

**Untersuchung zur Regulation von Signaltransduktion und
Genexpression während der Entzündung auf der Ebene
der Proteinkinase TAK1**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. Nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Axel Thiefes
geboren am 9. Juli 1973 in Aachen

2003

Referent:	Prof. Dr. W. Müller Institut für Physiologische Chemie Medizinische Hochschule Hannover
Korreferent:	Prof. Dr. M. Kracht Institut für Pharmakologie Medizinische Hochschule Hannover
Tag der Promotion	8. Juli 2003

Erklärung

Die von mir vorgelegte Dissertation habe ich selbständig verfasst. Sämtliche von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen habe ich angegeben.

Die Dissertation wurde bisher weder als Diplomarbeit noch als eine andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 2003-06-05

(Axel Thiefes)

Ein Dankeschön

Zu Beginn möchte ich allen danken, die mich auf ganz unterschiedliche Art und Weise unterstützt und begleitet haben, und die so ganz entscheidend zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Klaus Resch, dem Leiter des Instituts für Pharmakologie, möchte ich mich dafür bedanken, dass ich die Arbeit an seinem Institut anfertigen konnte.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Michael Kracht für die ausgezeichnete Betreuung während dieser Zeit. Die ideenreichen, zum Teil auch kontroversen Diskussionen haben mir in allen Phasen des Projektes geholfen und mich weitergebracht.

Herrn Prof. Müller danke ich sehr für die Übernahme des Referates.

Dank gebührt auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, ohne deren Hilfe, Tipps und Tricks die Anfertigung der Arbeit enorm erschwert gewesen wäre. Ganz ausdrücklich möchte ich mich bei Anneke Dörrie bedanken für die wirklich hervorragende Zusammenarbeit, sowie bei Daniela Buhrow und David Holzberg für die kurzweilige Gestaltung des Büroalltages, und Holger Buß für die Frage nach dem Warum.

Ferner bedanke ich mich bei vielen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und allen Kooperationspartnern aus anderen Instituten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau, deren Unterstützung in ganz entscheidendem Maße zur Entstehung dieses Schriftstückes beigetragen hat.

I ZUSAMMENFASSUNG	4
II ABSTRACT	6
III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	9
1.1 BIOLOGISCHER HINTERGRUND	9
1.2 DIE FAMILIE DER TIR-REZEPTOREN	11
1.3 SIGNALTRANSDUKTION DURCH DIE REZEPTOREN DER TIR SUPERFAMILIE	11
1.4 DIE TNF REZEPTOR FAMILIE	13
1.5 OLIGOMERISIERUNG VON TRAF-MOLEKÜLEN ALS GEMEINSAME BASIS FÜR DIE SIGNALTRANSDUKTION VON TOLL/IL-1-REZEPTOREN UND TNF-REZEPTOREN	15
1.6 DIE PROTEINKINASE TAK1 ALS EIN EFFEKTORMOLEKÜL, WELCHES REZEPTOREN DER TIR- UND TNF- FAMILIE AN MAPK UND NF- κ B SIGNALWEGE KOPPELT	16
1.6.1 EINLEITUNG	16
1.6.2 AUFBAU UND ORGANISATION DES TAK1, TAB1 UND TAB2 KOMPLEXES	16
1.6.3 TAK1 UNTERLIEGT EINEM KOMPLEXEN AKTIVIERUNGSMECHANISMUS	17
1.6.4 IL-1 ABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON ENDOGENEM TAK1	17
1.6.5 FUNKTIONELL WICHTIGE MODIFIKATIONEN DES TAK1-TAB1-TAB2 KOMPLEXES	18
1.6.6 TAK1 ALS EIN UNIVERSELLER EFFEKTOR IMMUNMODULATORISCHER STIMULI	20
1.7 DIE ROLLE VON TAK1 ALS EFFEKTOR DER TGF-BETA-FAMILIE	22
1.8 DIE BIOLOGISCHE ROLLE VON TAK1 BEI DER GENEXPRESSION	22
1.9 TAK1 ALS MÖGLICHE ZIELSTRUKTUR PATHOGENER MIKROORGANISMEN	24
2 AUFGABENSTELLUNG	26
3 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 CHEMIKALIEN ALLGEMEIN	28
3.2 GERÄTE	28
3.3 LÖSUNGEN UND PUFFER	29
3.4 SONSTIGE MATERIALIEN, REAGENZIEN UND KITS	31
3.5 ARBEITEN MIT BAKTERIENKULTUREN	34
3.5.1 ALLGEMEIN	35
3.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	36
3.6.1 QUICK-CHECK METHODE	36
3.6.2 MINI-PREP VON PLASMIDEN	36
3.6.3 MAXI-PREP VON PLASMIDEN	36
3.6.4	36
RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA	36
3.6.5	37
POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	37
3.6.6 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN IN EINEN VEKTOR	38
3.6.7 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	39
3.6.8	39
AUFREINIGUNG VON DNA AUS EINEM AGAROSEGEL	39

