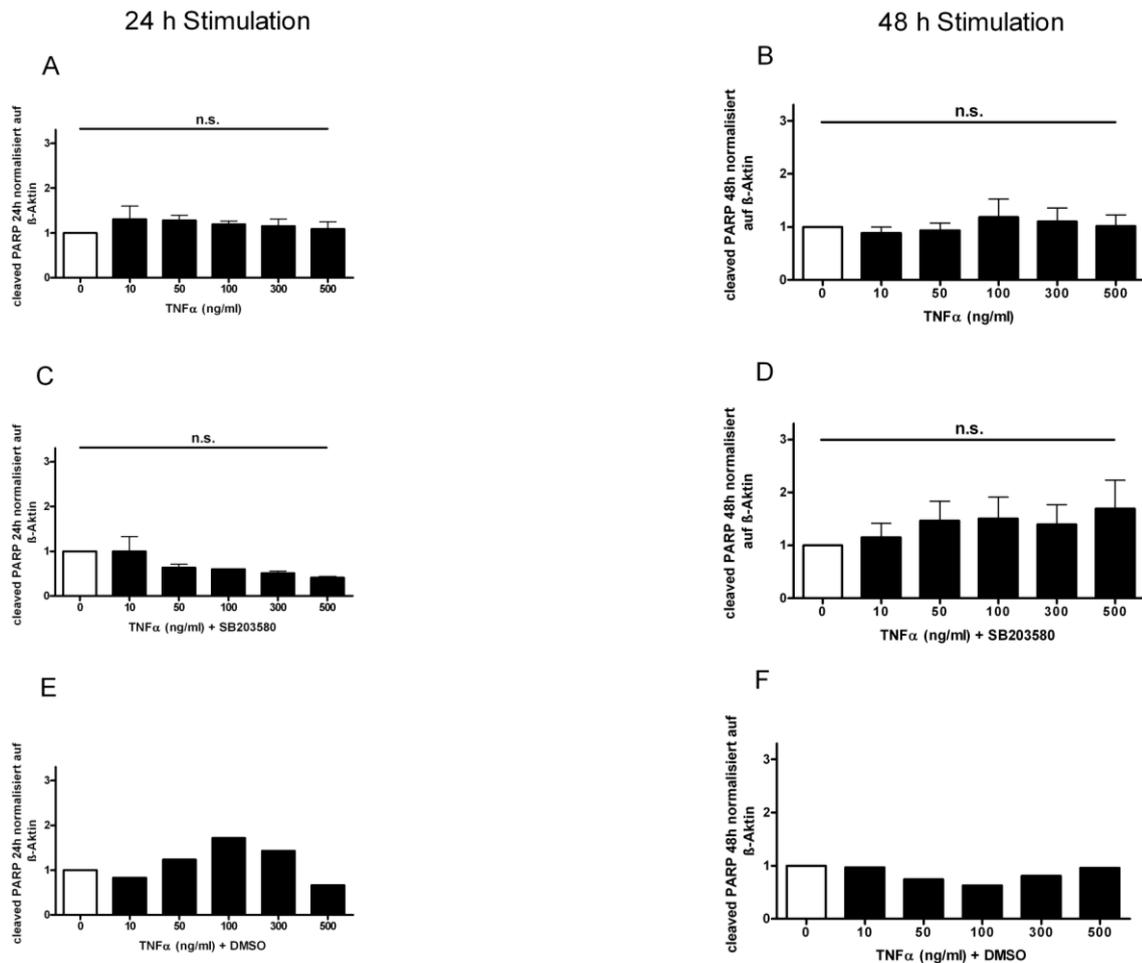


Abbildung 11: Semiquantitative Messung der Proteinexpression von *cleaved* PARP nach der Simulation mit TNFα und der Inhibition von p38.

Analog zu der vermehrten Spaltung von PARP im Rahmen der Apoptose, nimmt im gleichen Verhältnis die Menge der gespaltenen Form, *cleaved* PARP, in apoptotischen Zellen zu. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch TNFα, gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration an *cleaved* PARP in den Jurkat-Zellen. Eine Stimulation mit TNFα nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde als Kontrolle ebenfalls durchgeführt und die Menge an *cleaved* PARP wie schon zuvor nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf β-Aktin gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

IV.2.2 Die Stimulation durch TNFα und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von cFlip in Jurkat-Zellen

cFlip ist ein anti-apoptotisches Protein, das die rezeptorvermittelte Apoptose inhibiert und unter anderem ein physiologischer Inhibitor von Caspase 8 ist (Safa 2012). Eine in den Jurkat-Zellen stattfindende Apoptose könnte sich einer veränderten zellulären Konzentration von cFlip widerspiegeln. Aus diesem Grund wurde die Expression von cFlip in den Jurkat-Zellen 24 h und 48 h nach der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an TNFα gemessen. Die gemessene Menge an zellulärem cFlip wurde dabei auf die jeweilige Konzentration an β-Aktin normiert. Jedoch konnte auch in der Expression von cFlip weder 24 h oder 48 h nach der Stimulation mit TNFα (Abbildung 12 A und B)

noch nach der Behandlung mit dem p38-Inhibitor (Abbildung 12 C und D) eine signifikante Veränderung gemessen werden ($p > 0,05$ %). Neben der Stimulation mit $TNF\alpha$ wurden ebenso Zellen zusätzlich mit DMSO behandelt (Abbildung 12 E und F).

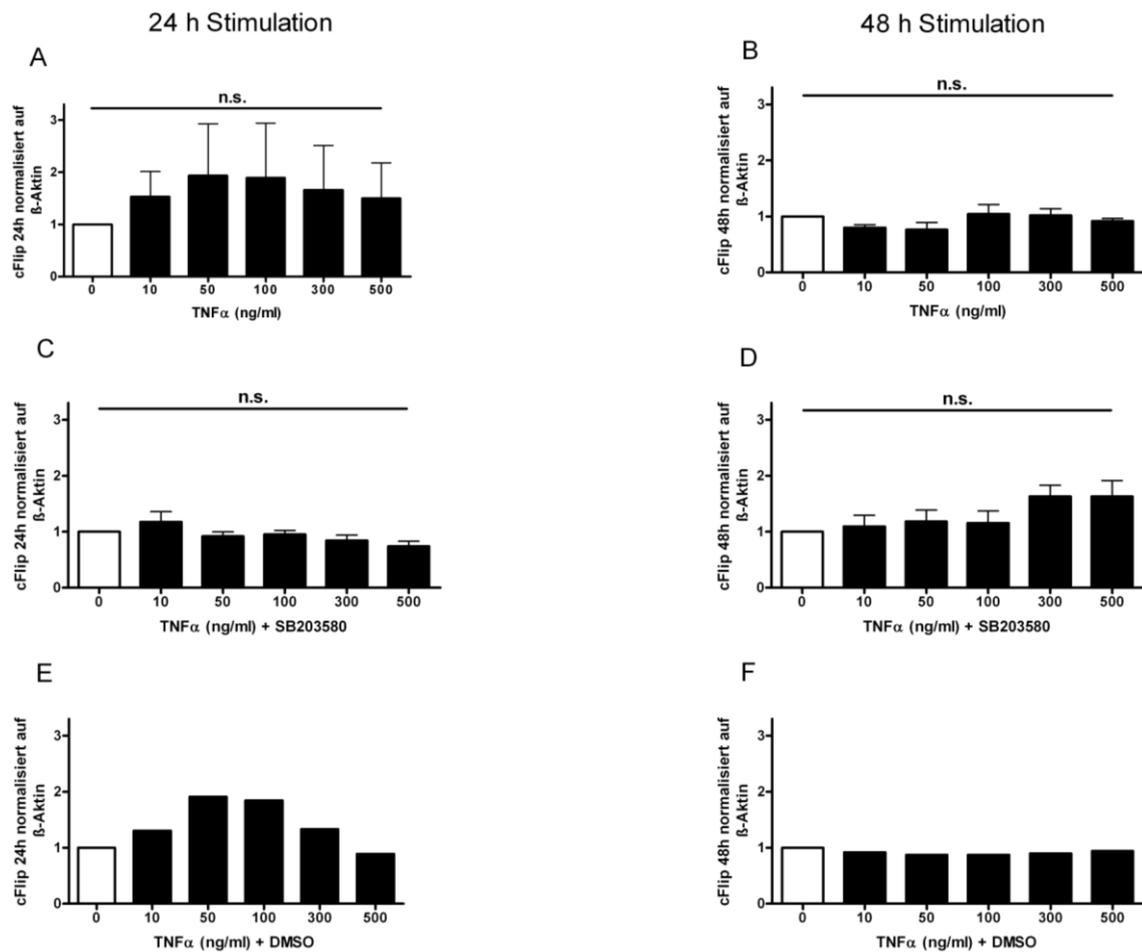


Abbildung 12: Semiquantitative Messung der Proteinexpression von cFlip nach der Simulation mit $TNF\alpha$ und der Inhibition von p38.

cFlip ist ein anti-apoptisches Protein dessen zelluläre Konzentration invers mit einer gesteigerten Apoptose korreliert. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch $TNF\alpha$, gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration an cFlip in den Jurkat-Zellen. Eine Stimulation mit $TNF\alpha$ nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge an cFlip nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf β -Aktin gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

IV.2.3 Die Stimulation mit $TNF\alpha$ und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Caspase 3 und cleaved Caspase 3 in Jurkat-Zellen

Caspase 3 und dessen gespaltene und aktivierte Form *cleaved* Caspase 3 können als Schlüsselproteine in der Ausführung von Apoptose gesehen werden. Caspase 3 befindet sich *downstream* in der Aktivierungskaskade von anderen Caspasen wie den Caspasen 8 und 9 und spaltet seines Zeichens selbst Proteine wie die PARP oder die Caspasen 6

und 7 (Rassow, Hauser et al. 2016). Um das Apoptoseverhalten der Jurkat-Zellen quantifizieren zu können, wurde untersucht, ob die Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF α und die Hemmung von p38 durch SB203580 einen Einfluss auf die zelluläre Expression dieser Proteine in den Jurkat-Zellen nimmt.

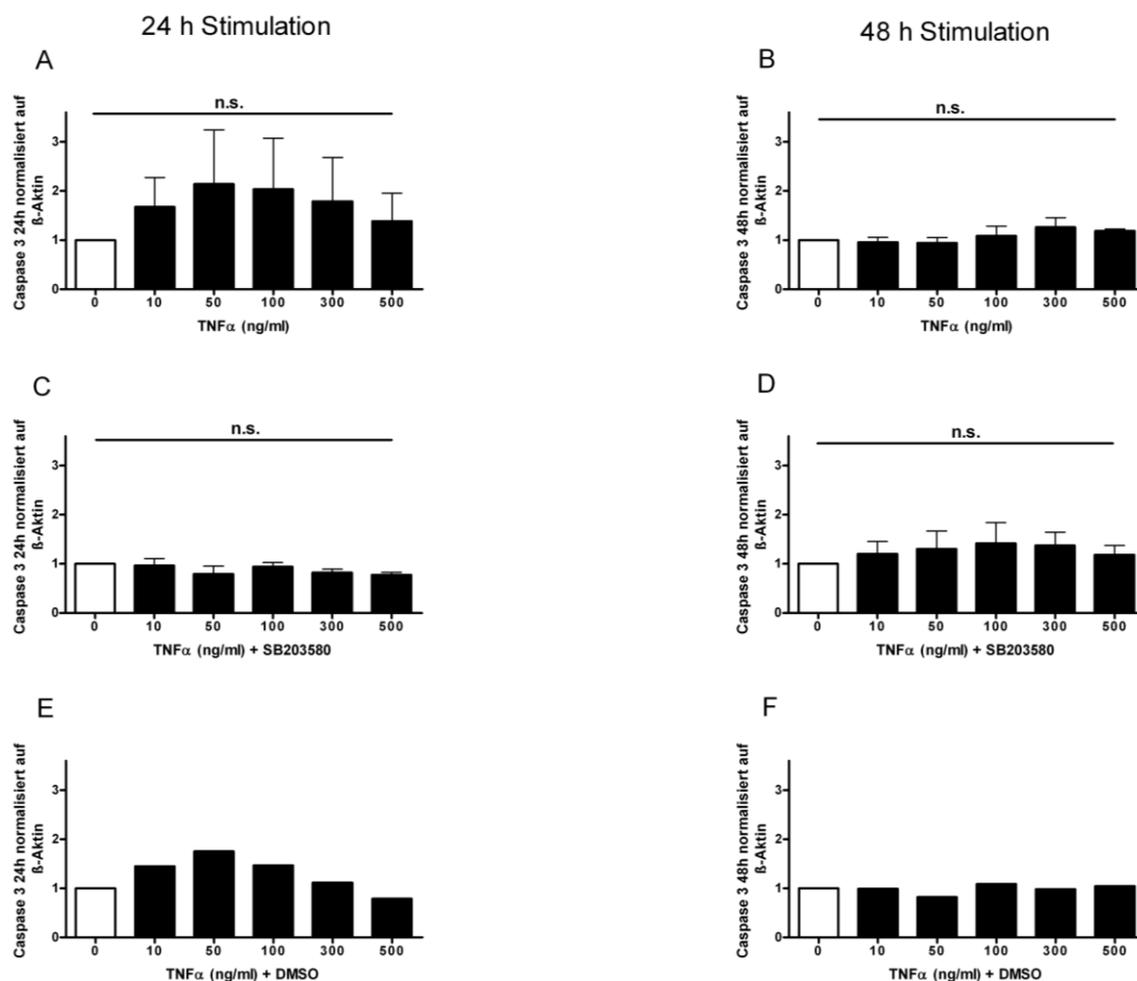


Abbildung 13: Semiquantitative Messung der Proteinexpression von Caspase 3 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.

Caspase 3 ist ein Bestandteil der Caspasenkaskade und somit maßstäblich an der Vermittlung der Apoptose beteiligt. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch TNF α , gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration an Caspase 3 in den Jurkat-Zellen. Eine Stimulation mit TNF α nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge an Caspase 3 nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf β -Aktin gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

Die aus den lysierten Jurkat-Zellen gewonnenen Proteine wurden, nachdem sie in der Gelelektrophorese Ihrer Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran geblottet wurden, unter anderem mit dem Primärantikörper gegen Caspase 3 inkubiert. Dieser bildete neben der Bande für die ursprünglich exprimierte Form der Caspase 3 mit dem Molekulargewicht von 35 kDa eine weitere Bande für die gesplattene und somit aktivierte Form mit einer Größe von 17 kDa. Die gemessene Proteinmenge wurde normiert auf das

housekeeping Protein β -Aktin angegeben. Jedoch konnte bei der semiquantitativen Auswertung keine Veränderung in der Proteinmenge von Caspase 3 und *cleaved* Caspase 3 detektiert werden. Die verschiedenen Messzeitpunkte und Stimulationskonzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ (Abbildungen 13 und 14, jeweils A und B) sowie die Inhibition mit SB203580 (Abbildungen 13 und 14, jeweils C und D) nahmen keinen messbaren Einfluss auf die Proteinexpression ($p > 0,05$ %). Eine Kontrollmessung mit DMSO, als das Lösungsmittel des p38 Inhibitors, wurde ebenfalls durchgeführt (Abbildungen 13 und 14, jeweils E und F).

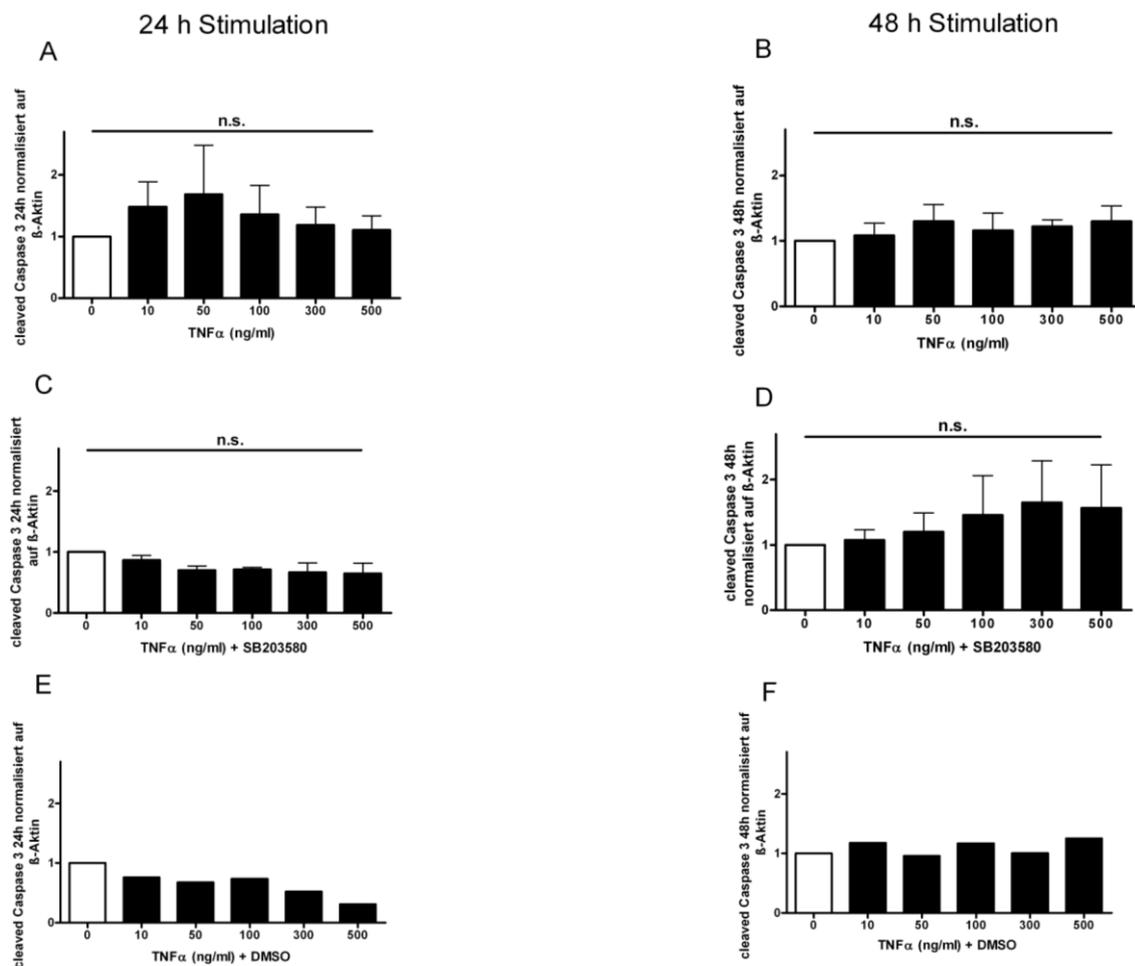


Abbildung 14: Semiquantitative Messung der Proteinexpression von *cleaved* Caspase 3 nach der Simulation mit $\text{TNF}\alpha$ und der Inhibition von p38.

Cleaved Caspase 3 ist die gesplattene und aktivierte Form der Caspase 3, welche ein zentraler Vermittler der Apoptose ist. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch $\text{TNF}\alpha$, gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration an *cleaved* Caspase 3 in den Jurkat-Zellen. Eine Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge an *cleaved* Caspase 3 nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf β -Aktin gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

IV.2.4 Die Stimulation mit TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Caspase 8 in Jurkat-Zellen

Caspase 8 ist ein Enzym, welches vor allem bei der Vermittlung der durch Rezeptor aktivierten Apoptose eine Rolle spielt (Rassow, Hauser et al. 2016). Da das Apoptoseverhalten der CD4+ T-Lymphozyten quantifiziert werden sollte, wurde die normierte Proteinmenge an Caspase 8 in den Jurkat-Zellen bestimmt. Die Messungen fanden jeweils 24 h und 48 h nach der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an TNF α beziehungsweise der Inhibition von p38 statt. Die Konzentrationen wurden auf das *housekeeping* Protein β -Aktin normiert.

