

Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung	i
Abstract	ii
I. Einleitung	1
1.1 Die Tumornekrosefaktor (TNF)- und TNF-Rezeptor-Superfamilien.....	1
1.1.1 Der Tumornekrosefaktor, ein proinflammatorisches Zytokin.....	1
1.1.2 Die TNF-Superfamilie (TNF-SF).....	2
1.1.3 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-SF).....	4
1.2 Signaltransduktion der TNF-Rezeptor-Superfamilie.....	7
1.2.1 Signaltransduktion der Todesrezeptoren.....	8
1.3 Signaltransduktion von TNF-R1.....	11
1.3.1 Zusammensetzung des TNF-Rezeptor-Signalkomplexes (TNF-RSC).....	12
1.3.2 Aktivierung von NF- κ B durch TNF.....	14
1.3.3 Aktivierung der c-Jun-(NH ₂)-terminalen Kinase durch TNF.....	18
1.3.4 Die TNF-R1-induzierte Apoptose.....	22
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	27
II. Materialien und Methoden	28
1 Materialien	28
1.1 Zellkultur.....	28
1.1.1 Verwendete Zelllinien.....	28
1.1.2 Medien.....	28
1.1.3 Antibiotika.....	29
1.1.4 Zellkultur-Materialien.....	29
1.2 Verwendete Antikörper.....	29
1.2.1 Unkonjugierte polyklonale Antikörper.....	29
1.2.2 Unkonjugierte monoklonale Antikörper (Immunoblot).....	30
1.2.3 Unkonjugierte monoklonale Antikörper (FACS-Färbung).....	31
1.2.4 Biotin-konjugierte Antikörper.....	31
1.2.5 Peroxidase-konjugierte Antikörper.....	32
1.2.6 Fluoreszenzmarkierte Moleküle.....	32
1.3 Rekombinante Proteine (Peptide).....	32
1.4 Chemikalien.....	33
1.4.1 Allgemeine Chemikalien.....	33
1.4.2 Spezifische Inhibitoren und Aktivatoren.....	35
1.5 Geräte.....	35
1.6 Kits.....	36
1.6.1 Allgemeine Kits.....	36
1.6.2 Molekulargewichtsmarker.....	37
1.7 Puffer und allgemeine Lösungen.....	38
1.8 Verbrauchsmaterialien.....	42
1.9 Oligonukleotide, cDNA-Klone und Plasmide.....	42
1.9.1 Oligonukleotide.....	42
1.9.2 Expressions-Plasmide.....	43

2. Methoden	44
2.1 Zellbiologische Methoden	44
2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen	44
2.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	44
2.1.3 Auftauen von Zellen	45
2.1.4 Einfrieren von Zellen	45
2.1.5 Kalzium-Phosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen	46
2.2 Molekularbiologische Methoden	46
2.2.1 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion	46
2.2.2 Restriktionsspaltung von DNA	47
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	47
2.2.4 Isolierung von DNA Fragmenten aus einem Agarosegel.....	48
2.2.5 Dephosphorylierung und Ligation von DNA.....	48
2.2.6 Transformation von Bakterien	48
2.2.7 De novo Synthese des AviTag	49
2.2.8 Klonierung der moTAP-Liganden	50
2.2.9 Punkt-Mutagenese von zirkulären Plasmiden	53
2.3 Biochemische Methoden.....	53
2.3.1 Herstellung von Lysaten aus eukaryontischen Zellen.....	53
2.3.2 Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA	54
2.3.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.3.4 Immunoblot (Western Blot) mit NuPAGE-Minigelen.....	55
2.3.5 Mehrmalige Verwendung von Western Blots	56
2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung	56
2.3.7 Immunpräzipitation der Rezeptorsignalkomplexe	57
2.4 Apoptosenachweise.....	60
2.4.1 Apoptosemessung aufgrund morphologischer Veränderungen.....	61
2.4.2 Ausschluss von PI und morphologische Veränderungen (FSC/SSC-PI)	62
2.4.3 Bestimmung von Zellkernen mit subdiploidem DNA-Gehalt.....	63
2.4.4 Vitalitäts-Test (MTT-Test)	64
2.5 Untersuchungen zum Nachweis der NF- κ B-Aktivität.....	64
2.5.1 Nachweis der DNA-Bindeaktivität von NF- κ B	64
2.5.2 RelA/p65 Supershift Assay.....	66
2.5.3 Genreporterassay zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivität.....	66
2.6 Herstellung rekombinanter Proteine	67
2.6.1 Expression und Reinigung von moTAP-TNF	67
2.6.2 Biotinylierung des moTAP-TNF	67
2.6.3 Expression und Reinigung von GST-HOIL-1 und GST-BirA	68
2.6.4 Gelfiltration zur Charakterisierung rekombinanter Proteine.....	68
2.7 Herstellung der HOIL-1 Antikörper	69
2.7.1 Immunisierung der BALB/c Mäuse	69
2.7.2 Fusion der Milzzellen mit Ag8-Tumorzellen.....	70
2.7.3 ELISA zur Detektion von HOIL-1 Antikörpern	71
2.8 Lentivirale Infektion eukaryotischer Zellen.....	71
2.8.1 Herstellung viraler Partikel	71
2.8.2 Lentivirale Infektion eukaryotischer Zellen.....	72
2.9 Quantitative PCR	72
2.9.1 RNA-Extraktion.....	72
2.9.2 cDNA-Herstellung	73
2.9.3 Quantitative ‚real-time‘ PCR	73