3.6.9	40
KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	40
3.6.10 DNA-SEQUENZIERUNG	40
3.6.11 ISOLIERUNG VON TOTALER RNA AUS ZELLINIEN	41
3.6.12	41
NORTHERN-BLOT ANALYSE	41
3.6.13	43
REVERSE TRANSKRIPTION	43
3.7 ZELLKULTURMETHODEN	43
3.7.1 ALLGEMEIN	43
3.7.2	44
EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	44
3.7.3	45
ZELLZÄHLUNG UND VITALITÄTSBESTIMMUNG	45
3.7.4	45
TRANSFEKTION VON ZELLEN	45
3.7.5	45
HERSTELLUNG VON STABIL TRANSFIZIERTEN RETROVIRALEN VERPACKUNGSLINIEN	45
3.7.6 HERSTELLUNG VON STABIL INFIZIERTEN NIH3T3-ZELLEN	46
3.7.7 BESTIMMUNG DES VIRUS-TITERS DER VERPACKUNGSLINIEN	46
3.7.8 KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG	46
3.7.9 ZELLFÄRBUNG MIT DEM FARBSTOFF HOECHST 33342	46
3.7.10 ZYTOTOXIZITÄTS-VERSUCH MIT NEUTRALROTFÄRBUNG	47
3.7.11 REPORTERGENVERSUCHE	47
3.8 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	48
3.8.1 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	48
3.8.2 SDS-PAGE	48
3.8.3 COOMASSIE FÄRBUNG VON GELEN	49
3.8.4 WESTERN BLOT	50
3.8.5 IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN IM WESTERN BLOT	50
3.8.6 HERSTELLUNG VON LYSATEN	50
3.8.7 TCA-PRÄZIPITATION	54
3.8.8	54
IN VITRO KINASEVERSUCH MIT IMMUNPRÄZIPITIERTER, ENDOGENER JNK- ODER p38-MAPK	54
3.8.9	55
IN VITRO KINASEVERSUCH MIT IMMUNPRÄZIPITIERTER, ÜBEREXPRIMIERTER TAK1	55
3.8.10 IMMUNPRÄZIPITATION ENDOGENER TAK1	56
3.8.11 DENATURIERENDE PRÄZIPITATION HIS-EPITOP FUSIONIERTER PROTEINE	56
3.8.12	57
EMSA (<i>ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY</i>) FÜR DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF- κ B	57
3.8.13	58
HERSTELLUNG VON CYTOSOLISCHEN UND MITOCHONDRIALEN FRAKTIONEN ZUM CYTOCHROM C NACHWEIS	58
4 ERGEBNISSE	59
4.1 HERSTELLUNG VON RETROVIRALEN EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR GFP-TAK1^{WT} UND GFP-TAK1^{K63W}	59
4.2 HERSTELLUNG VON STABIL TRANSFIZIERTEN RETORVIRALEN VERPACKUNGSZELLINIEN	62

4.3 HEMMUNG DER IL-1α-INDUZIERTEN JNK-AKTIVIERUNG IN DEN RETROVIRALEN VERPACKUNGSLINIEN	63
4.4 HERSTELLUNG VON STABIL MIT REKOMBINANTEN RETROVIREN INFIZIERTEN NIH3T3-ZELLINIEN UND TITERBESTIMMUNG	65
4.5 NACHWEIS DER RETROVIRALEN EXPRESSION DER GFP-TAK1-FUSIONSPROTEINEIN STABIL INFIZIERTEN NIH-3T3-ZELLINIEN	66
4.6 HEMMUNG DER IL-1- UND TNF-STIMULIERTEN JNK UND P38 AKTIVITÄT DURCH ÜBEREXPRESSION VON GFP-TAK1_{K63W}	70
4.7 TAK1-ABHÄNGIGE REGULATION DES NF-κB-SIGNALWEGES	73
4.8 TAK1-UNAGHÄNGIGE AKTIVIERUNG DES PI3-KINASE-PKB/AKT-SIGNALWEGES	79
4.9 UNTERSUCHUNG VON TAK1-ABHÄNGIGER GENEXPRESSION	82
4.10 UNTERSUCHUNG DER TNFα-INDIZIERTEN APOPTOSE IN DER GFP-TAK1_{K63W}-LINIE	93
4.11 MODULATION DER TAK1-FUNKTION DURCH DEN VIRULENZFAKTOR YOPP AUS <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	102
5 DISKUSSION	122
6 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND AUSBLICK	142
7 LITERATURVERZEICHNIS	144

I Zusammenfassung

Eine der zentralen biologischen Reaktionen zur Infektionsabwehr im Rahmen der unspezifischen Immunität ist die Ausbildung einer Entzündung am Infektionsherd. Die wichtigsten Entzündungsstimuli sind mikrobielle Produkte wie z. B. LPS gram-negativer Bakterien und die beiden proinflammatorischen Cytokine IL-1 und TNF. Ihre biologische Wirkung erzielen diese Stimuli durch die gemeinsame Verwendung konservierter Signalwege, welche die Neusynthese von Genen bewirken, die für die Ausbildung einer Entzündung wichtig sind. Ihre Aktivierung erfolgt stimulusabhängig über initiale Phosphorylierung ihrer rezeptornah gelegenen Adapterproteinen durch Gruppen von spezifischen Kinasen. Von einigen solcher Kinasen aus der Gruppe der MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK) ist bekannt, dass sie den JNK-, den p38- und den NF- κ B-Signalweg aktivieren können. Zu dieser Gruppe von Kinasen gehört die MAPKKK TAK1.

TAK1 wird durch eine liganden-induzierte Abfolge von Protein-Protein-Interaktionen des IL-1 Rezeptor-Heterodimers mit cytosolischen Adaptermolekülen aktiviert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob und inwieweit IL-1- und TNF-induzierte Signalwege und Genexpression von der MAPKKK TAK1 abhängen. Dazu wurden durch retroviralen Gentransfer Zelllinien hergestellt, die stabil Fusionsproteine aus GFP und TAK1wt oder der katalytisch inaktiven, dominant negativ wirkenden Mutante TAK1_{K63W} überexprimieren. In diesen Linien konnte demonstriert werden, dass TAK1 sowohl wichtig für IL-1- als auch für TNF-induzierte Aktivierung von Stress-Signalwegen ist, dass es aber andere Signalwege gibt, die von den beiden Cytokinen TAK1-unabhängig aktiviert werden. Durch ausgedehnte *cDNA-Array*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Inhibition der Signalwege in einer starken Inhibition der Expression einer relativ kleinen Gruppe von inflammatorisch wichtigen Genen resultiert. Diese Befunde weisen TAK1 eine zentrale, aber auch selektive Rolle bei der Signaltransduktion der beiden wichtigsten proinflammatorischen Cytokine zu, da in dieser Arbeit das erste Mal gezeigt werden konnte, dass eine MAPKKK von einem proinflammatorischen Stimulus offenbar für die Induktion einer definierten Gruppe von Genen verwendet wird.