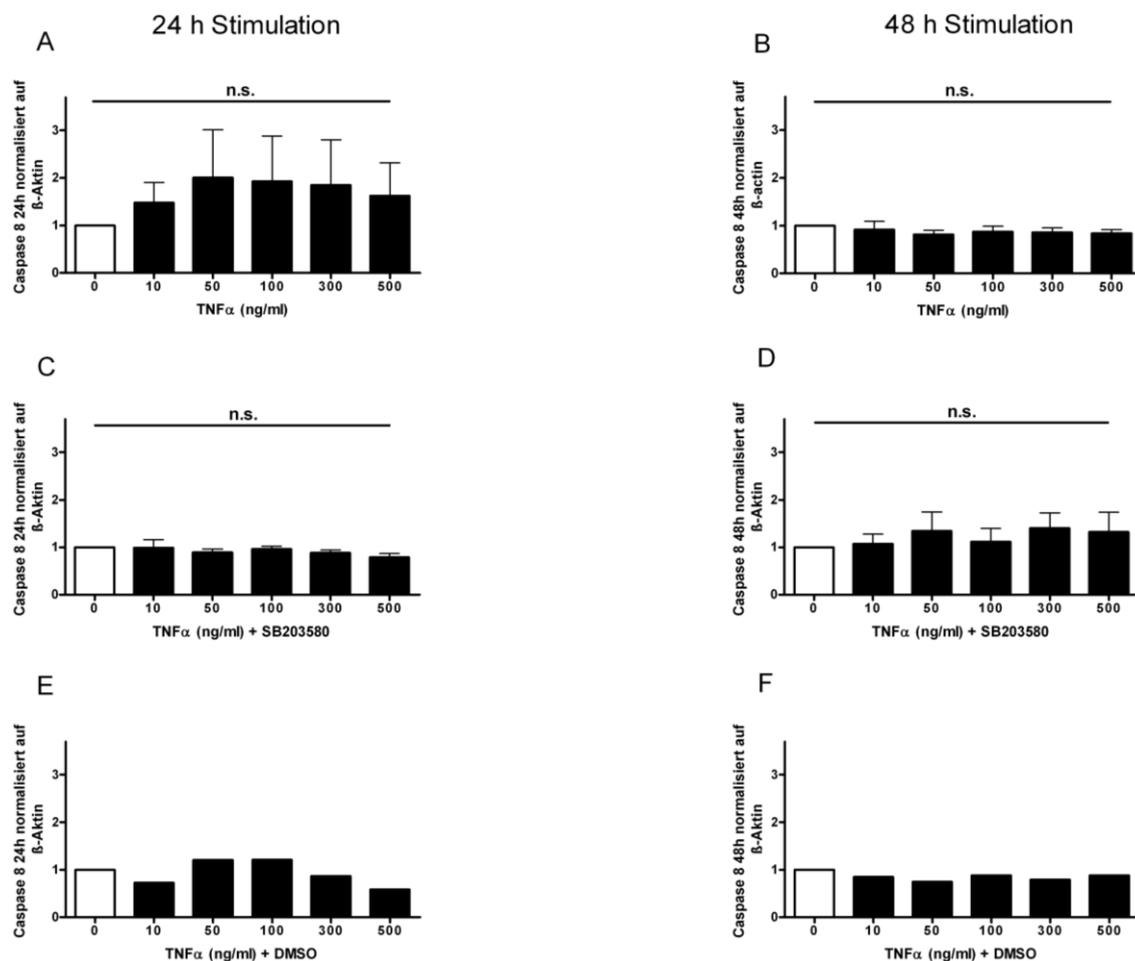


Abbildung 15: Semiquantitative Messung der Proteinexpression von Caspase 8 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.

Caspase 8 nimmt eine wichtige Rolle in der Signalkaskade rezeptorvermittelter Apoptose ein. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch TNF α , gemessen nach 24 h (A) und 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration an Caspase 8 in den Jurkat-Zellen. Eine Stimulation mit TNF α nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge an Caspase 8 nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf β -Aktin gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

In der Auswertung zeigten jedoch weder die Zellen, welche mit TNF α (Abbildung 15 A und B) noch jene, die zusätzlich mit SB203580 behandelt wurden (Abbildung 15 C und D), eine Änderung in der Proteinexpression von Caspase 8 ($p > 0,05$ %). Die sogenannte *cleaved* und damit aktivierte Form der Caspase 8 konnte nicht detektiert werden. Es wurde zusätzlich eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO durchgeführt (Abbildung 15 E und F).

IV.2.5 Die Stimulation mit TNF α und die Inhibition von p38 nehmen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Caspase 9 in Jurkat-Zellen

Caspase 9 ist ein Bestandteil der Caspasenkaskade, die durch den intrinsischen, mitochondrial vermittelten Aktivierungsweg in Gang gesetzt wird (Rassow, Hauser et al. 2016). In dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Konzentrationen an TNF α , unter der Berücksichtigung der Rolle von p38, auf das Apoptoseverhalten von CD4⁺ T-Lymphozyten untersucht werden. Aus diesem Grund wurde die zelluläre Proteinmenge an Caspase 9 in Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit TNF α in verschiedenen Konzentrationen und der gegebenenfalls durchgeführten Inhibition von p38 bestimmt. Die Messzeitpunkte lagen 24 h und 48 h nach der Stimulation mit TNF α . Die Proteinkonzentration wurde dabei auf das *housekeeping* Protein β -Tubulin normiert.

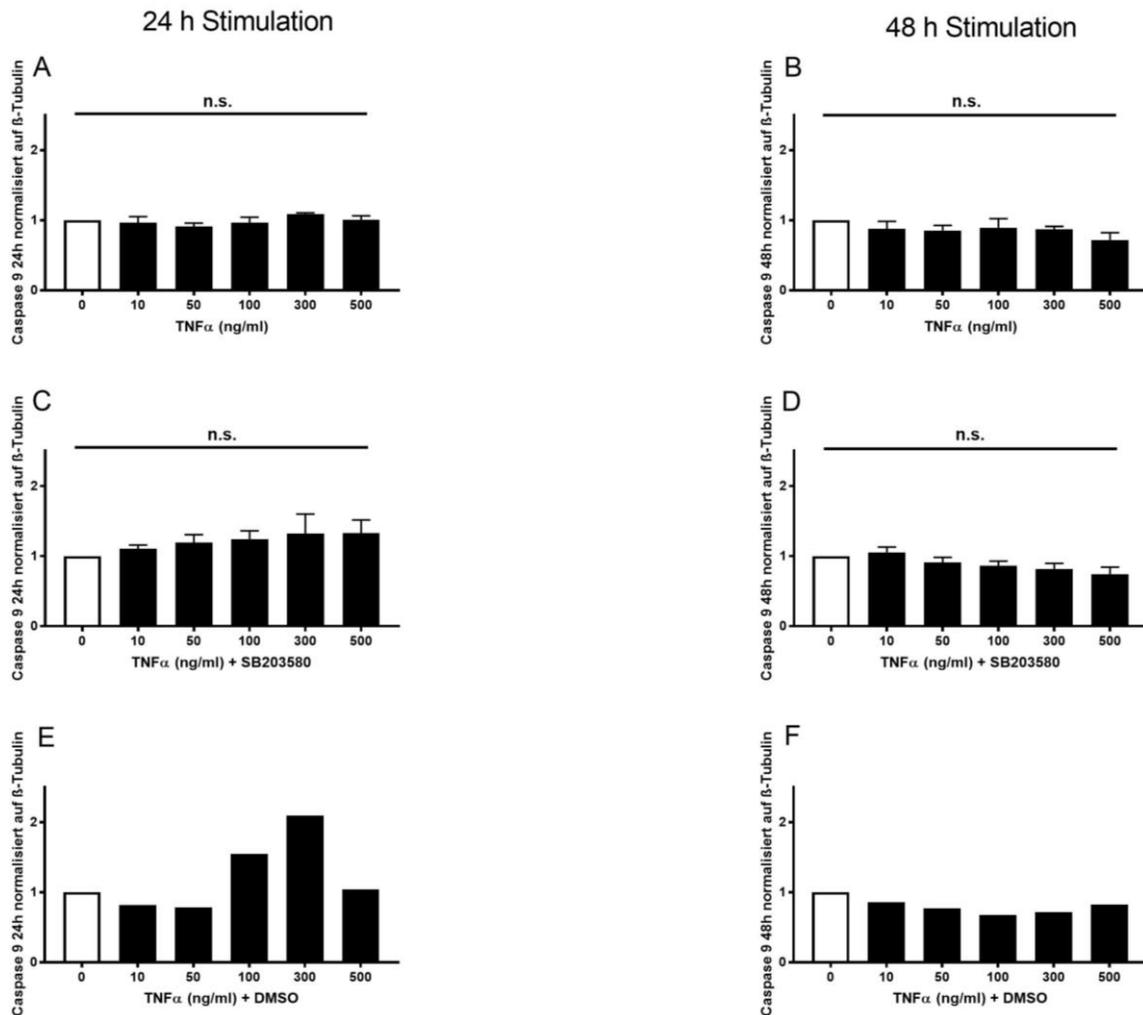


Abbildung 16: Semiquantitative Messung der Proteinexpression von Caspase 9 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.

Caspase 9 nimmt eine wichtige Rolle in der Signalkaskade der intrinsisch vermittelten Apoptose ein. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch TNF α , gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration an Caspase 9 in den Jurkat-Zellen. Eine Stimulation mit TNF α nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge an Caspase 9 nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf β -Tubulin gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

Die gemessene zelluläre Proteinmenge an Caspase 9 in Jurkat-Zellen ließ sich weder durch die steigenden Konzentrationen an TNF α (Abbildung 16 A und B) noch durch die Inhibition von p38 durch SB203580 (Abbildung 16 C und D) zu beiden verschiedenen Messzeitpunkten beeinflussen ($p > 0,05$ %). Eine Kontrollmessung nach Behandlung der Zellen mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ergänzend durchgeführt (Abbildung 16 E und F). Die sogenannte *cleaved* und damit aktivierte Form der Caspase 9 konnte nicht detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich über die Mengenbestimmung der zellulären, apoptoserelevanten Proteine sagen, dass sich die, in der Durchflusszytometrie gemessene, durch die steigenden Konzentrationen an TNF α ausgelöste Apoptose nicht in einer messbaren Veränderung des Proteinhaushaltes bemerkbar machte.

IV.3 Die zelluläre mRNA kodierend für Caspase 8 und cFlip ist nicht verändert

Es wurden mögliche Änderungen apoptoserelevanter Moleküle in Jurkat-Zellen auf die verschiedenen Stimulationsreize durch TNF α und die Inhibition von p38 auch auf der Ebene der transkribierten mRNA untersucht. Aus diesem Grund wurde diese aus den Zellen isoliert und die dazu gehörige cDNA revers transkribiert. In der RT-PCR wurden durch die Primer für Caspase 8 und cFlip genau jene DNA-Abschnitte amplifiziert, die für diese beiden Proteine codieren. Ähnlich der Auswertung der Proteinmengen wurde zusätzlich das Produkt eines *housekeeping* Gens gemessen (GAPDH) auf welches die CT-Absolutwerte von Caspase 8 und cFlip normiert wurden.

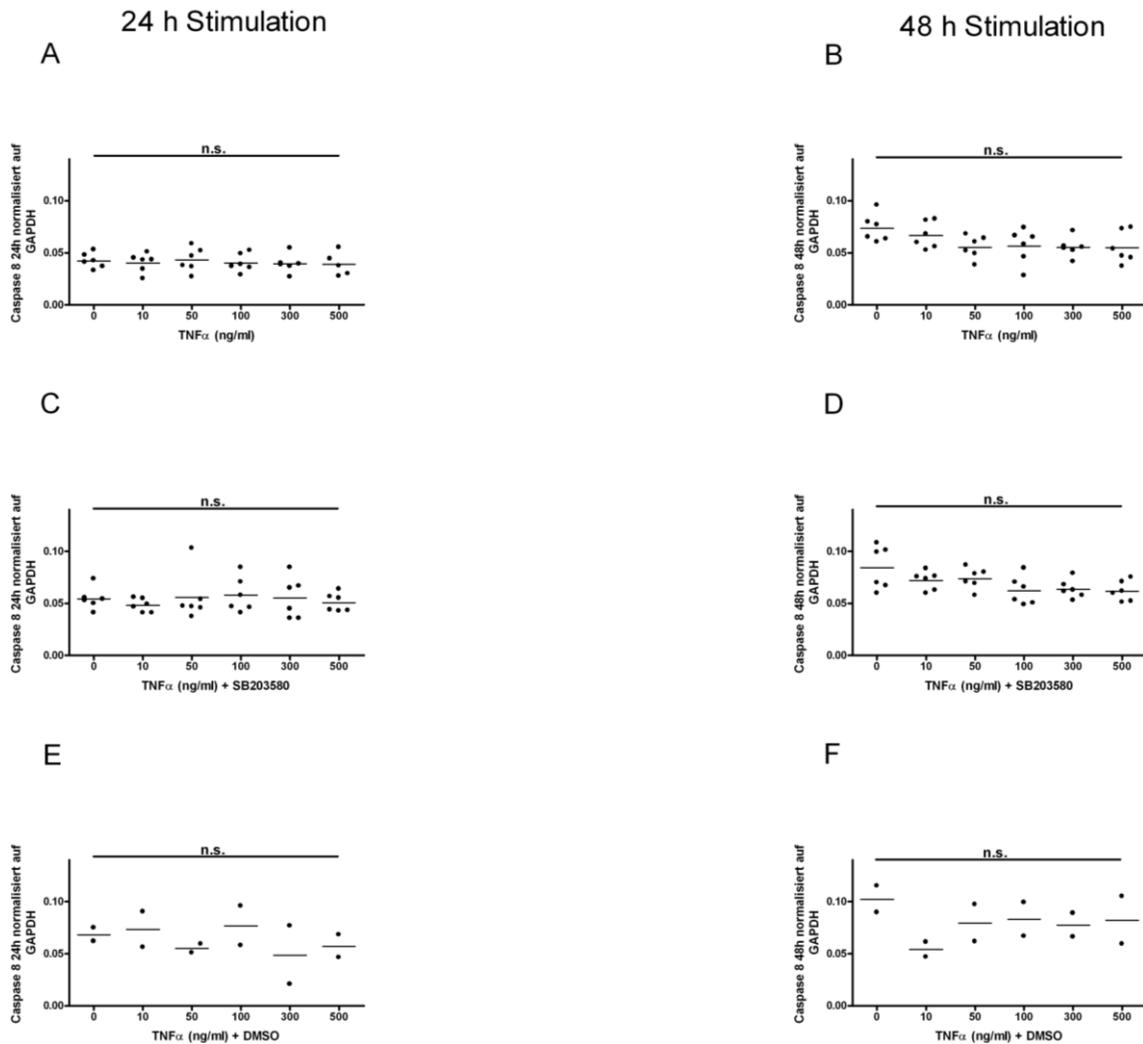


Abbildung 17: Expression der mRNA von Caspase 8 normiert auf GAPDH nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.

Die Expression der mRNA, kodierend für Caspase 8 in Jurkat-Zellen, wurde in Abhängigkeit von der Stimulation mit TNF α in verschiedenen Konzentrationen und der Inhibition von p38 gemessen. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch TNF α , gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration der mRNA von Caspase 8 in den CD4+ T-Lymphozyten. Eine Stimulation mit TNF α nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge der mRNA von Caspase 8 nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf GAPDH gemessen. (jeder Punkt in der graphischen Darstellung entspricht einer Messung, statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

Die gemessenen CT-Absolutwerte von Caspase 8 wurden durch die steigende Stimulation mit TNF α zu keinem der beiden Messzeitpunkte beeinflusst ($p > 0,05$ %, Abbildung 17 A und B). Auch die Inhibition von p38 nahm keinen Einfluss auf die Expression der mRNA von Caspase 8 ($p > 0,05$ %, Abbildung 17 C und D).

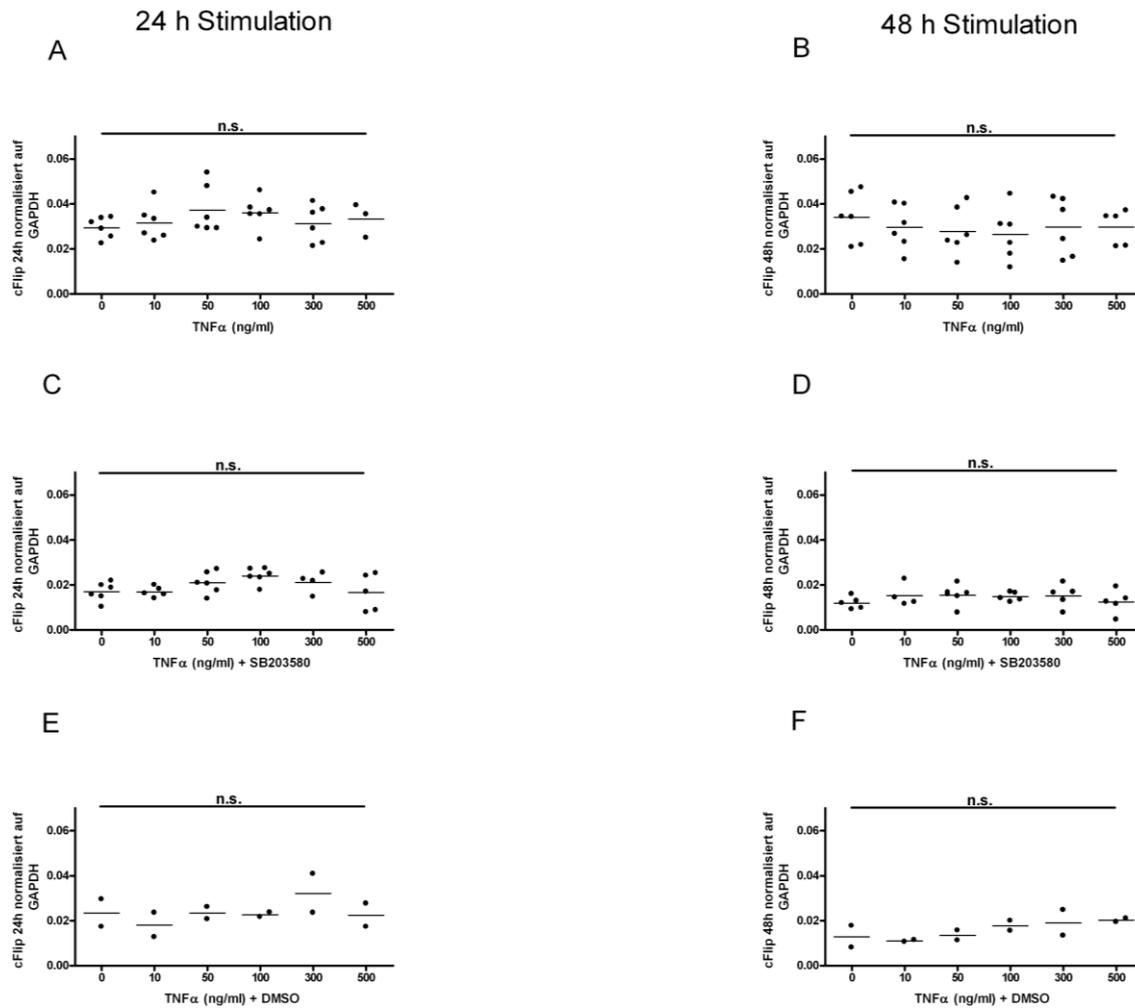


Abbildung 18: Expression der mRNA von cFlip normiert auf GAPDH nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.

Die Expression der mRNA, kodierend für cFlip, in Jurkat-Zellen wurde in Abhängigkeit von der Stimulation mit TNF α in verschiedenen Konzentrationen und der Inhibition von p38 gemessen. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch TNF α , gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration der mRNA von cFlip in den CD4+ T-Lymphozyten. Eine Stimulation mit TNF α nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge der mRNA von cFlip nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf GAPDH gemessen. (jeder Punkt in der graphischen Darstellung entspricht einer Messung, statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

Ähnlich verhielt es sich mit der quantifizierten Menge an mRNA kodierend für cFlip. Es zeigten sich keine Änderungen in den durch die RT-PCR gewonnenen CT-Werte von cFlip in den Jurkat-Zellen. Weder die Messzeitpunkte noch die unterschiedlichen Stimulationskonzentrationen mit TNF α (Abbildung 18 A und B) oder die Inhibition mit p38 (Abbildung 18 C und D) beeinflussten die Expression der mRNA von cFlip ($p > 0,05$ %). Eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO wurde ebenfalls für die Quantifizierung der mRNA von Caspase 8 und cFlip durchgeführt ($p > 0,05$ %, Abbildungen 18 und 19, jeweils E und F).

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung der Apoptose auf der Ebene der mRNA, ist die Bildung des Quotienten aus der Menge der exprimierten mRNA von cFlip und Caspase 8 in den betroffenen Zellen. Dieser wurde aus den gemessenen CT-Werten, zugehörig zu den beiden mRNAs, in den Jurkat-Zellen berechnet.

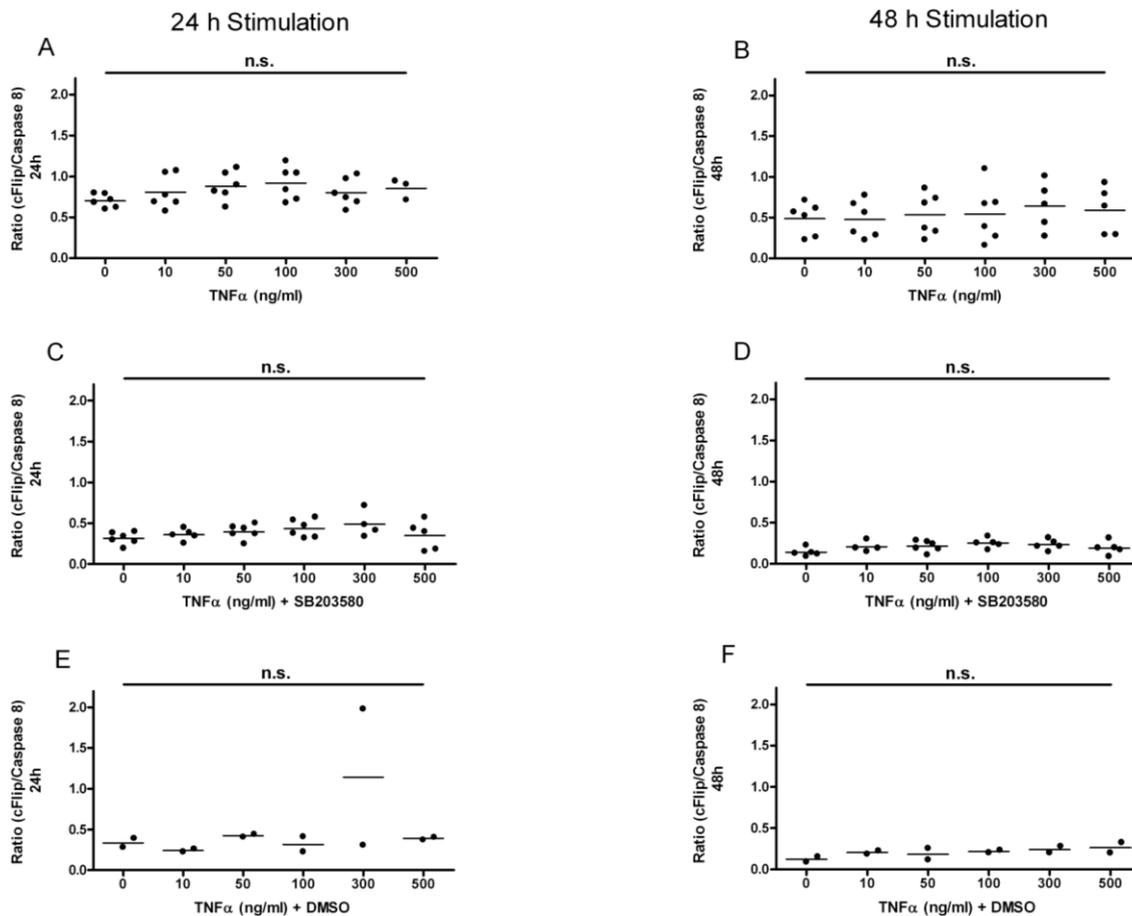


Abbildung 19: Quotient aus der mRNA-Expression von cFlip/Caspase 8 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.