III. Ergebnisse	74
3.1 Herstellung und Charakterisierung von moTAP-TNF und -CD95L	74
3.1.1 Struktur der verwendeten Liganden	75
3.1.2 Expression und Reinigung von moTAP-TNF	78
3.1.3 Biochemische und funktionelle Charakterisierung von moTAP-TNF	78
3.1.4 Expression und funktionelle Charakterisierung des moTAP-CD95L	80
3.2 Optimierung der Rezeptorkomplex-Isolierung durch die moTAP-Liganden.....	82
3.2.1 Die maximale Bildung der TNF-R- bzw. CD95-Komplexe erfolgt nach 5-minütiger Stimulation	82
3.2.2 Die moTAP-Technik ermöglicht eine hohe Spezifität bei der Reinigung der TNFR- bzw. CD95-Komplexe	83
3.3 Bestätigung aller bekannten CD95-DISC-Komponenten durch massenspektrometrische Analyse	85
3.4 Biochemische Identifizierung von HOIL-1, HOIP und Sharpin als neue Komponenten des nativen TNF-Rezeptor-Signalkomplex.....	88
3.4.1 Massenspektrometrische Analyse des moTAP-gereinigten TNF-RSC	88
3.4.2 Stimulationsabhängige Rekrutierung von HOIL-1, HOIP und Sharpin zum TNF-RSC.....	90
3.5 HOIL-1 unterstützt die TNF-vermittelte Chemokin-Sekretion	91
3.5.1 Inhibition der Expression von HOIL-1, HOIP und Sharpin hat negativen Einfluss auf die TNF-induzierte IL-8 Sekretion	91
3.5.2 Stabile Inhibition der HOIL-1 Expression hat negativen Einfluss auf die TNF-induzierte Chemokin-Sekretion	93
3.6 HOIL-1 wird stimulationsabhängig an TNF-R1 rekrutiert und bindet direkt an K63-Ubiquitin	94
3.6.1 Stimulationsabhängige Rekrutierung von HOIL-1 an TNF-R1	95
3.6.2 HOIL-1 bindet über seine Ubl-Domäne direkt an K63-Ubiquitin	97
3.6.3 Die Ubl-Domäne ist essentiell für die HOIL-1 vermittelte IL-8-Sekretion	100
3.7 HOIL-1 inhibiert die Aktivierung von NF- κ B und vermittelt gleichzeitig die TNF-induzierte JNK-Aktivierung.....	102
3.7.1 HOIL-1 inhibiert die TNF-vermittelte Aktivierung von NF- κ B	102
3.7.2 HOIL-1 vermittelt die TNF-induzierte JNK-Aktivierung	105
3.8 HOIL-1 vermittelt TNF-induzierte Genexpression	106
3.9 Die Expression von HOIL-1 schützt Tumorzellen vor TNF-induzierter Apoptose ..	108
3.9.1 Inhibition der Expression von HOIL-1 sensitiviert Tumorzellen für TNF- induzierten Zelltod.....	109
3.9.2 HOIL-1-Expression schützt verschiedene Tumorzellen für TNF- induzierten Zelltod.....	111
3.9.3 Die endogene HOIL-1-Expression schützt vor TNF-induzierter Apoptose	112
IV. Diskussion	114
1. Die Anwendung der moTAP-Technologie zur Untersuchung verschiedener Rezeptorkomplexe der TNFR-SF	114
2. Identifizierung von HOIL-1 als funktionelle Komponente des nativen TNF-RSC	118
2.1 Biochemischer Mechanismus der Rekrutierung von HOIL-1 an den TNF-Rezeptor Signalkomplex ..	120
2.2 Einfluss von HOIL-1 auf JNK- und NF- κ B-Signalwege	121
2.3 Expression von HOIL-1 schützt vor TNF-induzierter Apoptose	124
V. Anhang	127
Abkürzungen	127
Literaturverzeichnis	130
Im Verlauf dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen	145
Erklärung.....	146