In einem zweiten Ansatz konnte Evidenz dafür erbracht werden, dass die Aktivierung von TAK1 deren direkte Ubiquitylierung erfordert, und dass die Inhibition genau dieser Modifikation ein Angriffspunkt für einen Virulenzfaktor pathogener *Yersinia*-Stämme ist. Da TAK1 also eine zentrale Rolle bei Signaltransduktion und Genregulation

proinflammatorischer Stimuli einnimmt, ist diese Kinase offensichtlich auch ein Ziel pathogener Mechanismen von Mikroorganismen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass TAK1 eine geeignete Zielstruktur für therapeutische Eingriffe darstellt.

Schlagwörter TGF β aktivierte Kinase (TAK1), Signaltransduktion, Entzündung

II Abstract

Inflammation is a crucial reaction of the innate immune-system in response to microbial infection. The principal stimuli of inflammation are microbial products, i.e. Lipopolysaccharide (LPS), or, the pro-inflammatory cytokines interleukin(IL)-1 and tumor necrosis factor (TNF). LPS, IL-1 and TNF signal through distinct receptor complexes but further downstream both cytokines activate gene expression through the same pathways involving two or three MAP kinases and NF- κ B. Latter pathways are connected to receptors by MAP kinase kinase kinases (MAPKKK), which represent a large family of distinct enzymes. At present, its unclear which MAPKKKs are utilized for IL-1-and TNF-mediated biological effects. In an attempt to identify signalling molecules in this group of enzymes that are critical for both, IL-1 and TNF-mediated gene expression we have generated retrovirally infected NIH3T3 cell lines stably expressing an inactive mutant of the MAPKKK TAK1, GFP-TAK1_{K63W}. Compared to control cells this mutant very efficiently suppressed IL-1- and TNF-stimulated activation of NF- κ B, JNK and p38 MAP kinase. As assessed by high density microarrays containing 10.000 cDNA probes, the dominant negative TAK1 mutant out of more than 300 TNF-regulated genes affected only a subset of about 50 genes. In particular the expression of the chemokines MCP-1 and MCP-3, the serine leukocyte protease inhibitor SLPI as well as of the acute phase protein serum amyloid A (SAA) 3 were strongly downregulated.

In a second part of the study, it was shown that TAK1 activation requires ubiquitination. This modification is a target for the protease YopP, a virulence factor of pathogenic yersinia strains.

In summary, we identify GFP-TAK1 as a potent intracellular effector molecule for inflammation that selectively and strongly affects a distinct group of IL-1- and TNF-induced genes. Presumably for that reason, modifications of TAK1 are also a target of pathogenic bacterial proteins, evolved to suppress the host reaction during infection.

Key words TGF β activated kinase (TAK1), signal transduction, inflammation

III Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampillicilin
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense
ATF-4	<i>activating transcription factor 4</i>
bidest	bidestilliert
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie; $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/Sekunde
CMV	Cytomegalo-Virus
Cpm	counts per minute (Zerfälle/Minute)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMEM	Dulbeco-modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
FADD	Fas <i>associated death domain protein</i>
FKS	fetal calf serum (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$) bzw. Gramm (Masse)
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinethan-sulfonsäure
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich)
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
JNK	Jun-N-terminale Kinase
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MOPS	3-(n-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NFκB	Kernfaktor κB
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NP-40	Nonidet [®] P-40
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
Rp,	rounds pwe minute; Umdrehungen pro Minute
s	sense
sec	Sekunde
SDS	Sodium Dodescyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Saline Sodium Citrat (Natriumzitat-Kochsalzlösung)
SSPE	Saline Sodium Phosphat EDTA (Natriumphosphat-EDTA-Kochsalzlösung)
SV40	<i>Siamin Virus 40</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
taq-Pol.	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF <i>receptor associated death domain protein</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unit (Einheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Biologischer Hintergrund

Der menschliche Körper ist permanent einer Umwelt mit potentiell pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Es ist die Aufgabe des Immunsystems, diese Pathogene aufzuspüren und zu eliminieren, um die Homöostase des Organismus zu gewährleisten. Eine wichtige Funktion in diesem Kontext hat die sogenannte angeborene Immunität, ein System aus evolutionär konservierten Erkennungs- und Reaktionsmechanismen, welches der Wirtsorganismus in einer frühen Phase der Infektion zur Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen einsetzt. Der wohl wichtigste dieser Mechanismen ist das Auslösen einer lokalen Entzündungsreaktion am Ort der Infektion. Sie dient dazu, die Infektion lokal zu bekämpfen, ihre Ausbreitung einzudämmen und beschädigtes Gewebe zu entfernen.

Bei der Erkennung von Mikroorganismen sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll like receptors; TLR), die sich auf den Oberflächen von Immunzellen befinden, von großer Bedeutung. Sie erkennen Mikroorganismen anhand von sogenannten *pathogen associated patterns* (PAMPs), d.h. anhand von konservierten Strukturen und Motiven, die für die jeweiligen Mikroorganismen charakteristisch und aufgrund einer essentiellen Funktion invariabel sind (Medzhitov, R., 2001). Über Toll-Rezeptoren erkennen periphere Zellen des Immunsystems eindringende Mikroorganismen und eliminieren diese z. B. durch Phagozytose. Diese Erkennung führt auch zu einer Aktivierung von Zellen des unspezifischen Immunsystems wie z. B. Makrophagen oder Monocyten. Diese aktivierten Zellen des unspezifischen Immunsystems stellen bei einer Infektion die Hauptquelle proinflammatorischer Cytokinen dar, deren wichtigste Vertreter IL-1 α und TNF α sind.

Die Freisetzung von IL-1 α und TNF α kann aber auch unabhängig von TLR-Aktivierung erfolgen, z. B. durch eine physikalische Verletzung von Gewebe. Dabei stellen neben den aktivierten Zellen des unspezifischen Immunsystems auch andere Zellen des betroffenen Gewebes potentielle Quellen dieser beiden Cytokine dar. Ihre wichtigste Funktion besteht in ihrer hormonartigen Wirkungsweise. Das bedeutet, dass sie in ihren Zielzellen die Expression einer grossen Anzahl von Genen neu regulieren, die für die Ausbildung einer Entzündung wichtig sind. Die für eine Entzündung kennzeichnenden biologischen Effekte sind:

Verstärkung des lokalen Blutflusses

Rekrutierung von Leukozyten zum Infektionsherd
Bekämpfung der Infektion durch Phagozytose, Stimulation von spezifischen
Immunzellen (T- und B-Zellen) und Synthese von
antimikrobiellen Sekundärmetaboliten
Reparatur und Neuaufbau des beschädigten Gewebes.