Das Verhältnis aus der exprimierten mRNA von cFlip und jener von Caspase 8 kann als Marker für eine stattfindende Apoptose angesehen werden. Im Rahmen des programmierten Zelltodes würde sich das Verhältnis zu Gunsten von Caspase 8 verschieben. Der Quotient wurde aus den gemessenen CT-Werten von cFlip und Caspase 8 in Abhängigkeit von der Stimulation mit TNF α in verschiedenen Konzentrationen und der Inhibition von p38 bestimmt. Jedoch nahm weder die alleinige Stimulation durch TNF α , gemessen nach 24 h (A) und nach 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf den berechneten Quotienten aus der exprimierten mRNA von cFlip zu der von Caspase 8 in den CD4+ T-Lymphozyten. Eine Stimulation mit TNF α nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und der Quotient aus den gemessenen CT-Werten von cFlip zu Caspase 8 nach 24 h (E) und 48 h (F) berechnet. (jeder Punkt in der graphischen Darstellung entspricht einer Messung, statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

Dieser gebildete Quotient aus den normierten CT-Absolutwerten von cFlip und Caspase 8 wurde weder durch die Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen an TNF α (Abbildung 19 A und B) noch durch die Inhibition von p38 mit SB203580 (Abbildung 19 C und D) beeinflusst ($p > 0,05$ %). Der Quotient wurde ebenfalls für die Kontrollmessungen unter dem Einfluss von DMSO gebildet ($p > 0,05$ %, Abbildung 19 E und F).

Fasst man die Ergebnisse der Untersuchungen der Expression der mRNA apoptoserelevanter Proteine zusammen, zeigte sich, dass die Stimulation von Jurkat-Zellen mit steigenden Konzentrationen an TNF α beziehungsweise die Inhibition von p38 keinen Einfluss auf Expression der mRNAs, kodierend für Caspase 8 und cFlip, in diesen Zellen nahm. Dies geht mit den bereits beobachteten Ergebnissen des Western Blots einher. Es ist somit auszugehen, dass die in der Durchflusszytometrie gemessene gesteigerte Apoptose nicht ausreichte, um die Expression dieser mRNAs messbar zu beeinflussen.

IV.4 TNF α führt zu einer Verminderung der Proliferation von Jurkat-Zellen

Da das Zytokin TNF α bekannt dafür ist, neben der in dieser Arbeit im Fokus stehenden Apoptose auch eine, durch NF- κ B vermittelte, Steigerung der Zellproliferation zu bewirken (Schutze, Wiegmann et al. 1995; Baud, Karin 2001; Li, Lin 2008), wurde diese mit dem Zellproliferationsassay WST-1 gemessen. Dazu wurden die Zellen entsprechend der Stimulationen mit TNF α (0, 10, 50, 100, 300, 500 ng/ml) und dem p38 Inhibitor SB20358 beziehungsweise DMSO behandelt und nach 24 h das Assay ausgeführt. Gemessen wurde der dabei entstehende Farbumschlag nach 30 min, 1 h und 2 h bei einer Wellenlänge von 450 nm.

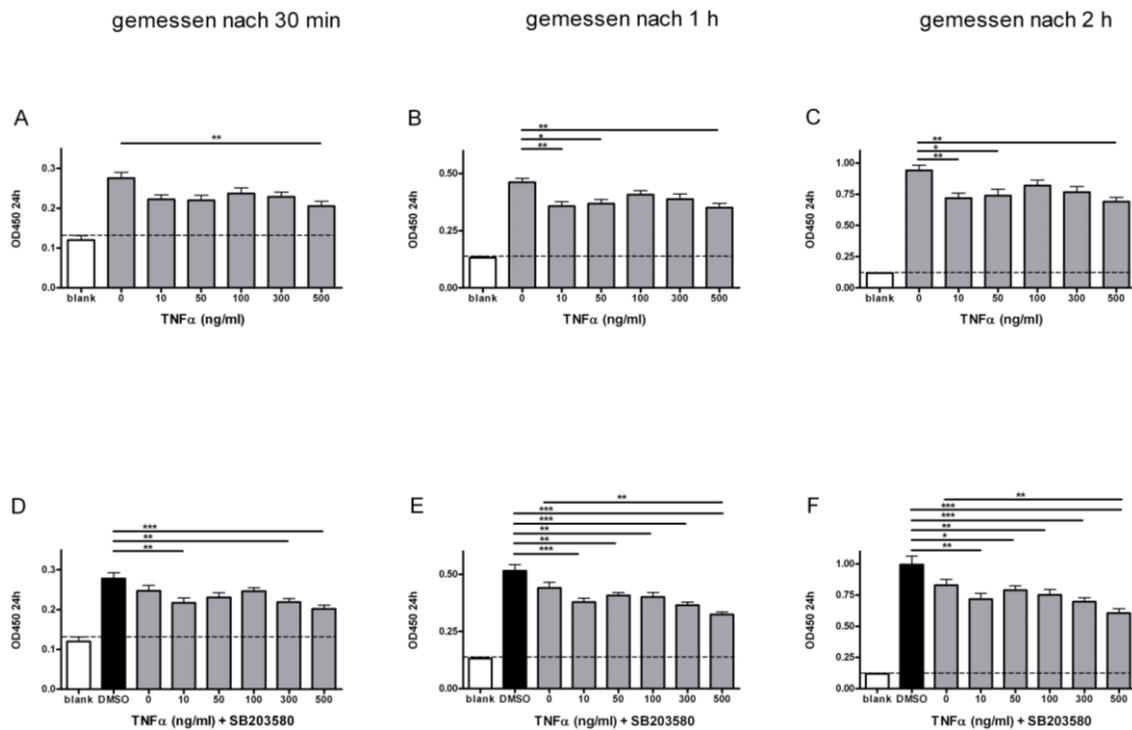


Abbildung 20: Proliferationsverhalten der Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit TNFα und der Inhibition von p38.

Um den Einfluss verschiedener Konzentrationen an TNFα und der Inhibition von p38 auf das Proliferationsverhalten von CD4+ T-Lymphozyten zu quantifizieren, wurde das Proliferationsassay WST-1 angewendet. Abhängig von den steigenden Stimulationskonzentrationen mit TNFα nach 24 h nahm die Zellproliferation der Jurkat-Zellen, gemessen nach 30 min, ab (A). Nach den Messzeiten von 1 h (B) und 2 h (C) zeigte sich dieses Verhalten noch deutlicher. Ähnlich verhielt es sich bei der zusätzlichen Inhibition von p38. Die Jurkat-Zellen zeigten, abgesehen von der Messung nach 30 min (D), eine TNFα-konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferationsrate gemessen nach 1 h (E) und 2 h (F). Es wurde eine unstimulierte Kontrollmessung mit alleiniger Behandlung mit DMSO durchgeführt, die keinen Unterschied in der Proliferationsrate zu der alleinig mit dem Inhibitor behandelten Probe zeigte (D – F). (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001)

Die Jurkat-Zellen zeigten eine verminderte Proliferationsrate in Abhängigkeit von der eingesetzten Stimulationsmenge an TNFα (p < 0,01 %, Abbildung 20 A – C). Dieser Effekt zeigte sich deutlicher, je länger die Zellen mit dem WST-1 Reagenz behandelt wurden (30 min, 1 h, 2 h). Jurkat-Zellen, welche zuvor mit dem p38-Inhibitor SB203580 behandelt und anschließend mit den gleichen Konzentrationen an TNFα stimuliert wurden, zeigten ein ähnliches Proliferationsverhalten. Während nach 30 min Inkubation mit dem WST-1 Reagenz keine Veränderung des Proliferationsverhalten der Zellen der stimulierten zur unstimulierten Probe gemessen werden konnte (p > 0,05 %, Abbildung 20 D), nahm die Zellteilungsrate der CD4+ T-Lymphozyten nach den Inkubationszeiten von 1 h und 2 h abhängig von der Stimulationskonzentration ab (p < 0,01 %, Abbildung 20 E und F). Die alleinige Behandlung der Zellen mit DMSO, welches als Lösungsmittel für den p38-Inhibitor diente, zeigte keinen Unterschied im Vergleich zur Wirkung zu der alleinig mit dem Inhibitor selbst behandelten Probe (p > 0,05 %, Abbildung 21 D – E).

Die Ergebnisse der Proliferationsassays ließen auf eine Abnahme der Zellteilung von Jurkat-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulationskonzentration mit TNF α , jedoch nicht von der Inhibition von p38 schließen. Dieses Verhalten ergänzte sich mit der gesteigerten Apoptoserate gemessen in der Durchflusszytometrie.

IV.5 Der durch TNF α induzierte Zelltod der Jurkat-Zellen ist nicht durch Zytotoxizität bedingt

Um die in der Durchflusszytometrie gemessene, TNF α -abhängig gesteigerte Apoptoserate der CD4+ T-Lymphozyten sicher dem programmierten Zelltod zuordnen zu können, wurde die Zytotoxizität mit Hilfe eines LDH-Assays gemessen. Die bei nekrotischen Veränderungen freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) führt bei diesem Assay zu einem Farbumschlag, der abhängig von der Konzentration an LDH mit einem Photometer quantifiziert werden kann. Gemessen wurde die optische Dichte 24 h nach der Stimulation mit TNF α in verschiedenen Konzentrationen (0, 10, 50, 100, 300, 500 ng/mL).

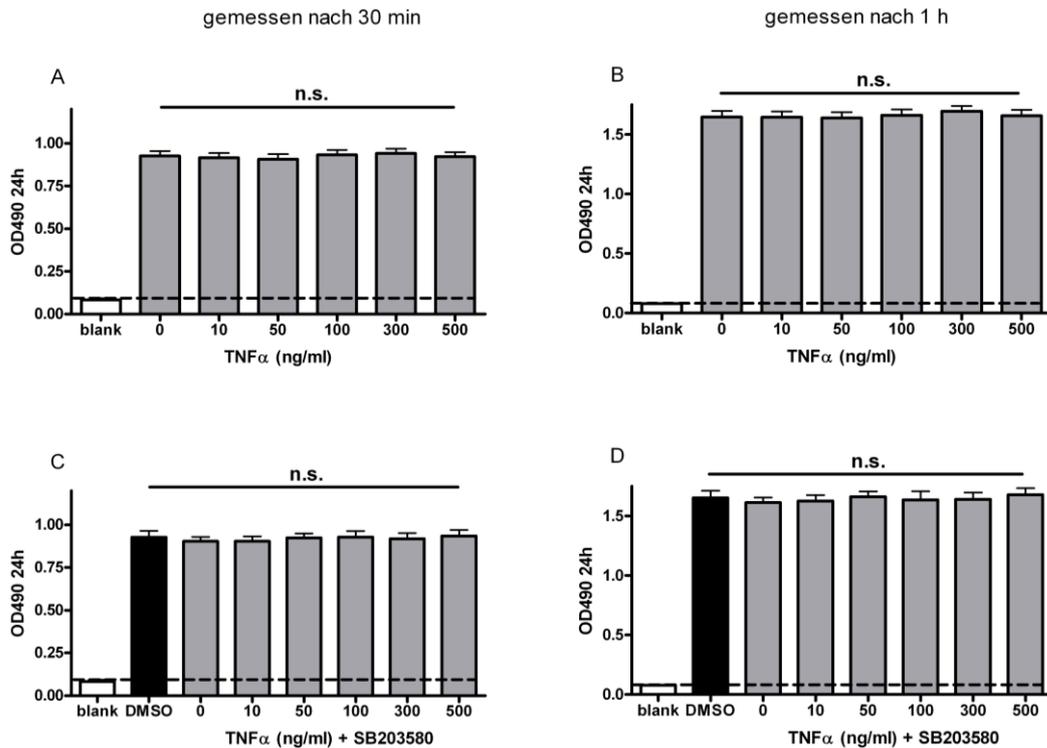


Abbildung 21: Fehlender Zytotoxizitätsnachweis im LDH-Assay nach der Stimulierung von CD4+ T-Lymphozyten mit TNF α .

Um auszuschließen, dass es sich bei dem in der Durchflusszytometrie gemessenen erhöhten Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit TNF α nicht um einen zytotoxischen Effekt handelte, wurde die Menge an freigesetzter LDH indirekt durch ein LDH-Assay quantifiziert. Dabei zeigte weder die alleinige Stimulation durch TNF α , gemessen 24 h nach der Stimulation und nach 30 min (A) und 1 h (B) nach Verwendung des LDH-Assays, noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die freigesetzten Konzentrationen der LDH. Die Menge an freigesetzter LDH unter der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle 24 h nach der Stimulation und nach 30 min (C) und 1 h (D) nach Verwendung des Assays gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

Es wurde jeweils 30 min (Abbildung 21 A und C) und 1 h (Abbildung 22 B und D) nach Verwendung des LDH-Assays die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die 24 h nach den durchgeführten Stimulationen der Jurkat-Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen an TNF α durch den Farbumschlag quantitativ gemessenen LDH-Konzentrationen zeigten keine signifikanten Veränderungen auf ($p > 0,05$ %, Abbildung 21 A, B). Auch die Inhibition von p38 mit dem in DMSO gelösten Inhibitor SB203580 hatte keinen Einfluss auf die freigesetzten Konzentrationen der LDH ($p > 0,05$ %, Abbildung 21 C und D). Es wurde zusätzlich eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO durchgeführt, die keinen signifikanten Unterschied zur alleinig mit dem Inhibitor behandelten Probe zeigte ($p > 0,05$ %, Abbildung 21 C und D) .

Die in der Durchflusszytometrie gefundene, gesteigerte Apoptoserate nach der Stimulation mit TNF α , verbunden mit dem aus dem LDH-Assay gewonnen Erkenntnisgewinns, dass keine durch das TNF α induzierte Zytotoxizität stattfand, lies darauf schließen, dass

das stimulierende TNF α einen ausschließlich apoptotischen Effekt auf die CD4+ T-Lymphozyten hatte.

IV.6 TNF α führt zu einer Reduktion des TNFR1 an der Zelloberfläche CD4+ T-Lymphozyten

In dieser Arbeit wurde neben der TNF α -vermittelten Apoptose CD4+ T-Lymphozyten ein besonderes Augenmerk auf die Lokalisation des TNFR1 nach der Stimulation mit steigenden Konzentrationen an TNF α und dem Einfluss von p38 auf diese gelegt. Aus diesem Grund wurde der Rezeptor an der Oberfläche der Zellen mit einem biotinylierten Antikörper markiert und die Menge des an der Zelloberfläche lokalisierten TNFR1 über fluoreszierendes Streptavidin, gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff PerCP Cy 5.5, in der Durchflusszytometrie gemessen. Die grafische Darstellung dieses Signals kann in Abhängigkeit der Messkanäle als sogenannte Dot Blots gewählt werden (exemplarische Darstellung eines Dot Blots: Abbildung 22).

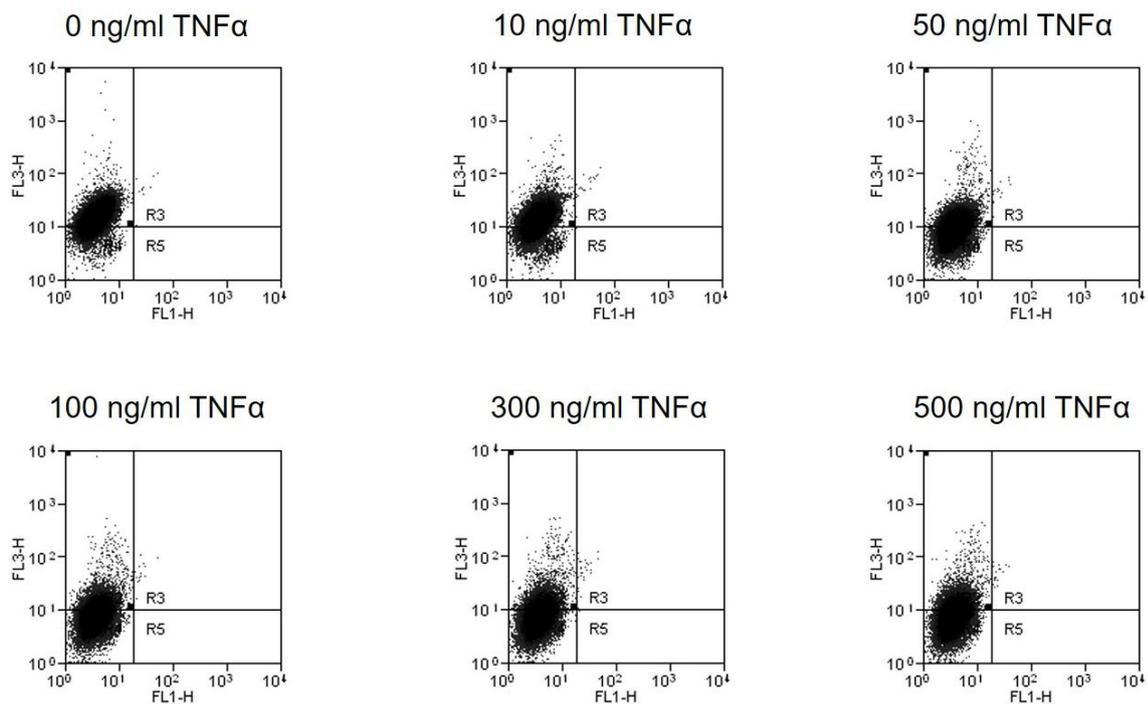


Abbildung 22: Beispielhafte Darstellung von durchflusszytometrischen Dot Blots.

Die mit einem gegen den TNFR1 (CD120a) gerichteten biotinylierten Antikörper versehenen Zellen leuchten aufgrund des an Streptavidin gekoppelten PerCP Cy 5.5 im Channel FL3-H. Jeder Punkt (Dot) steht dabei für das Signal, welches von einer markierten Zelle ausgesendet wurde. Die Fluoreszenz nimmt in diesem Beispiel mit steigender Stimulation durch TNF α ab. Dadurch verschiebt sich die Population, welche das gemessene Signal der Zellen repräsentiert, auf der y-Achse, die in diesem Fall dem FL3-H Kanal zugeordnet ist, in Richtung der x-Achse (FL1-H). Bei den hier beispielhaft gemessenen Proben handelt es sich um mit TNF α stimulierte und mit DMSO behandelte Zellen nach 24 h.

Durch eine Signalverstärkung oder -verminderung können Rückschlüsse auf quantitative Änderungen der untersuchten Struktur, das heißt in diesem Fall den TNFR1, geschlossen werden. In den folgenden Darstellungen wurde der *specific fluorescence index* (SFI), der ein Maß für die gemessene Fluoreszenz ist, gegen die steigenden Konzentrationen an stimulierenden TNF α aufgetragen (Abbildung 23). Zuvor wurde das unspezifische Fluoreszenzsignal der zusätzlich durchgeführten Isotypkontrolle von dem Messsignal der einzelnen Proben abgezogen. Bei dem SFI handelt es sich dabei um ein relatives Maß ist.

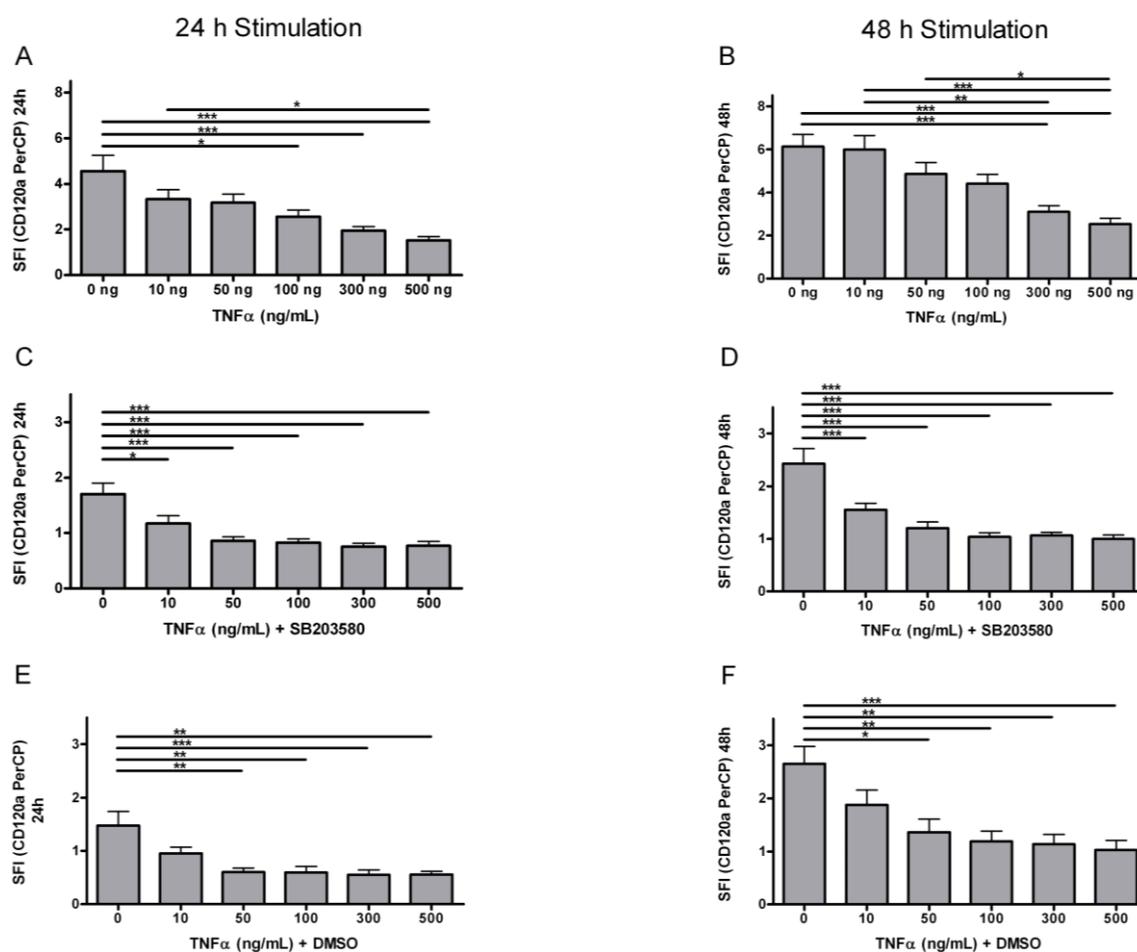


Abbildung 23: In der Durchflusszytometrie gemessene Konzentration des an der Zelloberfläche lokalisierten TNFR1.

Um eine quantitative Veränderung des an der Zelloberfläche von Jurkat-Zellen lokalisierten TNFR1 in Abhängigkeit von der Stimulation mit TNF α und der Inhibition von p38 zu messen, wurde der Rezeptor durch einen biotinylierten Antikörper an der Oberfläche der stimulierten beziehungsweise inhibierten Zellen markiert und mit an PerCP Cy 5.5 gekoppeltes Streptavidin inkubiert. Anschließend wurde das durch den Fluoreszenzfarbstoff ausgesendete Signal in der Durchflusszytometrie gemessen und der SFI bestimmt. Veränderungen des SFIs können direkt proportional zu Änderungen der Dichte des TNFR1 an der Zelloberfläche der Jurkat-Zellen gedeutet werden. Die Stimulation mit steigenden Konzentrationen an TNF α führten zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des TNFR1 24 h (A) und 48 h (B) nach der Stimulation um maximal rund 50 % der ursprünglichen Menge. Diese Reduktion fand ebenso unter der Inhibition von p38 mit dem Inhibitor SB203580 in einem vergleichbaren Ausmaß statt (C, D), so dass von einem fehlenden Einfluss von p38 auf dieses Verhalten ausgegangen werden kann. Es wurde zusätzlich eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO durchgeführt (E, F). (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001)

Es zeigte sich, dass die Stimulation mit steigenden Konzentrationen an TNF α zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Rezeptors an der Zelloberfläche 24 h (Abbildung 23 A) und 48 h (Abbildung 23 B) nach der Stimulation führte ($p < 0,001$ %). Der gemessene SFI nahm dabei bei der maximalen Stimulationskonzentration von 500 ng/ml TNF α um ungefähr 50 % des Ausgangswertes ab (Abbildung 23 A – F). Das beobachtete Verhalten der Lokalisation des TNFR1 an der Zelloberfläche der Jurkat-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulation mit TNF α zeigte ein ähnliches Verhalten unter der zusätzlichen Inhibition von p38 ($p < 0,001$ %, Abbildung 23 C und D). Da DMSO als Lösungsmittel für den verwendeten p38 Inhibitor SB203580 dient, wurde eine Kontrollmessung unter der zusätzlichen Behandlung mit reinem DMSO mit einem ähnlichen Ergebnis, das heißt einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Signals, durchgeführt ($p < 0,001$ %, Abbildung 23 E und F).

Es konnte schließlich geschlussfolgert werden, dass ein TNF α -konzentrationsabhängiger Wirkmechanismus bei den Jurkat-Zellen zu einer Reduktion des an der Zelloberfläche exprimierten TNFR1 führte.

IV.7 Die Stimulation mit TNF α hat keinen Einfluss auf die zelluläre Gesamtproteinmenge des TNFR1

In der Durchflusszytometrie konnte eine TNF α -abhängige Reduktion des TNFR1 an der Zelloberfläche der Jurkat-Zellen beobachtet werden. Es wurden bereits Mechanismen, wie das *Rezeptorshedding* (Peschon, Slack et al. 1998) und die Rezeptorinternalisierung (Micheau, Tschopp 2003; Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004), in der Literatur beschrieben, die eine solche Veränderung erklären könnten. Um nähere Aussagen über dem dieser Beobachtung zugrundeliegenden Mechanismus treffen zu können, wurde in einem weiteren Schritt die durchschnittliche zelluläre Proteinmenge des TNFR1 in den Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit TNF α und gegebenenfalls der Inhibition von p38 semiquantitativ normiert auf β -Aktin beziehungsweise GAPDH gemessen. Diese Bestimmung wurde über die Methode des Western Blots durchgeführt.

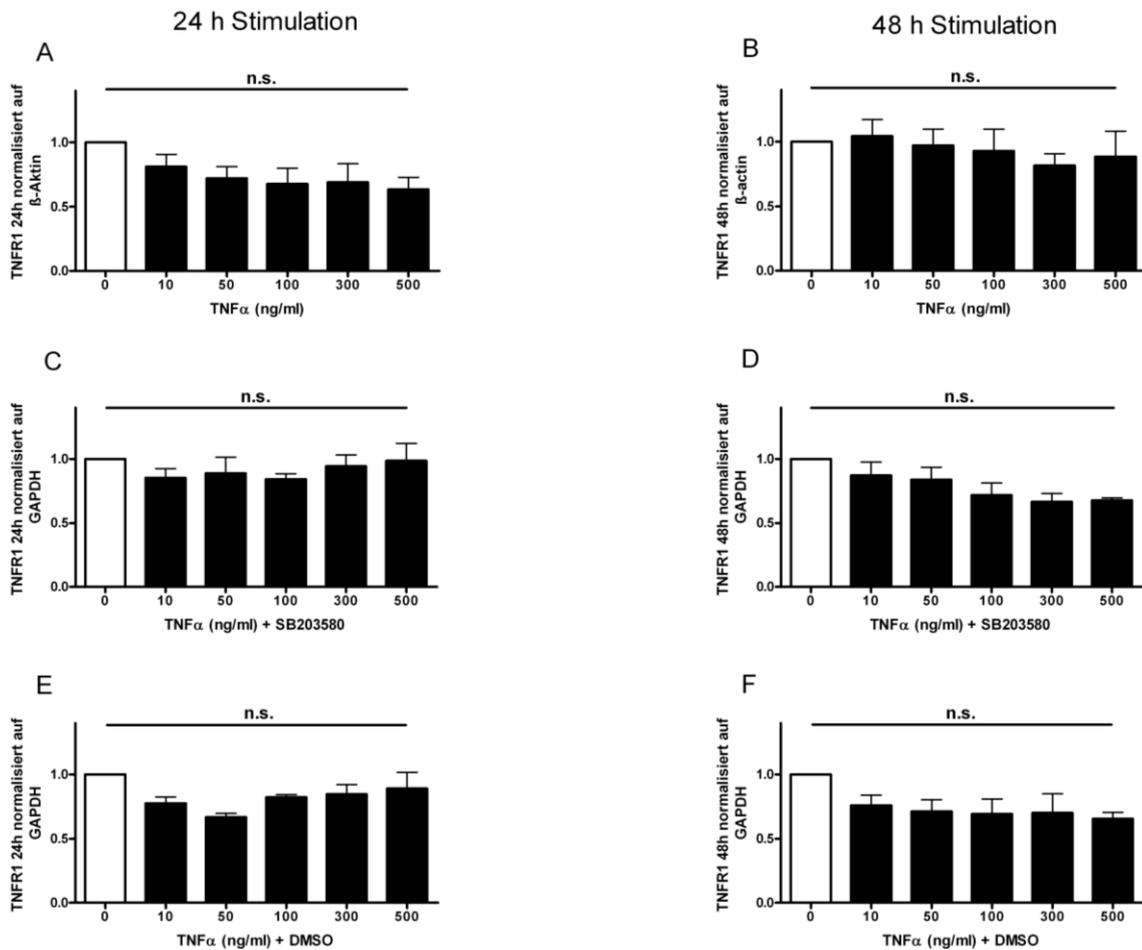


Abbildung 24: Semiquantitative Messung der Proteinexpression des TNFR1 nach der Simulation mit TNFα und der Inhibition von p38.

Der TNFR1 dient dem TNFα als Wirkmediator. Sein Signal kann über verschiedene postranslationale Mechanismen, wie dem *Rezeptorshedding* oder der Rezeptorinternalisierung, modifiziert werden. Es nahm jedoch weder die alleinige Stimulation durch TNFα, gemessen nach 24 h (A) und 48 h (B), noch die Inhibition von p38 durch SB203580 (C, D) nach den genannten Zeitpunkten einen Einfluss auf die normierte, zelluläre Konzentration des TNFR1 in den Jurkat-Zellen. Eine Stimulation mit TNFα nach der Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von SB203580, wurde ebenfalls als Kontrolle durchgeführt und die Menge des TNFR1 nach 24 h (E) und 48 h (F) normiert auf GAPDH gemessen. (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, n.s. = nicht signifikant)

Im Gegensatz zu der gemessenen Abnahme des TNFR1 an der Oberfläche der Jurkat-Zellen in der Durchflusszytometrie, konnte bei Betrachtung der zellulären Gesamtproteinmenge des Rezeptors keine Veränderung durch die steigende Stimulation mit TNFα nach 24 h (Abbildung 24 A) und 48 h (Abbildung 24 B) beobachtet werden ($p > 0,05$ %). Auch die Inhibition von p38 durch SB203580 nahm keinen Einfluss auf den zellulären TNFR1-Gehalt ($p > 0,05$ %, Abbildung 24 C und D). Es wurde zusätzlich eine Kontrollmessung mit dem Lösungsmittel DMSO durchgeführt ($p > 0,05$ %, Abbildung 24 E und F).

Es zeigte sich, dass weder die Stimulation mit TNFα noch die Inhibition von p38 einen Einfluss die zelluläre Proteinmenge des TNFR1 hatten.

IV.8 Die Stimulation mit TNF α führt zu einer konzentrationsabhängigen Änderung des sTNFR1

Die in der Durchflusszytometrie gemessene Abnahme des TNFR1 an der Oberfläche der Jurkat-Zellen konnte, wie bereits erwähnt, durch verschiedene Mechanismen entstehen. Der Rezeptor konnte durch Endozytose internalisiert werden und somit weiteren Signalwegen oder dessen lysosomalen Abbau zur Verfügung stehen (Micheau, Tschopp 2003; Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004) oder durch sogenanntes *Rezeptorshedding* (Peschon, Slack et al. 1998) durch Proteasen von der Oberfläche der Zellen losgelöst werden und sich frei im Zellmedium befinden. Um letztere Möglichkeit genauer zu betrachten, wurde der sTNFR1 im Zellmedium mit Hilfe eines ELISA-Kits quantifiziert. Zu diesem Zweck wurde der sTNFR1 durch auf dem Boden einer Mikrotiterplatte angebrachte Antikörper gegen diese gebunden und durch einen zweiten Antikörper, der einen Farbumschlag katalysierte, photometrisch quantifiziert. Dabei wurde ausschließlich 24 h nach der Stimulation mit TNF α beziehungsweise der Inhibition von p38 bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte (OD) gemessen.

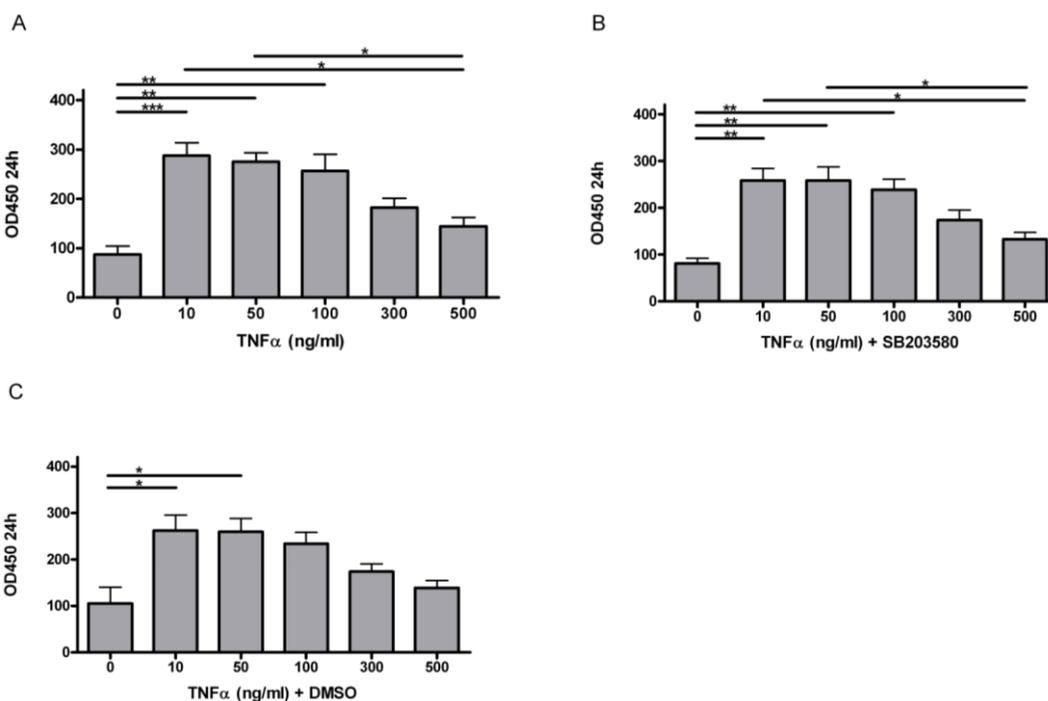


Abbildung 25: Photometrische Quantifizierung des sTNFR1 nach der Stimulation mit TNF α und der Inhibition von p38.

Um ein möglicherweise TNF α - beziehungsweise p38-abhängiges *Shedding* des TNFR1 näher zu untersuchen, wurde der sTNFR1 über ein ELISA Kit quantifiziert und die OD bei 450 nm gemessen. Die Messungen wurden 24 h nach der Stimulation mit TNF α beziehungsweise der Inhibition von p38 mit SB203580 durchgeführt. Die graphischen Darstellungen der von der Konzentration an sTNFR1 abhängigen optischen Dichten zeigten alle unabhängig von der alleinigen Stimulation mit TNF α (A) und der zusätzlichen Inhibition von p38 (B) einen ähnlichen Verlauf. Nach der Stimulation mit bis zu 50 - 100 ng/ml TNF α kam es zu einem Anstieg des sich im Medium der Zellkultur befindenden sTNFR1. Diese erhöhte Konzentration an sTNFR1 nahm bei darüber hinaus eingesetzten, steigenden Konzentrationen an TNF α wieder bis nahezu dem Ausgangswert ab. Es wurde zudem eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO durchgeführt (C). (statistische Auswertung: GraphPad Prism4 Software: one-way-ANOVA und Bonferroni's *multiple comparison* Post-Hoc-Test, * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001)

Die Ergebnisse der Quantifizierung des sTNFR1 zeigten folgendes Bild: Die Stimulation mit bis zu maximal 100 ng/ml TNF α führte nach 24 h zu einer starken Erhöhung der Konzentration des sTNFR1 ($p < 0,01$ % sowie $p < 0,001$ %). Diese erhöhte Konzentration an sTNFR1 nahm bei darüber hinaus steigenden Stimulationskonzentrationen an TNF α wieder ab. Bei den beiden höchsten eingesetzten Dosen an TNF α (300 ng/ml und 500 ng/ml) konnte zwischen der gemessenen optische Dichte dieser Proben im Vergleich zu den unstimulierten Proben kein statistischer Unterschied mehr nachgewiesen werden ($p > 0,05$ %, Abbildung 25 A). Die Hemmung des Enzyms p38 mit dem Inhibitor SB203580 (Abbildung 25 B) sowie die Behandlung mit DMSO (Abbildung 25 C) führten zu einem vergleichbaren Verhalten ($p < 0,01$ % beziehungsweise $p < 0,05$ %).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Stimulation von CD4+ T-Lymphozyten mit TNF α -Konzentrationen bis hin zu 100 ng/ml zu einem gesteigerten *Shedding* des TNFR1 *in vitro* führte. Bei über diese Konzentrationen hinausgehenden Stimulationskonzentrationen wurde dieser Mechanismus jedoch negativ reguliert.

V. DISKUSSION

TNF α ist aufgrund seiner pleiotropen Funktionen eines der meist untersuchten Zytokine. Vor allem seine Rolle als Apoptose- sowie zugleich Proliferation-auslösender Mediator steht im Fokus vieler Forschungsarbeiten und wurde trotz allem nicht gänzlich entschlüsselt (Kallioulas, Ivashkiv 2015). Die MAPK p38 ist ein Bestandteil des Signalweges ausgelöst durch TNF α und dabei selbst bei der Synthese des selbigen beteiligt (Lee, Laydon et al. 1994; Campbell, Ciesielski et al. 2004). Es nimmt damit eine mögliche Funktion bei der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen ein. Zudem ist p38 ein Vermittler der Apoptose CD4 $^+$ T-Lymphozyten (MacFarlane, Cohen et al. 2000). Aus diesem Grund war es Thema dieser Arbeit das Apoptoseverhalten CD4 $^+$ T-Lymphozyten unter der Stimulation steigender TNF α -Konzentrationen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten *in vitro* zu untersuchen. Dabei wurde im Speziellen auf die Regulation des TNFR1 unter Berücksichtigung von p38 geachtet.

V.1 Apoptoseverhalten von Jurkat-Zellen unter steigender TNF α -Konzentration

In dieser Dissertation wurde in erster Linie das Apoptoseverhalten von CD4 $^+$ T-Lymphozyten unter dem Einfluss steigender Stimulationskonzentrationen an TNF α (von 10 ng/ml bis 500 ng/ml) untersucht. In der FACS-Analyse konnte in der Messung mit dem Apoptosemarker 7AAD eine Steigerung der Apoptoserate von 2 – 3 % auf 4 – 6 % unter der maximalen Stimulation mit TNF α (500 ng/mL) nachgewiesen werden (Abbildung 10). Dabei handelt es sich um eine konzentrationsabhängige, relative Verdopplung des Anteils apoptotischer Zellen durch die Stimulation mit TNF α . Im Western Blot konnte auf der Ebene der Proteinexpression keine relevante Veränderung der normierten Menge an zellulären, apoptoserelevanten Proteinen, das heißt *cleaved* PARP, Caspase 3, *cleaved* Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 und cFlip gemessen werden (Abbildungen 11 – 16). Ebenso zeigte sich keine quantitative Änderung der exprimierter mRNA, kodierend für cFlip und Caspase 8 (Abbildungen 17 – 19). Es konnte jedoch festgehalten werden, dass aufgrund des Fehlens von signifikanten Veränderungen im LDH-Assay, die gemessenen, gesteigerten Zelltodraten in der Durchflusszytometrie definitiv der Apoptose und nicht zytotoxischen Effekten zuzuschreiben waren (Abbildung 21).