IL-1, TNF und TLR-aktivierende Stimuli erzielen ihre biologische Wirkung über die Bindung an spezifische membranständige Rezeptoren gefolgt von der Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, die auch verallgemeinernd als Stress-Signalwege bezeichnet werden. Die wichtigsten dieser Signalwege sind die drei MAP-Kinase (MAPK) Signalwege – der JNK-, der p38-, und der ERK-Signalweg, sowie der NF- κ B Signalweg. Die MAPK-Signalwege bestehen aus Modulen von dreigliedrigen, hierarchisch aufgebauten Proteinkinase-Kaskaden – einer MAPK, einer MAPK-Kinase (MAPKK) und einer MAPKK-Kinase (MAPKKK). Die Module werden jeweils nach der MAPK benannt. Aktivierte MAPK translozieren in den Zellkern, wo diese Kinasen an Transkriptionsfaktoren, vor allem aus der *activating protein* (AP)-1 Familie binden und diese durch Phosphorylierung aktivieren. Der NF- κ B Signalweg ist ein besonderer Signalweg, insofern, als dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B zunächst im Cytosol lokalisiert ist und durch eine phosphorylierungsabhängige Proteinkinasekaskade „freigegeben“ wird und in den Zellkern transloziert.

Im Kontext einer Entzündung erzielen die proinflammatorische Stimuli über diese Signalwege durch zunächst transkriptionelle und zusätzlich auch posttranskriptionelle Mechanismen eine Heraufregulation der Expression von Genen, die für die Bekämpfung einer Infektion und die Reparatur des durch die Entzündung verletzten Gewebes wichtig sind (Zusammenfassung in Kracht, M. and Saklatvala, J., 2002)

Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, wie so unterschiedliche Rezeptoren in der Lage sein können, die gleichen intrazellulären Signalmechanismen zu aktivieren. Erklärt wird dieses durch das Vorhandensein von Adaptor Proteinen, die einerseits mit dem cytosolischen Anteil eines spezifischen Rezeptors, andererseits mit einem aktivierenden Enzym einer MAP Kinase Kaskade, z.B. einer MAPKKK, interagieren können. Zu diesen Molekülen gehören z.B. die TRAF (*TNF receptor associated factor*) Proteine.

1.2 Die Familie der TIR-Rezeptoren

Die Toll Rezeptoren bilden zusammen aufgrund struktureller und funktioneller Eigenschaften eine Familie. Alle besitzen extrazellulär eine LLR (*leucine rich repeats*)-Domäne. Zur Zeit sind in Säuern zehn verschiedene TLR bekannt, von denen jeder ein individuelles, aber auch mit anderen TLR überlappendes Spektrum an pathogenen Stimuli besitzt (Übersicht: Medzhitov, R, 2001, Takeda, K et Akira, S, 2003). So ist z. B. TLR4 als der Rezeptor identifiziert worden, der essentiell für die Signalweiterleitung bei Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) ist (Poltorak, A. et al., 1998), TLR3 ist bei der Erkennung von dsRNA involviert (Alexopoulou, L. et al., 2001) und für die Erkennung von verschiedenen Lipoproteinen sind die Rezeptoren TLR1(Takeuchi, O. et al. 2001), TLR2(Takeuchi, O. et al.; 1999) und TLR6(Takeuchi, et al., 2002) wichtig.

Alle Toll Rezeptoren besitzen in ihrem cytosolischen Anteil eine evolutionär konservierte, ca. 200 Aminosäuren große Domäne, die bei der Bindung der Liganden an den Rezeptor durch Protein-Protein Interaktionen mit cytosolischen Adaptermolekülen Signaltransduktions-Kaskaden auslösen, die später eingehender dargestellt werden.

Diese TIR Domäne haben die die Toll Rezeptoren gemeinsam mit den Proteinen der IL-1 Rezeptor-Familie, zu der die IL-1 Rezeptoren und die IL-18 Rezeptoren samt ihren Corezeptoren zählen. Die Toll Rezeptoren und die Rezeptoren der IL-1 Familie werden daher auch in der Superfamilie der TIR-Domänen Rezeptoren zusammengefasst (Übersicht O'Neill, L., 2000).

Über die TIR-Domäne als gemeinsames strukturelles und funktionelles Motiv rekrutieren die Rezeptoren der TIR-Familie eine Gruppe von gemeinsamen Signalmediatoren, wie z. B. die Kinasen IRAK1-4 oder TAK1, mit deren Hilfe sie den p38- und den JNK-MAPK-Signalweg sowie den NF- κ B-Signalweg aktivieren.

1.3 Signaltransduktion durch die Rezeptoren der TIR Superfamilie

Alle Rezeptoren der TIR Familie sind definiert über die namensgebende TIR Domäne. Der seit längstem bekannte und daher am besten charakterisierte Vertreter dieser Familie ist der IL-1 Rezeptor, über den das proinflammatorische Cytokin IL-1 seine biologische Wirkung erzielt (Sims, J.E. et al., 1988). Die augenblicklichen Erkenntnisse zu Mechanismen der Signaltransduktion von Rezeptoren der Toll Familie gründen letztlich auf dem bereits bestehenden molekularen Wissen über den IL-1 Rezeptorkomplex.

Bei Stimulation des Rezeptors durch die jeweiligen Liganden kommt es zur Ausbildung eines Komplexes des Liganden mit dem IL-1 Rezeptor und dem IL-1 Rezeptor akzessorischen Protein (IL-1RAcP). Die Interaktion dieser drei Komponenten ist Voraussetzung

zung zur Signaltransduktion (Auron, P., 1998). Auf der cytosolischen Seite des Rezeptorkomplexes führt die Ausbildung des Komplexes zur räumlichen Nähe der TIR-Domänen, was das auslösende Ereignis für eine Abfolge von nicht enzymatischen Ereignissen am Komplex ist, durch die der Rezeptor an die nachfolgenden Signalkaskaden gekoppelt wird. Funktionelle TIR-Domänen sind hierfür essentiell (Radons, J. et al.; 2002).