Wirft man einen Blick auf die zellulären Vorgänge, die hinter der Fragestellung dieser Arbeit stehen, das heißt auf die durch verschiedene Konzentrationen an TNF α induzierte

Apoptose bei CD4+ T-Lymphozyten, zeigen sich Aspekte aus bereits bestehenden Arbeiten in die sich in das Ergebnis dieser Arbeit zum Teil einfügt. In einer Arbeit von Micheau et al., in welcher die NF- κ B abhängige Expression von cFlip untersucht wurde, zeigten Jurkat-Zellen unter Konzentrationen von TNF α bis zu 10000 ng/ml keine wesentliche Änderung in Ihrem Apoptoseverhalten (Micheau, Lens et al. 2001). In einer weiteren Veröffentlichung konnte im Gegensatz dazu ein Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen von bis zu ungefähr 80 % unter der Stimulationskonzentrationen von 100 – 1000 ng/ml TNF α beobachtet werden (Thomas, Hersey 1998). Im Hinblick auf diese widersprüchlichen Ergebnisse schließt sich die gemachte Beobachtung der jetzigen Arbeit tendenziell der von Micheau et al. an, da der absolute Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen trotz der relativen Verdopplung bei absoluten Werten von maximal 6 % lag. Es existieren bereits Daten, die darauf hinweisen, dass Jurkat-Zellen beziehungsweise CD4+ T-Lymphozyten neben weiteren Zellen allgemein resistent gegenüber durch alleinige TNF α -Stimulation ausgelöste Apoptose sind (Aggarwal, Moffat et al. 1984; Sugarman, Aggarwal et al. 1985). Aus diesem Grund wurden Untersuchungen bezüglich der Apoptose in diesen Zellen unter dem Einfluss von TNF α in Kombination mit einem Proteinsynthesehemmer, wie Cycloheximid (CHX) in Arbeiten von Varghese et al. (Varghese, Chattopadhyaya et al. 2001) oder Gaud et al. (Gaud, Guillemot et al. 2013), durchgeführt. Der Grund für die erhöhte Apoptosesensibilität liegt dabei höchst wahrscheinlich in der Synthesehemmung antiapoptotischer Proteine (Wang, Mayo et al. 1998). So benötigten im Vergleich zu U937-Zellen, bei denen es sich um immortalisierte Monozyten handelt, Jurkat-Zellen in der bereits erwähnten Arbeit von Varghese et al. eine *high dose* Behandlung, das heißt eine 1000-fach erhöhte Konzentration an CHX, um eine ähnliche, durch TNF α ausgelöste, Apoptosekinetik aufzuweisen (Varghese, Chattopadhyaya et al. 2001). Da TNF α ebenfalls zu einer Aktivierung von NF- κ B führt (Chen, Goeddel 2002), welcher ein auch in T-Lymphozyten für die Proliferation verantwortlicher Transkriptionsfaktor ist (Livolsi, Busuttill et al. 2001), scheint es schlüssig, dass diese Tatsache bei der fehlenden Apoptosesensibilität eine Rolle spielt. So konnten He und Ting in einer Arbeit zeigen, dass Jurkat-Zellen mit einer defizienten IKK γ -Mutation eine stark erhöhte Sensibilität für TNF α induzierte Apoptose aufzeigten (He, Ting 2002). IKK γ ist Teil des I κ B Kinase (IKK) Komplexes und dabei selbst für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich (Rothwarf, Zandi et al. 1998). Folglich kam es zu einer geringeren Stimulierung von NF- κ B und somit zu einer verminderten Synthese anti-apoptotischer Proteine wie zum Beispiel des Zinkfingerproteins A20, womit maßgeblich gezeigt wurde, welche Rolle NF- κ B und dessen Transkriptionsprodukte bei der Apoptoseresistenz von Jurkat-Zellen spielen (He, Ting 2002). In einer Veröffentlichung von Shakibaei et al., in welcher Jurkat-Zellen wie in dieser Arbeit ausschließlich mit TNF α - wenn auch in kleineren Konzentrationen (1 nM,

entspricht ca. 17,1 ng/mL) - ohne Anwesenheit eines Proteinsynthesehemmers stimuliert wurden, konnten ebenfalls erst nach 24 h maximal 8 % Annexin positive Zellen und 2 % TUNEL positive Zellen nachgewiesen werden (Shakibaei, Sung et al.). Bei dem Annexin V Assay handelt es sich dabei um einen Apoptosenachweise aufgrund der Akkumulation von Phosphatidylserin in der äußeren der Membran der Zelle, während die TUNEL-Methode auf dem Nachweis von DNA-Strangbrüchen beruht. Diese Nachweismethoden stimmen nicht mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode, dem Apoptosenachweis durch 7AAD, welcher auf dem Verlust der Zellintegrität beruht, überein. Es ist jedoch festzustellen, dass sich die Zelltodraten in dieser Arbeit unter ähnlichen Konzentrationen an TNF α (10 ng/ml und 50 ng/ml) mit einem ungefähren Anteil von 3 % apoptotischer Zellen nach 24 h in einer vergleichbaren Größenordnung wie in der von Shakibaei et al. befinden. Ein letzter, vielleicht entscheidender Punkt in diesem Zusammenhang ist der TNF α -Stimulus selbst als ein Apoptosesignalgeber bei CD4+ T-Lymphozyten. Es wurde bereits nachgewiesen, dass FasL ein schnellerer Apoptoseinduktor als TNF α ist (Clement, Stamenkovic 1994; Zheng, Fisher et al. 1995). Ein ebenso wichtiger Punkt ist jedoch, dass es Hinweise gibt, nach welchen diese beiden Zytokine unterschiedlich auf die beiden Populationen an CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten wirken. Unter Berücksichtigung von Ausnahmen scheint FasL vorzugsweise den Zelltod von CD4+ T-Lymphozyten zu kontrollieren, während das in dieser Arbeit verwendete TNF α vermehrt eine Rolle bei der Apoptose CD8+ T-Lymphozyten spielt (Sytwu, Liblau et al. 1996; Heath, Kurts et al. 1998; Lenardo, Chan et al. 1999). Dies würde ebenfalls einen Erklärungsgrund für das im Vergleich zu den eingesetzten Konzentrationen an TNF α träge Apoptoseverhalten der Jurkat-Zellen in dieser Arbeit liefern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit in der FACS-Analyse ein konzentrationsabhängiger Apoptoseanstieg unter TNF α -Stimulation der Jurkat-Zellen nach 24 h und 48 h nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10). Dieses Ergebnis fügt sich dabei durchaus in das Gesamtbild von bisherigen Forschungsberichten mit ein. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit jedoch auch keine Proliferationssteigerung im WST-1 nachgewiesen werden, welche bei einer gesteigerten NF- κ B Aktivität zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 20). Dies spricht für ein Überwiegen des apoptotischen über den proliferationsfördernden Effekt des TNF α auf die Jurkat-Zellen. Auch wenn die CD4+ T-Lymphozyten wie bereits erwähnt allgemein resistent gegenüber einer durch TNF α ausgelösten Apoptose erscheinen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Jurkat-Zellen eine von der Stimulationskonzentration abhängige Steigerung der Apoptose durch TNF α ausgelöst wird.

V.2 p38 hat keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Jurkat-Zellen

Nach der Untersuchung des Einflusses von steigenden TNF α Konzentrationen auf Jurkat-Zellen bestand der nächste Schritt in dieser Arbeit darin, ein Augenmerk darauf zu legen, ob die Inhibition der MAPK p38 bei dem Apoptoseverhalten der Zellen eine tragende Rolle spielt. Durch eine vorbestehende Arbeit unserer Arbeitsgruppe, in welcher das Fehlen der MAPKAPK 2 zu einer Verschlechterung der EAE bei Mäusen führte (Tietz, Hofmann et al 2014.), wurde die These aufgestellt, dass das direkt *upstream* davon liegende p38 eine Rolle bei der TNF α -induzierten Apoptose humaner T-Lymphozyten spielen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die Jurkat-Zellen trotz der Inhibition von p38 in der Apoptosecharakteristik in den Untersuchungen des Western-Blots (Abbildungen 11 – 16), der RT-PCR (Abbildungen 17 – 19) und der FACS-Analyse mit 7AAD (Abbildung 10) ein ähnliches Verhalten nach 24 h sowie 48 h wie die Zellen nach alleiniger Stimulation durch TNF α aufwiesen. Eine durch den Inhibitor SB203580 gesteigerte Apoptoserate der Jurkat-Zellen in der FACS-Analyse konnte dabei als reiner DMSO-Effekt demaskiert werden.

In bisherigen Studien konnte durchaus eine Rolle von p38 bei der Apoptose von T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Genauer betrachtet zeigte sich jedoch, dass die Aktivierung von p38 den Zelltod zwar in CD8+, gegebenenfalls angeregt durch die Stimulierung mit FasL (Farley, Pedraza-Alva et al. 2006), jedoch nicht in CD4+ T-Lymphozyten auszulösen vermag (Merritt, Enslin et al. 2000). So zeigten CD8+ T-Lymphozyten, welche aus Mäusen isoliert wurden, die eine genetisch veränderte, konstant aktivierte MKK6 besaßen, die direkt *upstream* von p38 liegt, eine im Vergleich zu den CD4+ T-Lymphozyten, durch den p38 Inhibitor SB203580 reversible, erhöhte Apoptoserate (Merritt, Enslin et al. 2000). Ebenso führte die Blockierung von p38 in dn (*dominant negative*) p38 Mäusen zu keiner Änderung des Proliferationsverhaltens der CD4+ T-Lymphozyten in diesen Tieren, während die CD8+ T-Lymphozyten eine gesteigerte Proliferationsreaktion auf die Stimulierung mit Concanavalin A, einem T-Zell Stimulator, aufwiesen (Rincon, Enslin et al. 1998; Merritt, Enslin et al. 2000). Gleichzeitig lösen jedoch MKK3 sowie MKK6 bei ihrer Aktivierung die Apoptose in Jurkat-Zellen aus. Dabei geschieht dies aber überraschender Weise nicht über p38, obwohl beide Kinasen direkt *upstream* von p38 liegen. Die eigentlichen Substrate von MKK3 und -6 blieben bei diesem Apoptosesignal unbekannt (Huang, Jiang et al. 1997; Juo, Kuo et al. 1997). Zusätzlich führt die Stimulierung durch FasL - wenn auch nicht durch TNF α - zu einer Aktivierung von p38 in Jurkat-Zellen, dessen Inhibition jedoch keine Verhinderung der Apoptose in diesen Zellen

vermag (Brenner, Koppenhoefer et al. 1997; Salmon, Foltz et al. 1997). Diese Beobachtungen würde sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit ergänzen, da p38 in Jurkat-Zellen im Vergleich zu CD8+ T-Lymphozyten scheinbar nicht zum Apoptosesignal beiträgt und wenn sie aktiviert wird, dies vermehrt durch FasL als TNF α geschieht. Im Widerspruch dazu steht eine Arbeit von Nemoto et al., in welcher anhand von Jurkat-Zellen gezeigt wurde, dass der selektive p38 α - und β -Inhibitor SB202190 dosis- sowie zeitabhängig in der Lage war die Rate des programmierten Zelltods bis auf 30 - 60 % zu heben. Dabei zeigte p38 seine unterschiedliche Wirkung durch das anti-apoptotische p38 β und das pro-apoptotische p38 α . Es wurde jedoch nicht ausgeschlossen, dass der Inhibitor weitere, unbekannte Zielstrukturen als die von p38 besitzt. Ein weiterer Unterschied zu dieser Arbeit bestand zudem darin, dass die Apoptose nicht durch eine TNF α Stimulation, sondern einem 24-stündigen Serumentzug ausgelöst wurde (Nemoto, Xiang et al. 1998). Eine Veröffentlichung, die p38 auch in der Rolle der FasL-vermittelten Apoptose sieht, jedoch einen weiteren Aspekt hinzufügt, ist die von Tourian et al.. Darin wird p38 aufgrund der ambivalenten pro- und antiapoptotischen Wirkung eine geringere Beteiligung an der Apoptoseauslösung durch einen Todesrezeptor - in diesem Fall ebenfalls vermittelt durch FasL - in Jurkat-Zellen zugeschrieben. Es wurde dafür jedoch die MAPK JNK in den Fokus gerückt (Tourian, Zhao et al. 2004). Die Annahme, dass in Jurkat-Zellen die Apoptose tendenziell vermehrt durch FasL unter der gemeinsamen Wirkung von JNK und p38 reguliert wird, wobei die Apoptose nicht durch alleinige Inhibition von p38 blockiert werden konnte, wurde bereits durch weitere veröffentlichte Forschungsergebnisse gefestigt (MacFarlane, Cohen et al. 2000). Es existieren zudem Hinweise dafür, dass die Apoptose in CD4+ T-lymphozyten neben FasL auch durch TRAIL ausgelöst werden kann und dabei die dritte MAPK ERK einen hemmenden Einfluss auf dieses Apoptoseaktivierung nehmen kann (Holmstrom, Schmitz et al. 2000; Soderstrom, Poukkula et al. 2002). Die durch TNF α ausgelöste Apoptose, welche erst nach der *high dose* Gabe von CHX einsetzte, konnte in der bereits erwähnten Publikation von Varghese et. al durch den p38 Inhibitor PD169316 in Jurkat-Zellen im Gegensatz zu U937-Zellen nicht beeinflusst werden. Im Kontext mit bereits bestehenden Forschungsergebnissen wurde dabei die Schlussfolgerung gezogen, dass die durch TNF α durchgeführte Aktivierung von p38 abhängig von den untersuchten Zellen unterschiedliche Effekte hat. So würde sie in den einen Zelllinien zum Zelltod und in anderen, wie im Falle der Jurkat-Zellen, zum Zellüberleben führen (Varghese, Chattopadhyaya et al. 2001). Dies widerspricht sich zum Teil mit den Ergebnissen dieser Dissertation, da die Inhibition von p38 in den Jurkat-Zellen, weder das Proliferations- noch das Apoptoseverhalten unter steigenden Konzentrationen an TNF α beeinflusste. In Bezug auf die unterschiedliche Rolle von p38 in

verschiedenen Zellpopulationen ist dabei jedoch bekannt, dass der in dieser Arbeit verwendete p38 Inhibitor SB203580 in der Lage ist die durch Natriumsalicylat, das heißt chemisch, ausgelöste Apoptose in Fibroblasten sowie zugleich die ebenfalls durch Natriumsalicylat initiierte Hemmung der durch TNF α vermittelten Aktivierung von NF- κ B in Affennierenzellen zu reduzieren (Schwenger, Bellosta et al. 1997; Schwenger, Alpert et al. 1998).

Es kann festgehalten werden, dass es in der Literatur Hinweise dafür gibt, dass p38 eine Rolle bei der Apoptose CD8 $^+$ T-Lymphozyten spielt (Farley, Pedraza-Alva et al. 2006), bei CD4 $^+$ T-Lymphozyten diese Rolle jedoch neben p38, das pro- sowie antiapoptische Eigenschaften besitzt (Varghese, Chattopadhyaya et al. 2001), auch verstärkt von den beiden anderen MAPK JNK (MacFarlane, Cohen et al. 2000; Tourian, Zhao et al. 2004) und ERK (Holmstrom, Schmitz et al. 2000) übernommen wird. Zum anderen scheinen bei den verwendeten Jurkat-Zellen diese Apoptosesignalwege bevorzugt über andere *death* Zytokine als TNF α wie FasL (MacFarlane, Cohen et al. 2000) oder TRAIL (Soderstrom, Poukkula et al. 2002), ausgelöst zu werden. Somit bringt die Inhibition von p38 bei der Stimulation von Jurkat-Zellen mit steigenden Konzentrationen an TNF α in dieser Arbeit, im Tenor mit den bereits vorhandenen Forschungsergebnissen, keinen messbaren Effekt im registrierten Apoptoseverhalten mit sich.

V.3 Regulierung und Interpretation der Lokalisation des TNFR1

Neben dem Auftreten der Apoptose in den Jurkat-Zellen an sich stand auch die Einflussnahme der steigenden TNF α -Konzentrationen auf das Verhalten des TNFR1 und dessen Regulation im Fokus dieser Arbeit. Es konnte beobachtet werden, dass die Dichte des TNFR1 an der Oberfläche der Zellen, gemessen in der FACS-Analyse anhand des SFI, unter steigenden Konzentrationen an TNF α bis 500 ng/ml auf die Hälfte reduziert wurde (Abbildung 23). Hierbei ist wie bereits im Ergebnisteil erläutert zu beachten, dass es sich nicht um absolute Zahlen handelt, da der SFI nur ein relatives Maß für die Oberflächenkonzentration dieses Proteins ist und somit nur der Verlauf unter den verschiedenen Stimulationskonzentrationen aussagekräftig ist. Gleichzeitig blieb die gesamtzelluläre Menge an TNFR1, gemessen im Western-Blot, unverändert (Abbildung 24). Dabei ist diese Beobachtung nicht verwunderlich, da sich der Hauptanteil an TNFR1 nicht an der zellulären Oberfläche, sondern in einem Pool im Golgi-Apparat befindet (Bradley, Thiru et al. 1995). Zudem bestand die Möglichkeit der Rezeptorinternalisierung (McPherson, Kay et al. 2001). Ergänzend zu den Ergebnissen aus der FACS-Analyse wurde die lös-

liche Form des TNFR1, der sTNFR1, durch ein ELISA im Medium quantifiziert. Die gemessene optische Dichte stieg bei einer Konzentration von 10 ng/ml um etwa das dreifache im Vergleich zur unstimulierten Probe an und blieb bis zu einer Stimulationskonzentration von 100 ng/ml etwa auf einem konstanten Niveau. Interessanter Weise kam es bei höheren Konzentrationen an TNF α zu einem erneuten Abfall der gemessenen optischen Dichte. Das würde bedeuten, dass das für die Bildung des sTNFR1 verantwortliche *Shedding* des TNFR1 bei kleinen Mengen an TNF α (10, 50, 100 ng/ml) aktiviert wird, während es bei höheren Konzentrationen (300, 500 ng/ml) scheinbar durch einen negativen Rückkopplungseffekt zu einer Reduktion dieses Phänomens kommt (Abbildung 25). Die Inhibition von p38 hatte auf keines der registrierten Verhalten weder in der FACS-Analyse noch im ELISA einen signifikanten Einfluss.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurden das Verhalten und der Signalweg des TNFR1 bereits untersucht und Signalmodelle aufgestellt. Es blieben jedoch bisher die entscheidenden Regulationsmechanismen unbekannt. Eines der Modelle sieht den TNFR1 nach Stimulation mit TNF α in der Bildung des Komplexes I unter der Rekrutierung von Proteinen wie TRADD, TRAF-2 und RIP1 und damit als ein Proliferationssignal (Hsu, Shu et al. 1996; Yeh, Shahinian et al. 1997; Ashkenazi, Dixit 1998). Es folgt die Aktivierung von NF- κ B durch die Phosphorylierung und den Abbau des IKKs, welcher zuvor einen hemmenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor ausübt (Devin, Cook et al. 2000; Zhang, Kovalenko et al. 2000). Zu den Transkriptionszielen von NF- κ B gehören Gene, welche unter anderem für Proteine wie der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) (Stehlik, de Martin et al. 1998) und cFlip (Kreuz, Siegmund et al. 2001) kodieren, und somit selbst direkte Inhibitoren der Apoptose sind. Kommt es aufgrund bisher unbekannter Regulationsmechanismen zur Endozytose, das heißt der Internalisierung, des Rezeptors, werden weitere, apoptosefördernde Proteine, wie FADD und Caspase 8, rekrutiert und der Komplex II gebildet, der zum programmierten Zelltod führt (Micheau, Tschopp 2003; Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004; Schutze, Tchikov et al. 2008). Es existiert dabei eine unterschiedliche Datenlage, ob bei der Bildung des Komplexes II der TNFR1 von diesem dabei losgelöst wird (Micheau, Tschopp 2003; Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Zudem kann die aus dem internalisierten Rezeptor generierte Signalkaskade verschiedene Bedeutungen für die Zelle wie zum einen die Nekroptose im Gegensatz zur Apoptose haben (Ting, Bertrand 2016). Für die Internalisierung ist jedoch die *TNFR internalization domain* (TRID) des Rezeptors mit einem YXXW Motiv verantwortlich. Dabei reicht eine einzige Punktmutation in diesem Motiv aus um die Internalisierung zu verhindern. Die Folgen sind ein verändertes Zellsignal: der Rezeptor ist nicht mehr in der Lage die DISC Proteine zu rekrutieren, wodurch die Apoptoserate

stark reduziert wird (Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Dass diese Internalisierung dabei nicht nur für die Bildung des Komplexes II und der Aktivierung von Pro-Caspase 8 von Bedeutung ist, wird daran sichtbar, dass es diesem sogenannten internalisierten Receptosom möglich ist mit einem Vesikel aus dem Golgi-Apparat zu verschmelzen und dadurch darin enthaltene aSMase zu aktivieren. Zu deren Produkten gehören Ceramide, welche letzten Endes zur Spaltung von Caspase-9 und -3 führen (Adam-Klages, Adam et al. 1996). Die aSMase führt zudem zu einer Aktivierung von Cathepsin D, das in Jurkat-Zellen das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) inaktiviert. HSP90 selbst konnte wiederum eine antiapoptotische Rolle in der TNF α -induzierten Apoptose von Jurkat-Zellen nachgewiesen werden, da es die Interaktion von RIP1 und Caspase 8 inhibiert (Fritsch, Fickers et al. 2016). Die Rolle der verwandten membrangebundenen nSMase im Signalweg des TNF α , welche über die N-terminale membran-proximale Region (MPR) des TNFR1 aktiviert wird (Adam-Klages, Adam et al. 1996), ist im Gegensatz dazu noch nicht abschließend geklärt (Boone, Vandevorode et al. 1998; Schutze, Tchikov et al. 2008). Dieses Wissen vorausgesetzt, kann die TNF α -konzentrationsabhängige Zunahme der gemessenen Apoptoserate im Zusammenspiel mit der Reduktion des an der Zelloberfläche exprimierten TNFR1 über dieses Modell der Rezeptorinternalisierung erklärt werden. Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass in immortalisierten, embryonalen Nierenzellen und Epithelzellen eines Zervixkarzinoms die Internalisierung des Rezeptors nötig ist, um die MAPKs, welche Teil des TNF α -Signalweges sind, zu aktivieren (Woo, Kim et al. 2006). Auf der anderen Seite ist zusätzlich auch bekannt, dass die MAPK ERK in der Lage ist den TNFR1 direkt zu phosphorylieren um somit schließlich die Internalisierung und letzten Endes den zytotoxischen Effekt zu verhindern (Cottin, Van Linden et al. 1999; Van Linden, Cottin et al. 2000). Das in dieser Arbeit beobachtete Auftreten der 50 %-igen Reduktion des an der Oberfläche der Jurkat-Zellen gemessenen TNFR1 nach der steigenden Stimulation mit TNF α würde in diesem Zusammenhang vermuten lassen, dass - sofern es sich bei diesem Mechanismus um den der Internalisierung handele - es zu einer verstärkten Apoptoserate durch das veränderte Signalmuster kommen müsste (Abbildung 23). Dies konnte mit einer Steigerung der Apoptoserate von 2 – 3 % auf 4 – 6 % beobachtet werden (Abbildung 10). Eine gesteigerte Nekroptose konnte aufgrund des fehlenden zytotoxischen Nachweises im LDH-Assay ausgeschlossen werden (Abbildung 22). Die Hemmung der MAPK p38 konnte auf diese Regulierung des Signalweges jedoch keinen Einfluss nehmen. Es wurde zudem zusätzlich ein weiterer Regulationsmechanismus des TNFR1 näher betrachtet: das *Rezeptorshedding*.

Es wurde bereits in einer Publikation von Madge et al. gezeigt, dass es bei der Apoptose von Endothelzellen, welche durch apoptotisch wirkende Medikamente wie zum Beispiel das mit der bekannten anti-inflammatorisch wirkenden Acetylsalicylsäure verwandten Natriumsalicylat ausgelöst wurde, zu einer Reduktion des oberflächlichen TNFR1 um 50 % nach nur 2 h kam. Simultan konnte ein Anstieg des sTNFR1 im Medium beobachtet werden, wobei dieser Effekt durch den *TNF α processing inhibitor* (TAPI), einem Inhibitor des für das *Shedding* verantwortlichen TACE, reversibel war. Die chemisch ausgelöste Apoptose fand unter diesem Einfluss dabei weiterhin statt. Es konnte geschlussfolgert werden, dass das *Shedding* des TNFR1 somit bei apoptotischen Signalen eine Rolle spielt. Dabei wurde die Vermutung aufgestellt, dass durch diesen Mechanismus nicht nur mögliche Apoptosesignale, sondern ebenfalls das NF- κ B Signaling maßgeblich beeinflusst werden kann (Madge, Sierra-Honigmann et al. 1999). Die Arbeitsgruppe von Ogura et al. befasste sich ebenfalls näher mit TACE, zu dessen Substraten, neben dem membranständigen TNF α und dem TNFR1 unter anderem der TNFR2, der IL-1 Rezeptor II und TGF- α gehören (Schlondorff, Blobel 1999; Moss, White et al. 2001), und der Regulation des *Sheddings*. Sie beobachteten, dass bei den ursprünglich aus Lungenkrebszellen bestehenden A549-Zellen die Behandlung mit dem Proteinsynthesehemmer CHX beziehungsweise AcCHX dazu führte, dass nach Stimulation mit TNF α weniger cFLIP_s synthetisiert sowie weniger I κ B α phosphoryliert und abgebaut wurde. Es konnte folglich von einer geringeren NF- κ B Aktivierung ausgegangen werden. Zudem kam es zu einer reduzierten Expression von TNFR1 an der Oberfläche der Zelle mit einem analogen Anstieg des sTNFR1 im Medium, wobei dieser Anstieg ebenfalls durch einen Metalloproteaseninhibitor verhindert werden konnte. Durch die Inhibition des *Sheddings* konnte ein erneuter Abbau von I κ B α und somit eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B erreicht werden. Interessanter Weise wurde Caspase 8 dabei nur in Anwesenheit des Inhibitors durch die Behandlung mit AcCHX oder CHX gesteigert aktiviert. Auch hier zeigte sich, dass durch *Rezeptorshedding* das Signal von TNF α bezüglich Proliferation sowie Apoptose gleichermaßen effizient beeinflusst wird. Dabei wurde die These aufgestellt, dass diese proteolytische Lösung des Rezeptors von der Zelloberfläche als schneller, posttranslatinaler Regulationsmechanismus des TNF α -Signalweges angesehen werden kann, der einerseits das Signal in die Zelle direkt unterbindet und andererseits das freie TNF α dem ganzen System entzieht (Ogura, Tsukumo et al. 2008). Die gleiche Arbeitsgruppe stellte in einer weiteren Studie eine Verbindung zwischen dem genannten *Shedding* und dessen Regulation durch die MAPKs fest, indem unter ähnlichen Versuchsbedingungen, das heißt durch AcCHX induziertes *Shedding* des TNFR1 bei A549-Zellen, die MAPKs JNK, ERK sowie p38 durch ihre jeweilige Inhibition auf ihren möglichen Einfluss auf diese Regulation hin untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass die

Inhibition von JNK keinen Effekt auf diesen Vorgang hatte, während die jeweilige Blockierung von ERK und p38, im Gegensatz zu dieser Dissertation, zu einem kleinen, wenn auch signifikanten Anstieg der Rezeptormasse an der Zelloberfläche führte. Unter der gemeinsamen Inhibition von ERK und p38 kam es dabei zu einer vollständigen Reversibilität, so dass die Expression des TNFR1 an der Oberfläche wieder nahezu das Ausgangsniveau erreichte. Als mögliche Ursache wurde eine MAPK-abhängige Translokation von TACE angenommen (Ogura, Tsukumo et al. 2008). Zwar wurde in den genannten Studien das *Shedding* nicht in Jurkat-Zellen und anstelle von TNF α durch die Gabe von Proteinsynthesehemmern oder Chemikalien wie Natriumsalicylsäure ausgelöst, jedoch zeigt sich hierbei die nicht zu unterschätzende Bedeutung dieses Mechanismus. Umso interessanter ist es, dass in der jetzigen Arbeit das *Shedding*, das wie bereits bekannt, allein durch den körpereigenen Stoff TNF α ausgelöst wird (Leeuwenberg, Dentener et al. 1994), zusätzlich durch dessen steigende Konzentration bis zu einer gewissen Stimulationshöhe positiv und bei steigenden Stimulationskonzentrationen negativ reguliert wurde (Abbildung 25). Dadurch könnte möglicherweise ein Schlüsselpunkt bei der Regulierung des bedeutsamen TNF α -Signalweges in CD4 $^+$ T-Lymphozyten, der damit auch maßgeblich in den meisten Immunantworten eine Rolle spielen würde, näher beleuchtet werden. Die Hemmung des Enzyms p38 nimmt in dieser Arbeit keinen Einfluss auf das durch das TNF α ausgelöste *Shedding*, wobei die Möglichkeit besteht, dass die gemeinsame Inhibition von p38 und ERK im Hinblick auf die Arbeit von Ogura et al. ein davon abweichendes Ergebnis liefern könnte. Ergänzend zu der gemachten Beobachtung findet sich eine Publikation von Bartsch et al., in welcher die Bedeutung von ADAM8, einer weiteren Metalloprotease ähnlich ADAM17/TACE, bei der degenerativen Erkrankung von Motoneuronen im zentralen Nervensystem bei Mäusen - sogenannten *wobbler-Mäusen* - behandelt wurde (Bartsch, Wildeboer et al. 2010). Es war bereits bekannt, dass TNF α zu einer Hochregulierung von ADAM8 in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia in den betroffenen Regionen im ZNS dieser erkrankten Mäuse führte (Schlommann, Rathke-Hartlieb et al. 2000). In der erwähnten Studie von Bartsch et al. konnte ein zusätzlicher Anstieg der mRNA kodierend für ADAM17 beobachtet werden. Eine angestiegene Konzentration an sTNFR1 konnte schließlich mit der erhöhten Transkription des Gens für ADAM8 in den betroffenen Regionen der Gehirne der Mäuse korreliert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass es bei ADAM8-defizienten Mäusen zu einer Verschlechterung der pathologischen Symptome mit begleitenden histologischen Befunden wie einem vermehrten Verlust von Motoneuronen und einer erhöhten Anzahl an Mikrogliazellen in diesen Regionen kam. Dabei konnte ebenfalls festgestellt werden, dass es in isolierten Primärzellen, das heißt zerebellären Neuronen, aus dem Rückenmark stammenden Astrozyten sowie Mikrogliazellen aus den *wobbler-Mäusen* zu einer

TNF α -abhängigen Regulierung der für ADAM8 kodierenden mRNA kam. Nach Stimulation mit 100 U/mL (10 ng/mL) TNF α folgte ein 7 – 10 facher Anstieg der mRNA kodierend für ADAM8, während höhere Konzentrationen über 500 U/mL (50 ng/mL) einen Abfall dieser mRNA als Reaktion brachten. Ähnlich verhielt es sich unter der Stimulation mit LPS (Bartsch, Wildeboer et al. 2010). Geht man davon aus, dass die Menge an durch ADAM8 losgelösten sTNFR1 mit der dazu kodierenden mRNA korreliert, zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie das *Rezeptorshedding* der CD4+ T-Lymphozyten in dieser Dissertation. Der Wechsellpunkt der Regulation des *Sheddings* wurde im Vergleich zu dieser Dissertation bei bereits 50 ng/mL und nicht bei 100 ng/mL an TNF α beobachtet. Jedoch stieg in der Arbeit von Bartsch et al. die Konzentration der mRNA des für das *Shedding* des TNFR1 verantwortlichen Enzyms ADAM8 bei kleineren Konzentrationen an TNF α , um bei höheren Konzentrationen erneut abzunehmen, vergleichbar mit der Konzentration des in dieser Arbeit gemessenen sTNFR1. Weiterhin wurde in der Arbeit von Bartsch et al. festgestellt, dass es bei Stimulationen im Bereich von 100-500 U/mL TNF α von ADAM8-defizienten Neuronen im Vergleich zu Wildtyp Neuronen zu einem Anstieg des Zellverlustes von 20 % auf 90 % kam und deshalb das *Rezeptorshedding* als ein neuroprotektiver Effekt angesehen werden kann (Bartsch, Wildeboer et al. 2010).

V.4 Klinische Bedeutung des TNFR1 und des TNF α -Signals

Fasst man diese Beobachtungen über das Verhalten und die Regulierung des TNFR1 im Hinblick Endozytose und *Shedding* des Rezeptors zusammen und vergleicht sie mit dem Ergebnis dieser Dissertation, zeigt sich ein folgendes Bild: Steigende Konzentrationen an TNF α bis hin zu 500 ng/mL führen in Jurkat-Zellen zu einer progredienten Abnahme des TNFR1 an der Zelloberfläche, gemessen nach 24 h und 48 h in der FACS-Analyse (Abbildung 23), und zu einer Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen (Abbildung 10). Gleichzeitig wird bis zu 100 ng/mL ein erhöhtes *Rezeptorshedding* betrieben, welches sich durch eine Zunahme des sTNFR1, gemessen nach 24 h im ELISA, äußert, während eine höhere Stimulationskonzentration zu einer erneuten Reduktion des sTNFR1 führt (Abbildung 25). Dabei kann kein direkter Größenvergleich der veränderten Rezeptormassen zwischen FACS und ELISA betrieben werden, da es sich bei beiden Messgrößen, dem SFI und der OD, um relative Größen handelt. Aus diesem Grund bleibt unklar in welchem Verhältnis die abgenommene Rezeptordichte an der Zelloberfläche zur gemessenen Menge an sTNFR1 im Medium steht und welchen Anteil dabei die mögliche Endozytose des Rezeptors trägt. Dies ergänzt sich mit der bestehenden Literatur in der dem *Shedding* eine Rolle bei der Regulierung von zellulären Prozessen zugeschrieben wird. Die Inhibition von p38 nahm - trotz der Annahme von einer

Beteiligung der MAPK bei diesen Vorgängen - keinen direkten Einfluss auf die beobachteten Effekte. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Ergebnisse in dieser Arbeit einen Hinweis geben können, welchen Beitrag steigende TNF α Konzentrationen an der Regulierung des TNFR1 in CD4+ T-Lymphozyten leisten und somit Möglichkeiten liefern um Immunantworten zu modulieren oder gar zu begrenzen. Dass diese Frage dabei nicht nur von akademischer Relevanz ist, zeigt sich, wenn man einen Blick auf Erkrankungen wirft, die im direkten Zusammenhang zu einer Fehlregulierung in der TNFR1 Expression stehen. So entwickelten Mäuse in einer Arbeit von Xanthoulea et al., welche eine Mutation für einen *unshedddable* TNFR1 trugen, häufiger eine TNF α -abhängige, chronisch aktive Hepatitis. Zudem zeigten sie eine gesteigerte letale Neigung zur Entwicklung eines TNF α - oder LPS-induzierten, endotoxischen Schocks, obwohl sie ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen gegenüber *Listeria monocytogenes* aufwiesen. Es wurde vermutet, dass das *Shedding* des TNFR1 auch von Bakterien als *Escape*-Mechanismus genutzt wird, um eine Immunantwort einzuschränken. Die Unfähigkeit den Rezeptor von der Zelloberfläche abzutrennen führte ebenfalls zu einer gesteigerten Antwort des angeborenen Immunsystems. Makrophagen, die als Hauptproduzenten von TNF α gelten und ebenfalls diese Mutation im TNFR1 besaßen, zeigten nach Stimulation mit LPS eine erhöhte Anhäufung an intrazellulärer, für TNF α kodierender mRNA und wiesen eine erhöhte Produktion an TNF α und NO auf. Letzen Endes wurde an dieser Art von Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit mit aggravierten Verläufen für autoimmune Erkrankungen wie der chronisch inflammatorischen Polyarthrit, einem Mausmodell ähnlich der humanen rheumatoiden Arthritis, und der EAE, dem bereits in der Einleitung erwähnten Modell für Multiple Sklerose, aufgezeigt. Im Vergleich zu Wildtyp Mäusen kam es bei der EAE zum Beispiel zu einer erhöhten Anzahl an T-Zellen und aktivierten Makrophagen/Mikroglia im Bereich des Rückenmarks (Xanthoulea, Pasparakis et al. 2004). Unlängst wurde auch bei Menschen der Polymorphismus rs4149584 in dem für den TNFR1 kodierenden Gen *TNFRSF1A* identifiziert und mit einem erhöhten Risiko an einer MS zu erkranken assoziiert. Dabei ging die Trägerschaft dieses Polymorphismus mit erhöhten Serumkonzentrationen des sTNFR1 einher (Comabella, Caminero et al. 2013). Es sei jedoch im Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose auf die noch nicht verstandene Komplexität und Diversität des TNF α -Signalweges verwiesen, die sich in dem bereits erwähnten, gescheiterten Versuch die Multiple Sklerose bei Menschen mit einer anti-TNF α -Therapie zu behandeln, zeigten (van Oosten, Barkhof et al. 1996). Ein weiteres Beispiel für die Rolle des TNFR1 und dessen Regulationsmechanismus im Bereich der humanen Erkrankungen ist das sogenannte *TNF receptor-associated periodic syndrom* (TRAPS). Bei diesem kommt es, ausgelöst durch Mutationen im extrazellulären Bereich des TNFR1 (Auflistung pathogener DNA-Veränderungen: INFEVERS website

[<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>]), zu periodisch auftretenden, heterogenen Symptomen, wie zum Beispiel Fieber, Schüttelfrost und Muskelschmerzen, aber auch Übelkeit und Erbrechen sowie Hautauschlägen (Saulsbury, Wispelwey 2005; Trost, Rose 2005; D'O-sualdo, Ferlito et al. 2006). Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Pathogenese in einer Unfähigkeit des *Sheddings*, einer Anhäufung des fehlgefalteten TNFR1 im ER der Zelle oder in weiteren Pathomechanismen liegt, wobei keine Universalursache für alle der verschiedenen Mutationen zu existieren scheint (Kimberley, Lobito et al. 2007). In einer aktuellen Untersuchung wurde die These aufgestellt, dass CD4+ T-Lymphozyten unter einem anhaltenden TNF α -Signal im Rahmen von chronischen viralen Infektionen, wie zum Beispiel mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), eine sogenannte Erschöpfung (Balkhi, Ma et al. 2015) erleiden. Die Autoren schlussfolgerten, dass diese Dysfunktionalität der T-Zellen gegebenenfalls durch eine Unterbrechung des TNF α -Signals aufgehoben und zu einer besseren Kontrolle der Virusinfektion durch das Immunsystem führen könnte (Beyer, Abdullah et al. 2016). Es finden sich selbstredend weitere Beispiele, in denen der TNF α -Signalweg eine Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie dem gesteigerten Empfinden von Schmerz, der Bildung von Tumoren oder kardiovaskulären Erkrankungen, spielt, und das medikamentöse Eingreifen in diesen Signalweg neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet (Kallioulas, Ivashkiv 2015). Dies zeigt in der Zusammenschau die Bedeutung des TNF α -Signalweges und der Regulierung des TNFR1 und, dass das in dieser Arbeit beobachtete, TNF α -konzentrationsabhängige Verhalten dieses Rezeptors von signifikanter Bedeutung ist.

V.5 Das Versuchsdesign

Im Hinblick auf mögliche Kritikpunkte dieser Dissertation ist zu beachten, dass das verwendete Versuchsdesign seine Grenzen aufzeigt, die einen Einfluss auf das Ergebnis - die TNF α -konzentrationsabhängige Steigerung der Apoptoserate CD4+ T-Lymphozyten (Abbildung 10) - nehmen können. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Jurkat-Zellen handelt es sich um CD4+ T-Lymphozyten, welche im Jahre 1976 aus dem Blut eines ursprünglich 14-jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) gewonnen wurden (Schneider, Schwenk et al. 1977). Da es sich um immortalisierte Zellen handelt könnte es durchaus möglich sein, dass diese Jurkat-Zellen ein verändertes Proliferations- und Apoptoseverhalten aufzeigen. Dabei werden diese Zellen in Kultur gehalten und somit den physiologischen Bedingungen entzogen. Im Falle der CD4+ T-Lymphozyten ist, der Apoptosevorgang maßgeblich von Einflüssen wie externe Stimuli zum Beispiel der Aktivierung des TCR durch antigenpräsentierende Zellen (Karas, Zaks et al. 1999) oder der Sensibilisierung der Zelle durch einflussnehmendes, auch von den Zellen

selbst produziertes, IL-2 (Lenardo 1991) abhängig. Es ist anzunehmen, dass diese im humanen Körper ablaufenden Prozesse wie schwankende Hormonspiegel und Zell-Zell-Interaktionen in einer reinen Monokultur nur in eingeschränkten Maßen gegeben sind. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Änderung des Zuckerhaushaltes zugunsten eines Fructosemetabolismus bei Jurkat-Zellen zu einer erhöhten Anfälligkeit für Apoptose in einer Zellkultur führt (Diaz-Aguirre, Velez-Pardo et al. 2016). Gleichzeitig schafft eine solche Zellkultur aber genau jenes Setting, das benötigt wird, um singuläre Einflüsse auf Zellen wie die durch $TNF\alpha$, untersuchen zu können, ohne dabei andere, interferierende Signale oder Störfaktoren in die Messungen mit aufzunehmen. Es bleibt die Feststellung, dass Versuche in kontrollierten Studien am Tiermodell oder gar am Menschen die Realität besser abbilden, jedoch das Modell einer Zellkultur das Mittel der Wahl ist, um einen singulären Wirkmechanismus zu untersuchen. Zudem scheint die Rolle von p38 bei der Apoptose von CD8+ T-Lymphozyten eine größere zu spielen als bei jener CD4+ T-Lymphozyten (Merritt, Enslin et al. 2000). Im Zellkulturprojekt ist die Untersuchung CD8+ T-Lymphozyten jedoch schwer zu realisieren, da es an kultivierbaren, reinen CD8+ T-Lymphozyten mangelt. Eine mögliche Erweiterung dieser Arbeit läge somit darin, mit *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) zu arbeiten, das heißt die nötigen CD8+ T-Lymphozyten erst durch Ficollierung aus Blutproben zu gewinnen und durch magnetische Zellseparation von den restlichen Zellarten zu trennen.