Zur Gruppe der TIR-Proteine wird eine Reihe von weiteren Molekülen gezählt, die sich ebenfalls durch eine TIR Domäne auszeichnen, aber keine liganden-bindenden Plasmamembranrezeptoren sind, sondern sich im Cytosol befinden (O'Neill, L., 2000). Zu dieser Gruppe gehören zwei virale Proteine mit immunmodulatorischer Funktion und das zelluläre Adapterprotein MyD88, das eine N-terminale Todesdomäne und eine C-terminale TIR Domäne besitzt, über die es durch homotypische Interaktion mit dem IL-1 Rezeptorkomplex interagiert und dabei wahrscheinlich als Dimer vorliegt (Wesche, H. et al., 1997 und Burns, K. et al. 1998). Die Kristallstrukturen der TIR-Domänen von TLR1 und TLR2 wurden kürzlich aufgelöst. Sie zeigen eine mögliche Interaktionsfläche der Rezeptor-TIR-Domänen für die Interaktion mit MyD88 (Xu, Y. et al., 2000).

MyD88 ist essentiell für die Signaltransduktion durch von IL-1 α und IL-18, was die Analyse von Mäusen zeigt, die kein funktionelles MyD88 haben. Die Antwort auf LPS-Stimulation ist in diesen Mäusen verzögert aber nicht komplett gehemmt, was auf MyD88 unabhängigen Weg bei diesem Stimulus schließen läßt (Adachi, O. et al. 1998, und Kawai, T. et al., 1999). In der Tat wurden kürzlich neue MyD88 homologe Proteine gefunden. Eines wurde TIRAP(*toll interacting protein*)/Mal /(*MyD88 adapter like*) genannt, und ist in die LPS induzierte Signaltransduktion durch TLR4 involviert (Hornig, T. et al., 2001). Das andere wurde TICAM-1(*TIR containig adapter molecule*) genannt und spielt eine Rolle bei der dsRNA induzierten Signaltransduktion durch TLR3 (Oshiumi, H. et al., 2003).

Die Todesdomäne von MyD88 ermöglicht die Kopplung des Rezeptor-Komplexes an Serin/Threonin Kinasen der IRAK-Familie. Mittlerweile sind vier Mitglieder der humanen IRAK Familie bekannt: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M und IRAK-4, die untereinander stark homolog sind und sich alle durch eine N-terminale Todesdomäne und eine zentrale Kinasedomäne auszeichnen (Janssens, S. and Bayert, R., 2003). IRAK-1 liegt im Cytosol präassoziiert an das Adaptermolekül Tollip (*toll interacting protein*) vor, welches IRAK-1 nach Rezeptorstimulation durch Interaktion mit dem IL-1RAcP an den IL-1 Rezeptorkomplex bringt und dort eine homotypische Interaktion der Todesdomä-

nen von MyD88 und IRAK-1 ermöglicht (Burns, K. et al., 2000). Die Rekrutierung an den Rezeptor führt zur autokatalytischen Hyperphosphorylierung von IRAK-1 und nachfolgend zur Dissoziation von Tollip und IRAK vom IL-1 Rezeptorkomplex (Cao, Z. et al. 1996, Burns, K. et al., 2000). IRAK-1 interagiert sodann wahrscheinlich als Dimer oder Oligomer mit dem Adaptermolekül TRAF6 (*TNF α receptor associated factor 6*) über seine C-terminale Domäne (Cao, Z. et al. 1996), die bei den anderen IRAK Formen stark verkürzt (IRAK-2, IRAK-M) oder nicht vorhanden (IRAK-4) sind. Anhand von genetischen „Screens“ konnte in humanen Zellen gezeigt werden, dass IRAK-1-defiziente Zellen nicht mehr IL-1-responsiv sind und dass das Molekül damit essentiell für die IL-1 Signaltransduktion ist (Stark, MCB).

Soweit bekannt ist für keine der vier IRAK-Formen bisher ein anderes Substrat beschrieben worden ausser der Kinase selbst selbst. Die enzymatische Aktivität dieser Proteine dient also allein der Autophosphorylierung. Hierbei gibt es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen IRAKs. Während für die IL-1 Signaltransduktion die Kinaseaktivität von IRAK-1 entbehrlich ist, wird sie bei IRAK-4 für die Signalweiterleitung unbedingt benötigt (Suzuki, N. et al., 2002).

Es wurde bisher keine weitere Rezeptorfamilie identifiziert, die ein vergleichbares Signalmodul aus cytosolischen TIR-Adaptoren und Proteinen der IRAK-Familie für die Koppelung an die weiter abwärts gelegenen Signalwege benutzt.

Das nächste Molekül, welches nach IRAK IL-1 abhängig aktiviert wird, ist TRAF6. Proteine der TRAF-Familie sind nicht-enzymatische Adapterproteine bei der Signalweiterleitung von Rezeptoren, die in die Regulation von Zelltod, Proliferation oder Antwort auf Stress-Signale involviert sind.

TRAF6 hat in der TRAF-Familie eine einmalige Rezeptor Spezifität, die dazu führt, dass TRAF6 exklusiv die Signale von Mitgliedern der TIR und der unten beschriebenen TNF-Rezeptor Familie transduziert, da TRAF6-Defizienz zu Defekten in der Signaltransduktion von Rezeptoren der TIR-Familie (IL-1, TLR4) und einzelnen Mitgliedern der TNF-R-Familie. führt. Hierbei ist TRAF6 bei der Signaltransduktion zum JNK- und zum NF- κ B Signalweg beteiligt (Muzio, M. et al., 1998 und Cao, Z. et al., 1996)

1.4 Die TNF Rezeptor Familie

Neben IL-1 α ist TNF α das am besten charakterisierte proinflammatorische Cytokin. TNF α erzielt in den meisten Zellen seine biologische Wirkung über den TNF-Rezeptor

Typ 1 (auch TNF-RI oder p55 TNF-R genannt), der über Adaptermoleküle (s.u.) letztlich TRAF2 und/ oder TRAF5 binden kann.