Ein weiterer Diskussionspunkt wäre die Wahl der Messzeitpunkte. Mit den Stimulationsspannen von 24 h beziehungsweise 48 h wurden in dieser Arbeit verhältnismäßig lange Zeitspannen gewählt, so dass es sein könnte, dass mögliche Apoptoseveränderungen bereits vor den in dieser Arbeit verwendeten Messzeitpunkten stattgefunden haben. Dabei ist es schwierig einen idealen Zeitpunkt für die Messungen festzulegen. So beobachteten Micheau, Tschopp et al. die Bildung des Komplexes II mit Caspase 8 und FADD bereits nach 30 - 60 min nach der Stimulation mit $TNF\alpha$. Die gebildete Menge des Komplexes nahm stetig zu, erreichte nach 4 - 8 h ihr Maximum und war auch nach 16 h noch als lang lebender Komplex nachzuweisen (Micheau, Tschopp 2003). In der Arbeit von Schneider-Brachert et al., in welcher die Endozytose des TNFR1 durch eine Temperaturerhöhung nach $TNF\alpha$ -Stimulation provoziert wurde, konnte bereits nach 10 - 30 min eine Endozytose des Rezeptors gemessen werden (Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Erste mitochondriale Veränderungen, die für eine beginnende Apoptose sprechen, wie die mitochondriale Schwellung, konnten in Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit $TNF\alpha$ bereits nach 10 min festgestellt werden, während signifikante Veränderungen in den eigentlichen Effekten der Apoptose, wie der Anhäufung von Phosphatidylserinen in der Zellmembran, den Brüchen in der DNA oder der Aktivierung von Caspasen, erst

nach 12 - 24 h registriert werden konnten (Shakibaei, Sung et al. 2010). In ECs, das heißt Endothelzellen aus einer humanen Umbilikalvene, konnte bereits 2 h nach der Behandlung mit apoptotisch wirkenden Agenzien wie Natriumsalicylsäure eine Reduktion des TNFR1 um 50 % an der Zelloberfläche detektiert werden (Madge, Sierra-Honigmann et al. 1999). Die alleinige Inhibition von p38 durch den Inhibitor SB202190 in Jurkat-Zellen zeigte nach 14 h das halbe Maximum an apoptotischen Raten, welche aber noch bis 50 h nach Inhibition anstiegen (Nemoto, Xiang et al. 1998), während die durch CHX sensibilisierten Zellen 16 - 18 h nach Stimulation mit TNF α ihr Maximum an Apoptose zeigten (Varghese, Chattopadhyaya et al. 2001). So liegen die in dieser Arbeit gewählten Messpunkte, nach 24 h und 48 h, einige Zeit nach den in anderen Arbeiten ersten gemessenen Veränderung, allerdings ist nicht auszuschließen, dass nicht auch nach 48 h noch apoptotische Veränderungen in den Zellen zu beobachten sind, zumal der zeitliche Faktor, neben der Stimulationskonzentration, ebenfalls einen Einfluss auf das Rezeptorsignal haben kann (Micheau, Tschopp 2003). Auch wenn die zeitliche Apoptosekinetik nicht im Fokus dieser Arbeit stand, da in erster Linie die Apoptose zu verschiedenen Zeitpunkten zur Lokalisation des TNFR1 korreliert werden sollte, hätte über entsprechende Vorversuche ein mögliches Apoptoseverhalten der Jurkat-Zellen auf einen konkreten Zeitraum eingegrenzt werden können. Damit hätte eine Unsicherheit bezüglich der gewählten Zeitpunkte vermieden werden können. Hinzu kommt, dass, wie bereits erwähnt, in anderen Arbeiten Jurkat-Zellen eine relative Resistenz gegenüber TNF α -induzierter Apoptose besitzen (Aggarwal, Moffat et al. 1984; Sugarman, Aggarwal et al. 1985). Es besteht folglich die Möglichkeit, dass die Methoden, mit welchen der Apoptosegrad in dieser Arbeit quantifiziert werden sollte, nicht sensitiv genug sind, um minimale Veränderungen auf molekularer Ebene unter den vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten zu detektieren. Dies könnte auch erklären, warum in der Methode des Western-Blots keine Veränderungen in den gemessenen Mengen apoptosevermittelnder Proteine zu finden sind (Abbildungen 11 – 16), während in der FACS-Analyse ein Anstieg der Apoptoserate gemessen wurde (Abbildung 10). In diesem Kontext sollte ebenso die Relevanz der gemessenen Zelltodraten in der FACS-Analyse kritisch hinterfragt werden. Diese befanden sich unter den verschiedenen Stimulationskonzentrationen sowie zu den verschiedenen Messzeitpunkten trotz des signifikanten Anstiegs im einstelligen Prozentbereich. Es ist davon auszugehen, dass durch den natürlichen Zellumsatz in jeder Zellkultur mit einem gewissen Anteil an sterbenden Zellen - sei es aufgrund von Apoptose oder Nekrose - gerechnet werden muss. In dieser Arbeit konnte zwar ein statistischer Zusammenhang zwischen den steigenden Konzentrationen an TNF α und dem steigenden Anteil an 7AAD-positiver Zellen gezeigt werden, allerdings kann nicht mit

vollständiger Sicherheit von einer damit verbundenen Zunahme der Apoptose ausgegangen werden, da 7AAD lediglich den Verlust der Zellintegrität misst. Die Messung einer möglichen Zyotoxizität im LDH-Assay ergab keine signifikante Änderung unter der steigenden Konzentration an TNF α (Abbildung 21). Diese Methode könnte jedoch nicht sensitiv genug sein, um bei den relativ geringen Änderungen der 7AAD-positiven Zellen einen statistisch messbaren Effekt zu zeigen. Diese Möglichkeit wird durch die bereits erwähnte Diskrepanz zwischen dem steigenden Anteil 7AAD-positiver Zellen in der FACS-Analyse (Abbildung 10) und den unveränderten Konzentrationen apoptoserelevanter Proteine im Western Blot (Abbildungen 11 - 16) sowie auf der Ebene der transkribierten mRNA (Abbildungen 17 - 19) unterstützt. Zudem ist TNF α ein bekannter Induktor der Nekrose beziehungsweise Nekroptose (Kaczmarek, Vandenabeele et al. 2013). Eine mögliche Lösung dieses Problems läge in der Doppelfärbung der Zellen mit 7AAD und Annexin V. Mit Hilfe von Annexin V können frühe apoptotische Ereignisse in der FACS-Analyse gemessen werden. Annexin V bindet dabei an die negativ geladenen Phosphatidylserine, die im Rahmen der Apoptose an die äußere Zellmembranschicht translokalisiert werden (Vermees, Haanen et al. 1995). Dadurch könnte der Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen genauer erfasst werden.

Auch die Messung der Proliferationsaktivität der Jurkat-Zellen mit Hilfe des *WST-1 Assays* sollte an dieser Stelle diskutiert werden. Der Assay beruht auf der enzymatischen Umsetzung des wasserlöslichen WST-1 in Formazan unter der Wirkung der Nicotinamidadenindinukleotid(NADH)-Dehydrogenase (Berridge, Herst et al. 2005). Diese Reaktion ist somit abhängig von einer intakten mitochondrialen Funktion und aus diesem Grund vielmehr ein Marker für die Zellviabilität an sich als dem Proliferationsverhalten der Zellen. Spezifischer könnte eine Quantifizierung der Proliferationsaktivität der Zellen durch die Färbung mit Carboxy-Fluorescein-Succinimidylester (CFSE) erfolgen. Der Farbstoff wird bei der Zellteilung in gleichem Maße an die beiden Tochterzellen verteilt, so dass im Anschluss die Stärke der Fluoreszenz des CFSE mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden kann (Lyons, Parrish 1994). Auf diese Weise könnte die Proliferationsaktivität der Jurkat-Zellen über mehrere Zellteilungen verfolgt und quantifiziert werden. Folglich könnte durch diese Färbung der Einfluss verschiedener Konzentrationen an TNF α beziehungsweise der Inhibition von p38 auf das Proliferationsverhalten der Jurkat-Zellen spezifischer dargestellt werden als durch die Messung mit dem *WST-1 Assay*.

Ein weiterer diskussionswürdiger Punkt, sind die eingesetzten Konzentrationen an TNF α (0 - 500 ng/mL). In einigen bereits bestehenden Publikationen zum Thema der TNF α -induzierten Apoptose in Zellkulturen wurde mit Konzentrationen im unteren Nanogramm-

Bereich gearbeitet (Varghese, Chattopadhyaya et al. 2001; Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Auch bei Krankheiten, bei denen Inflammationen eine wesentliche Rolle spielen, hielten sich die gemessenen TNF α -Spiegel in vergleichbaren Bereichen auf. So lagen die Konzentrationen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) bei ungefähr 10 pg/mL, wobei auch einzelne Werte um die 1 ng/mL und im akuten Schub erhöhte Konzentrationen gemessen wurden (Komatsu, Kobayashi et al. 2001). Bei Patienten mit schwerer Sepsis, bei der eine massive Immunantwort entwickelt wird, variierten die TNF α -Konzentrationen dabei von 100 – 5000 pg/mL (Damas, Reuter et al. 1989). Im Vergleich zu diesen Arbeiten liegt die in dieser Dissertation verwendete Spitzenkonzentration von 500 ng/mL weit über diesem Bereich. Dabei existieren jedoch auch Publikationen, bei welchen bereits die Apoptose von Jurkat-Zellen unter TNF α -Stimulationskonzentrationen bis zu 1000 ng/mL und darüber hinaus in Zellkulturen untersucht wurde (Thomas, Hersey 1998; Micheau, Lens et al. 2001). Zudem sind bei Patienten im peripheren Blut gemessene Konzentrationen niedriger als die direkt im Milieu der Entzündung ausgeschütteten Konzentrationen an TNF α anzunehmen. Dies wird zum einen in einer Studie angedeutet, in welcher die TNF α -Konzentrationen direkt im Wundsekret von chronisch venösen Beinulzera bestimmt wurden. Es befanden sich die meisten Werte zwischen 0 – 4 ng/mL, wobei auch ein einzelner Spitzenwert um die 10 ng/mL gemessen wurde (Wallace, Stacey 1998). Zum anderen zeigt sich diese Problematik, wenn man die geringe Halbwertszeit von TNF α betrachtet. Es ist schwer zu sagen, in welcher Höhe sich das TNF α am eigentlichen Ort einer Entzündung im akuten Stadium befindet, da die Halbwertszeit dieses Zytokins bei nur ungefähr 18 min liegt (Oliver, Bland et al. 1993). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen durchaus auch dem natürlichen Abbild entsprechen, vor allem im Hinblick darauf, dass in einer aktiven Entzündung mit hohen Zytokinlevel jene Regulationsmechanismen, die in dieser Dissertation untersucht wurden, zum Tragen kommen.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

Das Zytokin TNF α stand aufgrund seiner unterschiedlichen Funktionen und seiner unter anderem über den TNFR1 vermittelten Rolle in inflammatorischen Geschehen bereits im Zentrum zahlreicher Arbeiten. Es ist in unterschiedlichen Zellpopulationen und unter unterschiedlichen Bedingungen in der Lage, gegensätzliche Zellsignale auszulösen: Zellproliferation sowie -apoptose (Ashkenazi, Dixit 1998; Wallach, Varfolomeev et al. 1999). Dies kann über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, die Rekrutierung apoptoseauslösender Proteine (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003) oder die Phosphorylierung von MAPKs, wie p38, geschehen (Yuasa, Ohno et al. 1998). Die genauen Regulationsmechanismen, welche über das Schicksal einer Zelle entscheiden, bleiben dabei nicht gänzlich geklärt. Die Signaltransduktion des TNFR1 kann über zwei posttranslationale Arten modifiziert werden: die Rezeptorendozytose (Micheau, Tschopp 2003; Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004) und das *Rezeptorshedding* (Leeuwenberg, Dentener et al. 1994; Pedron, Girard et al. 2003). Auf der Grundlage einer bereits bestehenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Tietz, Hofmann et al. 2014) erstellten wir die Hypothese, dass die Hemmung des p38-Signalweges in CD4+ T-Lymphozyten das Apoptoseverhalten dieser Zellen ändern und somit Einfluss auf den Verlauf autoimmuner Erkrankungen wie dem Mausmodell der Multiplen Sklerose - der EAE - nehmen könnte. Die in dieser Arbeit verwendeten Jurkat-Zellen zeigten *in vitro* nach 24 h sowie 48 h eine Zunahme der Apoptoserate unter steigenden TNF α -Konzentrationen. Ebenso konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme des an der Zelloberfläche der CD4+ T-Lymphozyten exprimierten TNFR1 gemessen werden. Die Konzentration der löslichen Form des TNFR1, der sTNFR1, stieg unter Stimulationskonzentrationen bis hin zu 100 ng/ml an, um unter höheren Stimulationskonzentrationen erneut abzufallen. Die Hemmung von p38 nahm auf dieses beobachtete Verhalten keinen Einfluss. Somit konnte *in vitro* die ursprüngliche Arbeitshypothese nicht bestätigt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Stimulationskonzentrationen an TNF α die Lokalisation des TNFR1 maßgeblich verändern und auf diesem Weg einen Einfluss auf den Signalweg selbst nehmen können. Abschließend kann gesagt werden, dass in Mechanismen, die das Rezeptorverhalten nachhaltig verändern, sei es im Bereich des *Sheddings*, der Endozytose oder folgender intrazellulärer Signalkaskaden, vielleicht die Ursache vieler Erkrankungen des Immunsystems, besonders autoimmuner Natur, liegen und deren Entschlüsselung der erste Schritt in die Richtung einer effizienten, Patienten-angepassten Therapie mit gegebenenfalls Aussicht auf Heilung sind.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Für das Immunsystem ist es von immenser Bedeutung seine Abläufe streng zu regulieren. Auf Antigenkontakt sollte eine starke Stimulierung gefolgt von einer Inflammation stattfinden, während überschießende oder autoimmune Reaktionen eingebremst werden müssen. Eine Schlüsselrolle fällt dabei dem Zytokin TNF α zu, welches Zelltod wie auch –proliferation auslösen kann und dessen Effekte unter anderem von der MAPK p38 mitreguliert werden. Die genauen Mechanismen, durch welche über das Schicksal der einzelnen Zelle entschieden wird, blieben bisher noch zu großen Teilen unbekannt. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit im Rahmen eines Zellkulturprojekts anhand von Jurkat-Zellen das Apoptoseverhalten CD4⁺ T-Lymphozyten unter dem Einfluss steigender TNF α -Konzentrationen und der Inhibition von p38 untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Lokalisation des TNFR1 gelegt, da dessen Signal auf verschiedene Art und Weise, wie die Rezeptorendozytose oder dem *Rezeptorshedding*, posttranslational modifiziert werden kann. Die Ergebnisse in der FACS-Analyse zeigten, dass nach 24 h sowie nach 48 h, die Apoptoserate der Zellen unter steigenden Konzentrationen an TNF α anstieg. Die im Western-Blot bestimmten Gesamtproteinmengen der apoptoserelevanten Proteine cFlip, *cleaved* PARP, (*cleaved*) Caspase 3, Caspase 8 und Caspase 9 sowie die in der RT-PCR semiquantitativ gemessene cDNA kodierend für Caspase 8 und cFlip welche zuvor aus den zugehörigen mRNA Sequenzen revers transkribiert wurden, zeigten keine signifikanten Veränderungen. Ein 24 h nach Stimulation durchgeführter LDH-Assay konnte den Einfluss von Zytotoxizität ausschließen, während im Proliferationsassay WST-1 eine Abnahme der Proliferationsrate beobachtet werden konnte. Die in der FACS-Analyse gemessene Dichte des an Zelloberfläche exprimierten TNFR1 nach 24 h beziehungsweise 48 h nahm TNF α -konzentrationsabhängig ab, während die im Western-Blot bestimmte Proteinmenge des Rezeptors konstant blieb. Mit Hilfe eines ELISA konnte die Konzentration des löslichen Anteils des TNFR1, der sTNFR1, im Medium quantifiziert werden. Dabei gab sich folgendes Bild: bei Stimulationskonzentrationen unter 100 ng/mL kam es zu einer nahezu Verdreifachung des sTNFR1 im Medium nach 24 h, während höhere Stimulationen mit TNF α zu einer erneuten Reduktion der Konzentration des gelösten Rezeptors führten. Die beobachteten Ergebnisse wurden durch die Inhibition von p38 durch SB253080 nicht beeinflusst. Diese Arbeit konnte somit einen Hinweis auf einen TNF α -konzentrationsabhängigen Regulationsmechanismus des TNFR1-Signalweges liefern. Dieser könnte in der Pathogenese von Erkrankungen des Immunsystems, auch im Sinne von Autoimmunerkrankungen, eine Rolle spielen.

VIII. SUMMARY

A very important task of the human immune system is the regulation of its own processes. When confronted by antigen, it should be stimulated and lead to an inflammation, while overreactions, even reactions against the own bodystructures, have to be prevented as good as possible. One of the key-cytokines taking a role in this part, is TNF- α , which can be a stimulus for cell-proliferation and –death and whose signal is mediated among others by p38. Though being investigated in a lot of researches before, many of the exact mechanisms, leading to either one of the destinies of the cell, still remain unknown. Therefore, it was the aim of this dissertation to illuminate the behavior in apoptosis of CD4+ t-lymphocytes under the influence of increasing stimulations by TNF α and the inhibition of p38 by using Jurkat-cells in a cell culture project. Moreover, this work was especially focused on the localization of the TNFR1 since its signaling can be affected by posttranslational modification, for instance receptorendocytosis or receptorshedding. The results of the FACS-analysis showed that the rate of apoptosis measured after 24 h and 48 h was raised, although the Jurkat-cells proved themselves as relatively resistant against TNF α -induced apoptosis. The level of apoptosis-relevant proteins in the cells, such as cFlip, *cleaved* PARP, (cleaved) caspase 3, caspase 8 and caspase 9 that were analyzed by Western-Blots, did not indicate a significant change. In conclusion, the amount of cDNA encoding for cFlip and caspase 8 which were reverse transcribed from the corresponding mRNA sequences stayed on a constant rate. Cytotoxicity was excluded by a LDH-assay performed 24 h after stimulation, while a slight but significant reduction of the proliferation rate was observed by using the proliferation-assay WST-1. The density of the TNFR1 on the surface of the cells measured by FACS showed a reduction of 50 % in a TNF α -concentration dependent manner after 24 h or 48 h, while the total amount of the receptor registered by Western-Bot always stayed the same. The concentration of the soluble TNFR1 – the so called sTNFR1 – was quantified by an ELISA kit after 24 h and delivered the following results: After stimulations with concentrations below 100 ng/mL of TNF- α the level of the sTNFR1 almost tripled, whereas concentrations above 100 ng/mL lead to a reduction of its rate again. The inhibition of p38 by SB253080 had no effect on all the observations that were made. These findings could give us one more notion about the regulation mechanisms of TNFR1-signaling, which can also be part of the pathogenesis of diseases concerning the immune system including autoimmune disorders.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
rpm	<i>rounds per minute</i> (engl. Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Bildliche Darstellung der Polarisierung CD4+ T-Lymphozyten.....	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der intrazellulären Apoptose-Signalkaskaden.....	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Feedback-Mechanismus bei der Apoptose von T-Lymphozyten.....	10
Abbildung 4:	Schematisch vereinfachte Darstellung des TNFR1-Signalwegs.	13
Abbildung 5:	Schema einer Durchflusszytometriemessung.....	22
Abbildung 6:	Schema einer Gelelektrophorese.	28
Abbildung 7:	Beispiel einer entwickelten Membran.	32
Abbildung 8:	Schematische Darstellung zweier ELISA-Wells.....	32
Abbildung 9:	Messprinzip eines LDH-Assays.....	34
Abbildung 10:	Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit TNF α und der Inhibition von p38 in der Durchflusszytometrie.	42
Abbildung 11:	Semiquantitative Messung der Proteinexpression von cleaved PARP nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.....	44
Abbildung 12:	Semiquantitative Messung der Proteinexpression von cFlip nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	45
Abbildung 13:	Semiquantitative Messung der Proteinexpression von Caspase 3 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	46
Abbildung 14:	Semiquantitative Messung der Proteinexpression von cleaved Caspase 3 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.....	47
Abbildung 15:	Semiquantitative Messung der Proteinexpression von Caspase 8 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	48
Abbildung 16:	Semiquantitative Messung der Proteinexpression von Caspase 9 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	50
Abbildung 17:	Expression der mRNA von Caspase 8 normiert auf GAPDH nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p3.	52
Abbildung 18:	Expression der mRNA von cFlip normiert auf GAPDH nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	53
Abbildung 19:	Quotient aus der mRNA-Expression von cFlip/Caspase 8 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	54

Abbildung 20:	Proliferationsverhalten der Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	56
Abbildung 21:	Fehlender Zytotoxizitätsnachweis im LDH-Assay nach der Stimulierung von CD4+ T-Lymphozyten mit TNF α	58
Abbildung 22:	Beispielhafte Darstellung von durchflusszytometrischen Dot Blots.....	59
Abbildung 23:	In der Durchflusszytometrie gemessene Konzentration des an der Zelloberfläche lokalisierten TNFR1.	60
Abbildung 24:	Semiquantitative Messung der Proteinexpression des TNFR1 nach der Simulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	62
Abbildung 25:	Photometrische Quantifizierung des sTNFR1 nach der Stimulation mit TNF α und der Inhibition von p38.	63

QUELLEN

- Adam-Klages, S., D. Adam, et al. (1996). "FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase." Cell **86**(6): 937-47.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-56.
- Aggarwal, B. B., B. Moffat, et al. (1984). "Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization." J Biol Chem **259**(1): 686-91.
- Alberts, B. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
- Balkhi, M. Y., Q. Ma, et al. (2015). "T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation." Cytokine **71**(2): 339-47.
- Bartsch, J. W., D. Wildeboer, et al. (2010). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) regulates shedding of TNF-alpha receptor 1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8: evidence for a protease-regulated feedback loop in neuroprotection." J Neurosci **30**(36): 12210-8.
- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol **11**(9): 372-7.
- Berridge, M. V., P. M. Herst, et al. (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." Biotechnol Annu Rev **11**: 127-52.
- Bertrand, M. J., S. Milutinovic, et al. (2008). "cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination." Mol Cell **30**(6): 689-700.
- Beyer, M., Z. Abdullah, et al. (2016). "Tumor-necrosis factor impairs CD4(+) T cell-mediated immunological control in chronic viral infection." Nat Immunol **17**(5): 593-603.
- Bigda, J., I. Beletsky, et al. (1994). "Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity." J Exp Med **180**(2): 445-60.
- Black, R. A., C. T. Rauch, et al. (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-33.
- Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Boehme, S. A. and M. J. Lenardo (1993). "Propriciodal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle." Eur J Immunol **23**(7): 1552-60.
- Boone, E., V. Vandevoorde, et al. (1998). "Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and p38 MAPK by tumor necrosis factor (TNF) is mediated through the death domain of the 55-kDa TNF receptor." FEBS Lett **441**(2): 275-80.
- Bradley, J. R., S. Thiru, et al. (1995). "Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells." Am J Pathol **146**(1): 27-32.

- Brancho, D., N. Tanaka, et al. (2003). "Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo." Genes Dev **17**(16): 1969-78.
- Brenner, B., U. Koppenhoefer, et al. (1997). "Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153." J Biol Chem **272**(35): 22173-81.
- Brenner, D., H. Blaser, et al. (2015). "Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die." Nat Rev Immunol **15**(6): 362-74.
- Campbell, J., C. J. Ciesielski, et al. (2004). "A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis." J Immunol **173**(11): 6928-37.
- Carpentier, I., W. Declercq, et al. (1998). "TRAF2 plays a dual role in NF-kappaB-dependent gene activation by mediating the TNF-induced activation of p38 MAPK and IkappaB kinase pathways." FEBS Lett **425**(2): 195-8.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-5.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-86.
- Clement, M. V. and I. Stamenkovic (1994). "Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions." J Exp Med **180**(2): 557-67.
- Comabella, M., A. B. Caminero, et al. (2013). "TNFRSF1A polymorphisms rs1800693 and rs4149584 in patients with multiple sclerosis." Neurology **80**(22): 2010-6.
- Cottin, V., A. Van Linden, et al. (1999). "Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) by p42(mapk/erk2) induces changes in its subcellular localization." J Biol Chem **274**(46): 32975-87.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1358-75.
- D'Oswaldo, A., F. Ferlito, et al. (2006). "Neutrophils from patients with TNFRSF1A mutations display resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis: pathogenetic and clinical implications." Arthritis Rheum **54**(3): 998-1008.
- Damas, P., A. Reuter, et al. (1989). "Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans." Crit Care Med **17**(10): 975-8.
- Deng, G. and E. R. Podack (1993). "Suppression of apoptosis in a cytotoxic T-cell line by interleukin 2-mediated gene transcription and deregulated expression of the protooncogene bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2189-93.
- Devin, A., A. Cook, et al. (2000). "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." Immunity **12**(4): 419-29.
- Dhein, J., H. Walczak, et al. (1995). "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)." Nature **373**(6513): 438-41.
- Diaz-Aguirre, V., C. Velez-Pardo, et al. (2016). "Fructose sensitizes Jurkat cells oxidative stress-induced apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent mechanisms." Cell Biol Int.

- Diaz-Rodriguez, E., J. C. Montero, et al. (2002). "Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding." Mol Biol Cell **13**(6): 2031-44.
- Dillon, C. P., A. Oberst, et al. (2012). "Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex." Cell Rep **1**(5): 401-7.
- Draber, P., S. Kupka, et al. (2015). "LUBAC-Recruited CYLD and A20 Regulate Gene Activation and Cell Death by Exerting Opposing Effects on Linear Ubiquitin in Signaling Complexes." Cell Rep **13**(10): 2258-72.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Duke, R. C. and J. J. Cohen (1986). "IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells." Lymphokine Res **5**(4): 289-99.
- Fan, H. and R. Derynck (1999). "Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades." Embo J **18**(24): 6962-72.
- Farley, N., G. Pedraza-Alva, et al. (2006). "p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8+ T cells." Mol Cell Biol **26**(6): 2118-29.
- Farooq, A. and M. M. Zhou (2004). "Structure and regulation of MAPK phosphatases." Cell Signal **16**(7): 769-79.
- Feoktistova, M., P. Geserick, et al. (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." Mol Cell **43**(3): 449-63.
- Fields, P. E., S. T. Kim, et al. (2002). "Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation." J Immunol **169**(2): 647-50.
- Fritsch, J., R. Fickers, et al. (2016). "TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death." Oncotarget.
- Gaud, G., D. Guillemot, et al. (2013). "EVER2 protein binds TRADD to promote TNF-alpha-induced apoptosis." Cell Death Dis **4**: e499.
- Goswami, R. and M. H. Kaplan (2011). "A brief history of IL-9." J Immunol **186**(6): 3283-8.
- Grell, M., G. Zimmermann, et al. (1999). "Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF." Embo J **18**(11): 3034-43.
- Guicciardi, M. E. and G. J. Gores (2009). "Life and death by death receptors." Faseb J **23**(6): 1625-37.
- Haas, T. L., C. H. Emmerich, et al. (2009). "Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction." Mol Cell **36**(5): 831-44.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-62.

- He, K. L. and A. T. Ting (2002). "A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells." Mol Cell Biol **22**(17): 6034-45.
- Heath, W. R., C. Kurts, et al. (1998). "Cross-tolerance: a pathway for inducing tolerance to peripheral tissue antigens." J Exp Med **187**(10): 1549-53.
- Holmstrom, T. H., I. Schmitz, et al. (2000). "MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly." Embo J **19**(20): 5418-28.
- Hsu, H., H. B. Shu, et al. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Huang, S., Y. Jiang, et al. (1997). "Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b." Immunity **6**(6): 739-49.
- Ichijo, H., E. Nishida, et al. (1997). "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways." Science **275**(5296): 90-4.
- Irmmler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190-5.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-33.
- Jiang, Y., C. Chen, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β)." J Biol Chem **271**(30): 17920-6.
- Juo, P., C. J. Kuo, et al. (1997). "Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases." Mol Cell Biol **17**(1): 24-35.
- Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, et al. (2013). "Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance." Immunity **38**(2): 209-23.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry, et al. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." Nat Rev Immunol **2**(4): 251-62.
- Kalliolias, G. D. and L. B. Ivashkiv (2015). "TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies." Nat Rev Rheumatol **12**(1): 49-62.
- Kanayama, A., R. B. Seth, et al. (2004). "TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains." Mol Cell **15**(4): 535-48.
- Karas, M., T. Z. Zaks, et al. (1999). "T cell receptor-induced activation and apoptosis in cycling human T cells occur throughout the cell cycle." Mol Biol Cell **10**(12): 4441-50.
- Karin, M. (1999). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." Oncogene **18**(49): 6867-74.

- Kavuri, S. M., P. Geserick, et al. (2011). "Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) isoforms block CD95- and TRAIL death receptor-induced gene induction irrespective of processing of caspase-8 or cFLIP in the death-inducing signaling complex." J Biol Chem **286**(19): 16631-46.
- Kimberley, F. C., A. A. Lobito, et al. (2007). "Falling into TRAPS--receptor misfolding in the TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome." Arthritis Res Ther **9**(4): 217.
- Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochem J **351 Pt 2**: 289-305.
- Komatsu, M., D. Kobayashi, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR." Clin Chem **47**(7): 1297-301.
- Komiyama, Y., S. Nakae, et al. (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **177**(1): 566-73.
- Kotlyarov, A., A. Neining, et al. (1999). "MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis." Nat Cell Biol **1**(2): 94-7.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." Mol Cell Biol **21**(12): 3964-73.
- Kriegler, M., C. Perez, et al. (1988). "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF." Cell **53**(1): 45-53.
- Krueger, A., I. Schmitz, et al. (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." J Biol Chem **276**(23): 20633-40.
- Kumar, S., P. C. McDonnell, et al. (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." Biochem Biophys Res Commun **235**(3): 533-8.
- Kung, J. T., D. Beller, et al. (1998). "Lymphokine regulation of activation-induced apoptosis in T cells of IL-2 and IL-2R beta knockout mice." Cell Immunol **185**(2): 158-63.
- Kuniyasu, Y., T. Takahashi, et al. (2000). "Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation." Int Immunol **12**(8): 1145-55.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (1996). "Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines." Bioessays **18**(7): 567-77.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-69.
- Lechner, C., M. A. Zahalka, et al. (1996). "ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4355-9.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-46.

- Lee, J. C. and P. R. Young (1996). "Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms." J Leukoc Biol **59**(2): 152-7.
- Leeuwenberg, J. F., M. A. Dentener, et al. (1994). "Lipopolysaccharide LPS-mediated soluble TNF receptor release and TNF receptor expression by monocytes. Role of CD14, LPS binding protein, and bactericidal/permeability-increasing protein." J Immunol **152**(10): 5070-6.
- Legarda-Addison, D., H. Hase, et al. (2009). "NEMO/IKKgamma regulates an early NF-kappaB-independent cell-death checkpoint during TNF signaling." Cell Death Differ **16**(9): 1279-88.
- Lenardo, M., K. M. Chan, et al. (1999). "Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment." Annu Rev Immunol **17**: 221-53.
- Lenardo, M. J. (1991). "Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis." Nature **353**(6347): 858-61.
- Lenardo, M. J., S. Boehme, et al. (1995). "Autocrine feedback death and the regulation of mature T lymphocyte antigen responses." Int Rev Immunol **13**(2): 115-34.
- Li, H. and X. Lin (2008). "Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation." Cytokine **41**(1): 1-8.
- Liu, Y., K. Z. Guyton, et al. (1996). "Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite." Free Radic Biol Med **21**(6): 771-81.
- Livolsi, A., V. Busuttill, et al. (2001). "Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B. Requirement for p56 LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases." Eur J Biochem **268**(5): 1508-15.
- Luttman, W., K. Bratke, et al. (2006). Der Experimentator Immunologie, Springer.
- Lyons, A. B. and C. R. Parish (1994). "Determination of lymphocyte division by flow cytometry." J Immunol Methods **171**(1): 131-7.
- MacFarlane, M., G. M. Cohen, et al. (2000). "JNK (c-Jun N-terminal kinase) and p38 activation in receptor-mediated and chemically-induced apoptosis of T-cells: differential requirements for caspase activation." Biochem J **348 Pt 1**: 93-101.
- Madge, L. A., M. R. Sierra-Honigmann, et al. (1999). "Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation." J Biol Chem **274**(19): 13643-9.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.
- Martin-Blanco, E. (2000). "p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions." Bioessays **22**(7): 637-45.
- Matuszewicz, D., P. Kivisakk, et al. (1999). "Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis." Mult Scler **5**(2): 101-4.
- McLaughlin, M. M., S. Kumar, et al. (1996). "Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase." J Biol Chem **271**(14): 8488-92.

- McPherson, P. S., B. K. Kay, et al. (2001). "Signaling on the endocytic pathway." Traffic **2**(6): 375-84.
- McQuade, T., Y. Cho, et al. (2013). "Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis." Biochem J **456**(3): 409-15.
- Merritt, C., H. Enslen, et al. (2000). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells." Mol Cell Biol **20**(3): 936-46.
- Micheau, O., S. Lens, et al. (2001). "NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP." Mol Cell Biol **21**(16): 5299-305.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-90.
- Moss, M. L., J. M. White, et al. (2001). "TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery." Drug Discov Today **6**(8): 417-426.
- Mullen, A. C., F. A. High, et al. (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." Science **292**(5523): 1907-10.
- Naci, D. and F. Aoudjit (2014). "Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways." Cell Signal **26**(9): 2008-15.
- Nemoto, S., J. Xiang, et al. (1998). "Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **273**(26): 16415-20.
- Oberst, A., C. P. Dillon, et al. (2011). "Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis." Nature **471**(7338): 363-7.
- Ogura, H., Y. Tsukumo, et al. (2008). "Ectodomain shedding of TNF receptor 1 induced by protein synthesis inhibitors regulates TNF-alpha-mediated activation of NF-kappaB and caspase-8." Exp Cell Res **314**(6): 1406-14.
- Ogura, H., Y. Tsukumo, et al. (2008). "ERK and p38 MAP kinase are involved in downregulation of cell surface TNF receptor 1 induced by acetoxycycloheximide." Int Immunopharmacol **8**(6): 922-6.
- Oliver, J. C., L. A. Bland, et al. (1993). "Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge." Lymphokine Cytokine Res **12**(2): 115-20.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal **12**(1): 1-13.
- Park, S. M., J. B. Yoon, et al. (2004). "Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro." FEBS Lett **566**(1-3): 151-6.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Pedron, T., R. Girard, et al. (2003). "TLR4-dependent lipopolysaccharide-induced shedding of tumor necrosis factor receptors in mouse bone marrow granulocytes." J Biol Chem **278**(23): 20555-64.
- Pennock, N. D., J. T. White, et al. (2013). "T cell responses: naive to memory and everything in between." Adv Physiol Educ **37**(4): 273-83.

- Peschon, J. J., J. L. Slack, et al. (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." Science **282**(5392): 1281-4.
- Pop, C., A. Oberst, et al. (2011). "FLIP(L) induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity." Biochem J **433**(3): 447-57.
- Rassow, J., K. Hauser, et al. (2016). Duale Reihe Biochemie, Thieme.
- Rincon, M., H. Enslin, et al. (1998). "Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway." Embo J **17**(10): 2817-29.
- Rothwarf, D. M., E. Zandi, et al. (1998). "IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex." Nature **395**(6699): 297-300.
- Roulston, A., C. Reinhard, et al. (1998). "Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha." J Biol Chem **273**(17): 10232-9.
- Russell, J. H., C. L. White, et al. (1991). "Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(6): 2151-5.
- Safa, A. R. (2012). "c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator." Exp Oncol **34**(3): 176-84.
- Salmon, R. A., I. N. Foltz, et al. (1997). "The p38 mitogen-activated protein kinase is activated by ligation of the T or B lymphocyte antigen receptors, Fas or CD40, but suppression of kinase activity does not inhibit apoptosis induced by antigen receptors." J Immunol **159**(11): 5309-17.
- Saulsbury, F. T. and B. Wispelwey (2005). "Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome in a young adult who had features of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis as a child." J Pediatr **146**(2): 283-5.
- Scheidereit, C. (2006). "I κ B kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription." Oncogene **25**(51): 6685-705.
- Schlomann, U., S. Rathke-Hartlieb, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD 156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration." J Neurosci **20**(21): 7964-71.
- Schlondorff, J. and C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding." J Cell Sci **112 (Pt 21)**: 3603-17.
- Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, et al. (2004). "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles." Immunity **21**(3): 415-28.
- Schneider, U., H. U. Schwenk, et al. (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." Int J Cancer **19**(5): 621-6.
- Schutze, S., V. Tchikov, et al. (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 655-62.

- Schutze, S., K. Wiegmann, et al. (1995). "TNF-induced activation of NF-kappa B." Immunobiology **193**(2-4): 193-203.
- Schwenger, P., D. Alpert, et al. (1998). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I kappa B alpha phosphorylation and degradation." Mol Cell Biol **18**(1): 78-84.
- Schwenger, P., P. Bellosta, et al. (1997). "Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2869-73.
- Shakibaei, M., B. Sung, et al. (2010) "TNF-alpha-induced mitochondrial alterations in human T cells requires FADD and caspase-8 activation but not RIP and caspase-3 activation." Antioxid Redox Signal **13**(6): 821-31.
- Soderstrom, T. S., M. Poukkula, et al. (2002). "Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8." J Immunol **169**(6): 2851-60.
- Soond, S. M., B. Everson, et al. (2005). "ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking." J Cell Sci **118**(Pt 11): 2371-80.
- Sprent, J. and C. D. Surh (2002). "T cell memory." Annu Rev Immunol **20**: 551-79.
- Stehlik, C., R. de Martin, et al. (1998). "Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis." J Exp Med **188**(1): 211-6.
- Stokoe, D., D. G. Campbell, et al. (1992). "MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase." Embo J **11**(11): 3985-94.
- Sugarman, B. J., B. B. Aggarwal, et al. (1985). "Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro." Science **230**(4728): 943-5.
- Sytwu, H. K., R. S. Liblau, et al. (1996). "The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice." Immunity **5**(1): 17-30.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**(6): 655-69.
- Tamura, A., M. Katsumata, et al. (1996). "Inhibition of apoptosis and augmentation of lymphoproliferation in bcl-2 transgenic Fas/Fas ligand-defective mice." Cell Immunol **168**(2): 220-8.
- Tang, P., M. C. Hung, et al. (1996). "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer." Biochemistry **35**(25): 8216-25.
- Taylor-Robinson, A. W. and R. S. Phillips (1992). "Functional characterization of protective CD4+ T-cell clones reactive to the murine malaria parasite Plasmodium chabaudi." Immunology **77**(1): 99-105.
- Taylor-Robinson, A. W., R. S. Phillips, et al. (1993). "The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection." Science **260**(5116): 1931-4.

- Thomas, W. D. and P. Hersey (1998). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells." J Immunol **161**(5): 2195-200.
- Tietz, S. M., R. Hofmann, et al. (2014). "MK2 and Fas receptor contribute to the severity of CNS demyelination." PLoS One **9**(6): e100363.
- Ting, A. T. and M. J. Bertrand (2016). "More to Life than NF-kappaB in TNFR1 Signaling." Trends Immunol **37**(8): 535-45.
- Tourian, L., Jr., H. Zhao, et al. (2004). "p38alpha, but not p38beta, inhibits the phosphorylation and presence of c-FLIPS in DISC to potentiate Fas-mediated caspase-8 activation and type I apoptotic signaling." J Cell Sci **117**(Pt 26): 6459-71.
- Trost, S. and C. D. Rose (2005). "Myocarditis and sacroiliitis: 2 previously unrecognized manifestations of tumor necrosis factor receptor associated periodic syndrome." J Rheumatol **32**(1): 175-7.
- Tucek-Szabo, C. L., S. Andjelic, et al. (1996). "Surface T cell Fas receptor/CD95 regulation, in vivo activation, and apoptosis. Activation-induced death can occur without Fas receptor." J Immunol **156**(1): 192-200.
- van der Sligte, N. E., K. R. Kampen, et al. (2015). "Essential role for cyclic-AMP responsive element binding protein 1 (CREB) in the survival of acute lymphoblastic leukemia." Oncotarget **6**(17): 14970-81.
- Van Linden, A. A., V. Cottin, et al. (2000). "Phosphorylation of the membrane proximal region of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) at ERK consensus sites." J Biol Chem **275**(10): 6996-7003.
- van Oosten, B. W., F. Barkhof, et al. (1996). "Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2." Neurology **47**(6): 1531-4.
- Vanden Berghe, W., S. Plaisance, et al. (1998). "p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor." J Biol Chem **273**(6): 3285-90.
- Varghese, J., S. Chattopadhyaya, et al. (2001). "Inhibition of p38 kinase reveals a TNF-alpha-mediated, caspase-dependent, apoptotic death pathway in a human myelomonocyte cell line." J Immunol **166**(11): 6570-7.
- Veldhoen, M., C. Uytendhove, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." Nat Immunol **9**(12): 1341-6.
- Vermes, I., C. Haanen, et al. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods **184**(1): 39-51.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Wallace, H. J. and M. C. Stacey (1998). "Levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF receptors in chronic venous leg ulcers--correlations to healing status." J Invest Dermatol **110**(3): 292-6.

- Wallach, D., E. E. Varfolomeev, et al. (1999). "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." Annu Rev Immunol **17**: 331-67.
- Wang, C., L. Deng, et al. (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." Nature **412**(6844): 346-51.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." Science **281**(5383): 1680-3.
- Wang, L., F. Du, et al. (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.
- Wang, X. S., K. Diener, et al. (1997). "Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **272**(38): 23668-74.
- Weskamp, G., J. Schlondorff, et al. (2004). "Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR)." J Biol Chem **279**(6): 4241-9.
- Wilkinson, M. G. and J. B. Millar (2000). "Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways." Faseb J **14**(14): 2147-57.
- Woo, C. H., T. H. Kim, et al. (2006). "Inhibition of receptor internalization attenuates the TNFalpha-induced ROS generation in non-phagocytic cells." Biochem Biophys Res Commun **351**(4): 972-8.
- Wysk, M., D. D. Yang, et al. (1999). "Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3763-8.
- Xanthoulea, S., M. Pasparakis, et al. (2004). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases." J Exp Med **200**(3): 367-76.
- Yagi, R., J. Zhu, et al. (2011). "An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation." Int Immunol **23**(7): 415-20.
- Yamaoka, S., Courtois, G., et al. (1998). "Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation." Cell. 1998 Jun 26;93(7):1231-40.
- Yeh, W. C., A. Shahinian, et al. (1997). "Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice." Immunity **7**(5): 715-25.
- Yuasa, T., S. Ohno, et al. (1998). "Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38." J Biol Chem **273**(35): 22681-92.
- Zhang, S. Q., A. Kovalenko, et al. (2000). "Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation." Immunity **12**(3): 301-11.

- Zheng, L., G. Fisher, et al. (1995). "Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor." Nature **377**(6547): 348-51.
- Zheng, L., C. L. Trageser, et al. (1998). "T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death." J Immunol **160**(2): 763-9.
- Zhuangjie Li, Y. J., Richard J. Ulevitch, Jiahuai Han (1996). "The Primary Structure of p38 γ : A New Member of p38 Group of MAP Kinases." Biochemical and Biophysical Research Communications **228**(2).

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Kaps danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation in der Neurologischen Klinik des UKGM - Standort Gießen.

Herrn Prof. Dr. Berghoff danke ich für die Betreuung dieser Dissertation in der Arbeitsgruppe Multiple Sklerose.

Frau Dr. Tietz danke ich für die Einführung in die Laborarbeit und die professionelle sowie freundschaftliche Unterstützung im Rahmen dieser Dissertation und darüber hinaus.

Allen Kollegen und Mitarbeitern des Liquorlabors bzw. der Arbeitsgruppe Multiple Sklerose möchte ich für die gemeinsame Zeit im Labor danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir erst das Medizinstudium und somit auch die Durchführung dieser Dissertation ermöglicht haben.

TABELLARISCHER LEBENS LAUF