Der TNF-Rezeptor TypI ist der prototypische Vertreter der TNF-Rezeptor Familie, zu der auch die Rezeptoren Fas (CD95) oder RANK gehören. Die Rezeptoren besitzen konservierte, cysteinreiche, extrazelluläre Domänen und werden unterteilt in Rezeptoren, die in ihrem cytoplasmatischen Anteil eine Todesdomäne (*death domain*, DD) haben oder nicht. Diese Todesdomäne ermöglicht homotypische Interaktionen mit cytoplasmatisch lokalisierten Proteinen, die ebenfalls eine Todesdomäne besitzen. (Übersicht Locksley RM. et al., 2001). Für die TNF-Rezeptoren und Fas sind bislang mehrere Adapter dieser Art bekannt. Dazu gehören TRADD (*TNF receptor associated death domain protein*) (Hsu, H. et al., 1995), FADD (*Fas associated death domain protein*) (Chinnaiyan AM. et al., 1995), RIP (*receptor interacting protein 1*) (Stanger, BZ. et al., 1995) und RAID (Duan, H. and Dixit, VM., 1997), die untereinander und direkt oder indirekt an die Rezeptoren binden. Im Falle des TNF-RI spielt TRADD eine wichtige Rolle, indem es direkt an die Todesdomäne des Rezeptors bindet und eine Plattform für die Bindung verschiedenen Adaptermolekülen bereitstellt. In der Folge kann es zum einen zur FADD-vermittelten Aktivierung von Caspase 8 und damit zur einer Apoptose auslösenden Signalkaskade kommen, zum anderen ermöglicht TRADD die Bindung der Adaptermoleküle RIP und TRAF2, die für die Aktivierung des JNK und des NF- κ B Signalweges wichtig sind (Hsu H. et al., 1996 und 1996 A.).

Von TRAF2 wurde gezeigt, dass es an direkt an TRADD bindet und dadurch indirekt an den TNFR-1 rekrutiert wird (Hsu H. et al., 1996). Überexprimiertes TRAF-2 oligomerisiert spontan und führt so zu einer Aktivierung des JNK-, des p38-MAPK Signalweges (Liu, ZG. et al., 1996, Natoli, G. et al., 1997 und Reinhardt, C., 1997) und des NF- κ B Signalweges (Rothe, M. et al., 1995). Diese Experimente suggerierten zunächst, dass TRAF-2 ein „Koordinator“ von vier TNF-abhängigen Signalwegen ist. Allerdings zeigen TRAF2 *knock out* Mäuse keine Beeinträchtigung der TNF α -induzierten NF- κ B Aktivierung (Yeh, WC et al., 1997), TRAF2/TRAF5 *knock out* Mäuse hingegen eine deutliche Inhibition (Tada, K. et al., 2001). Dies lässt eine redundante Rolle von TRAF2 und TRAF5 bei der TNF-induzierten NF- κ B Aktivierung vermuten, wobei einschränkend hinzukommt, dass bis jetzt keine direkte Bindung von TRAF5 an den TNF-RI gezeigt werden konnte. Weitere Daten aus den TRAF2-defizienten Zellen zeigten, dass endogenes TRAF-2 eine essentielle Rolle bei der TNF-vermittelten JNK Aktivierung spielt. TRAF-2 ist also schon ein Bifurkationspunkt der TNF-Signaltransduktion.

Dagegen zeigen Daten aus Zellen, die defizient für die Proteinkinase RIP sind – ein ebenfalls eine Todesdomäne enthaltendes Protein –, dass RIP eine essentielle Rolle bei der TNF α induzierten NF- κ B-Aktivierung spielt. Die exakte Zusammenspiel von TRAF2/TRAF5 und RIP bei der Aktivierung von NF- κ B ist noch unklar, jedoch gibt es Ergebnisse, die zeigen, dass RIP und TRAF2 bei der Rekrutierung unterschiedlicher Untereinheiten des IKK (*inhibitor of NF- κ B-kinase*)-Komplexes kooperieren. Dieser Komplex reguliert die cytosolischen Aktivierung von NF- κ B (Devin, A. et al, 2000 und Devin A. et al., 2001).

1.5 Oligomerisierung von TRAF-Molekülen als gemeinsame Basis für die Signaltransduktion von Toll/IL-1-Rezeptoren und TNF-Rezeptoren

Die gemeinsame Basis für uniforme Signal-Transduktion durch Stimuli, die ihre biologischen Effekte über Familienmitglieder der TIR- oder der Todesrezeptoren erzielen, ist die Induktion der Oligomerisierung von Proteinen der TRAF-Familie. Die Oligomerisierung wird dabei im Falle der TNF-Rezeptoren durch ligandeninduzierte Trimerisierung der Rezeptoren ausgelöst, was im Falle der TNF-RI durch kristallographische Untersuchungen bestätigt werden konnte (Banner, DW et al., 1993). Dies ist wohl auch die strukturelle Basis für die Signaltransduktion, denn es wurde durch Kristallstruktur-Analysen gezeigt, dass die TRAF-Domänen von TRAF2 als Trimer vorliegen (Park, YC. et al. 1999).

Im Falle der TIR-Familie kommt es zur liganden-induzierten Dimerisierung. Biochemische Analysen zeigten, dass optimale Signaltransduktion durch den TIR-spezifischen Adapter TRAF6 eher durch höhere Multimerisierung erreicht wird (Pullen, SS. et al., 1999). Da bis auf wenige Ausnahmen TRAF6 von Mitgliedern der TIR-Familie nicht direkt an den Rezeptor, sondern erst im Cytosol über Adaptermoleküle rekrutiert wird, ist zu vermuten, dass nicht die Dimerisierung dieser Rezeptoren direkt, sondern erst eine im Cytosol durch die Adaptermoleküle ermöglichte Multimerisierung von TRAF6 die weitere Signaltransduktion auslöst.

Das Modell der TRAF-Oligomerisierung als signal-auslösendes Moment wurde eindrucksvoll durch *in vivo* Experimente unterstützt, die zeigten dass in Zellen die eine künstlich induzierte Multimerisierung von TRAF2 bzw. TRAF6 ausreichend ist um Signaltransduktion und Genantworten auszulösen (Baud, V. et al., 1999)

Zusammenfassend besteht also der gemeinsame Aktivierungsmechanismus für Rezeptoren, die TRAF-Moleküle als Adaptoren verwenden, darin, dass durch die ligandenabhängige Nähe miteinander interagierender Proteine letztlich die Ausbildung von

TRAF-Oligomeren induziert wird, die als Plattform für die weitere Signaltransduktion in das „Zellinnere“ dient. Hierbei wird eine grosse Anzahl verschiedener zusätzlicher Effektormoleküle rekrutiert und aktiviert.

1.6 Die Proteinkinase TAK1 als ein Effektormolekül, welches Rezeptoren der TIR- und TNF- Familie an MAPK und NF- κ B Signalwege koppelt

1.6.1 Einleitung

Die Proteinkinase TAK1 (*TGF β activated kinase*) wurde durch einen genetischen Ansatz in Hefe gefunden, bei dem nach Säuger-cDNA-Bank codierten aktiven MAPKKK gesucht wurde, welche eine Defektmutante der Hefe MAPKKK Ste11 „retten“ konnten. Später konnte gezeigt werden, dass diese ursprüngliche TAK1 cDNA eine kurze N-terminale Deletion enthielt, die sie zu einer partiell aktiven Mutante machte. In Säugerzellen ektopisch exprimiert, aktivierte diese Form von TAK1 TGF β responsive Reportergene und wurde durch Stimulation mit TGF β aktiviert. Eine katalytisch inaktive Mutante von TAK1 wirkte dominant negativ auf TGF β aktivierte Signalwege. Die Namensgebung erfolgte konsequenterweise anhand dieser ersten funktionellen Zuordnung (Yamaguchi, K. et al., 1995). Mit einem Hefe *two hybrid screen* wurden Adapterproteine für TAK1 gefunden und TAB(TAK1 binding protein)1 bzw, TAB2 genannt. Von TAB1 wurde gezeigt, dass es ein Aktivator für die TAK1-Kinaseaktivität ist (Shibuya, H. et al., 1996). TAB1 und TAB2 interagieren mit TAK1 auch in Säugerzellen. Später wurde die Funktion von TAK1 in der IL-1 Signaltransduktion entdeckt (Ninomiya-Tsuji, J et al., 1999).

1.6.2 Aufbau und Organisation des TAK1, TAB1 und TAB2 Komplexes

TAK1 besitzt die konservierte katalytische Domäne von Proteinkinasen, die in zwölf Unterdomänen unterteilt ist, welche als Domänen I-XII bezeichnet werden. In der Domäne II an Position 63 befindet sich ein Lysinrest, der bei den meisten Proteinkinasen konserviert ist und eine wichtige Funktion in der ATP-Bindungstasche der Kinasen hat. Wie bei den meisten Proteinkinasen führt eine Mutation dieser Lysinrestes zur einer katalytisch inaktiven TAK1-Form (Shibuya, H. et al., 1996).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TAB1 mit seinem C-Terminus (AA 436-504) an einen N-terminalen Bereich von TAK1 bindet, der sich innerhalb der ersten 303 Aminosäuren befindet (Sakurai, H. et al., 2000).

TAB2 bindet dagegen an den C-Terminus von TAK1(AA 403-579) mit seiner eigenen C-terminalen Hälfte (AA 401-693) (Takaesu, G. et al., 2000). Mittlerweile wurde ein künstliches Fusionsprotein hergestellt, das aus Fusionsanteilen der katalytischen Domäne von TAK1 (AA 1-303) und dem TAK1 aktivierenden Bereich (AA 437-504) von TAB1 besteht, und konstitutiv aktiv ist .

1.6.3 TAK1 unterliegt einem komplexen Aktivierungsmechanismus

Ektopisch exprimiertes und durch Cotransfektion von TAB1 aktiviertes TAK1 aktiviert den NF- κ B Signalweg. Hierbei stimuliert TAK1 über die Aktivierung des IKK-Komplexes NF- κ B-abhängige Reportergene. Ob dieser Aktivierungsmechanismus über die Kinase NIK (NF- κ B *inducing kinase*) läuft, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Sakurai, H., 1998, Sakurai, H., 1999). Weitere Transfektionsexperimente und biochemische Studien zeigten, dass TAK1 die MAP-Kinasen-Kinasen MKK3, MKK6 und MKK4 phosphorylieren kann, welche die MAP-Kinasen p38 und JNK aktivieren (Moriguchi, T. et al., 1996, Shirakabe, K. et al., 1997, Wang, W. et al. 1997). Diese Experimente identifizierten TAK1 letztlich funktionell als eine Säuger MAPKKK.

1.6.4 IL-1 abhängige Aktivierung von endogenem TAK1

Endogenes TAK1 und TAB1 liegen in der Zelle konstitutiv als Komplex vor, der allerdings katalytisch inaktiv ist, eine Beobachtung, die auch durch Experimente unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte. Der stimulusabhängige Aktivierungsmechanismus von TAK1 wurde in den letzten Jahren intensiv und auch exklusiv am Beispiel der IL-1-induzierten TAK1-Aktivierung untersucht. Informationen zum genauen Aktivierungsmechanismus durch andere extrazelluläre Liganden und ihre Rezeptoren liegen allerdings nicht vor.

Nach biochemischen Untersuchungen von Li und Matsumoto liegt das Adaptermolekül TAB2 in membranösen Strukturen der Zelle – wahrscheinlich der Plasmamembran – lokalisiert vor und transloziert erst nach IL-1 Stimulation in das Cytosol. Diese Umverteilung von TAB2 ermöglicht dann die Interaktion des TAB1/TAK1-Komplexes mit TRAF6 und IRAK und so seine Aktivierung ermöglicht. Die genaue molekulare Abfolge der Ereignisse, die zur Kopplung des TAB1/TAK1-Komplexes an die IRAK/TRAF6-Komplexe führt, ist zur Zeit noch strittig (Takaesu, G. et al., 2000, Takaesu, G. et al., 2001, Quin, Y. et al., 2001, Jiang, Z. et al., 2002).

Dieses Modell fordert eine essentielle initiale Rolle von TAB2 bei der Bildung eines TAK1-aktivierenden Multiproteinkomplexes und deckt sich mit Ergebnissen unserer

Arbeitsgruppe, die zeigen, dass die Überexpression von TAB2 alleine in der Lage ist, Stress-Signalwege anzuschalten und IL-1-induzierbare Promotoren zu aktivieren, während TAK1 oder TAB1 allein überxprimiert dieses nicht bewirken.

Im Gegensatz dazu zeigt die erste Arbeit an embryonalen Fibroblasten aus TAB2 defizienten Mäusen, dass TAB2 nicht essentiell für die IL-1-induzierte Aktivierung von NF- κ B und MAPK-Signalwegen zeigen (Sanjo, H., et al., 2003). RNAi vermittelte Suppression von TAK1 hebt dagegen die IL-1- und auch TNF-vermittelte NF- κ B Aktivierung auf und zeigt, dass TAK1 für diesen Signalmechanismus essentiell ist (Takaesu, G. et al., 2003).

Wie schon beschrieben bilden endogenes TAB1 und TAK1 einen konstitutiven, relativ hochaffinen Proteinkomplex, der sich durch Co-Immunpräzipitation leicht aus Zellen isolieren lässt. Eine wichtige Frage zum Verständnis der Regulation der TAK1 Aktivität ist, weshalb in diesem Komplex TAK1 inaktiv ist, während es bei gleichzeitiger Überexpression von TAK1 und TAB1 eine starke enzymatische Aktivität aufweist, die sich auch leicht *in vitro* nach Immunpräzipitation nachweisen lässt (siehe. 35)

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass überexprimierte TAB1/TAK1-Komplexe im Gegensatz zu endogenem TAB1/TAK1 mit TRAF6 interagieren können (Ninomiya-Tsuji, J et al., 1999). IL-1-abhängig aktiviertes TRAF6 verdrängt dabei einen „putativen“ Inhibitor des endogenen TAB1-TAK1 Komplexes, z.B. ASK1 (Mochida, Y. et al., 2000), und ermöglicht so die Rekrutierung und Aktivierung von TAK1 und TAB1 im IL-1 Rezeptorkomplex.

1.6.5 Funktionell wichtige Modifikationen des TAK1-TAB1-TAB2 Komplexes

Phosphorylierungsabhängige Aktivierung von TAB1 und TAK1

Die Komplexität der Regulation der Aktivität von TAK1 wird nicht nur durch Untersuchungen zur IL-1-abhängigen Interaktion mit TAB1 und TAB2 verdeutlicht, sondern auch auf der Ebene verschiedener Modifikationen in diesem Proteinkomplex.

Die IL-1 abhängige Aktivierung von endogenem TAK1 führt zur Phosphorylierung der Kinase. Coexpression von TAB1 und TAK1 führt zu konstitutiven Phosphorylierungen von TAK1 und TAB1, die von der katalytischen Aktivität von TAK1 abhängen.

TAK1 wird hierbei entweder durch Autophosphorylierung oder durch eine noch unbekannte Proteinkinase an Serin 192 und Threonin 187 im konservierten Aktivierungs-*Loop* phosphoryliert (Kishimoto, K. et al., 2000, Sakurai, H., et al., 2000).

Überexprimiertes TAK1 phosphoryliert TAB1 an den Aminosäuren, dieser Bereich ist in der TAK1-Bindungsstelle von TAB1 enthalten. Interessant ist hierbei, dass zur Assoziation mit TAK1 die äussersten 24 C-terminalen Aminosäuren von TAB1 bereits ausreichen, zur vollen Aktivierung von TAK1 durch Koexpression von TAB1 muss jedoch der die Phosphorylierungsstellen enthaltene Bereich Aminosäuren 436-504 zusätzlich vorhanden sein. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die direkte Interaktion der beiden Proteine TAK1 und TAB1 phosphorylierungsabhängig reguliert sein könnte (Sakurai, H. et al., 2000).

Kürzlich wurde berichtet, dass eine Zerstörung des *tab1*-Genes in Mäusen embryonal lethal ist, was ein starkes Indiz für eine essentielle Funktion von TAB1 bei der Aktivierung von TAK1 im Kontext der TGF β induzierten Signaltransduktion ist. Eine Untersuchung in embryonalen Fibroblasten dieser Tiere könnte eine essentielle Rolle von TAB1 bei der IL-1 induzierten TAK1 Aktivierung weiter erhärten (Komatsu, Y. et al., 2002).

In Übereinstimmung mit einer wichtigen Rolle von Phosphorylierungen bei der TAK1 Regulation wurde gezeigt, dass die Aktivität von TAK1 zusätzlich durch die Protein-Phosphatasen 2C-beta (PP2Cb) und PP2Cepsilon reguliert wird. Beide Phosphatasen können phosphorylierte TAK1 *in vitro* dephosphorylieren, inhibieren bei Überexpression IL-1 induzierte Reportergenaktivität und zeigen *in vivo* konstitutive Bindung an TAK1, die durch IL-1 Stimulation inhibiert wird (Li, MG., et al., 2003, Hanada, M et al., 2002).

Aktivierung von TAK1 durch Ubiquitin konjugierende Komplexe

Vor kurzem konnte mit einem biochemischen Ansatz gezeigt werden, dass TRAF6 über seine Ringfinger-Domäne den Aufbau von atypisch verknüpften K63-Polyubiquitinketten ermöglicht, welche zur Aktivierung der Kinaseaktivität des IKK-Komplexes über TAK1-TAB1-TAB2 notwendig sind.

In diesen Experimenten wurde ein endogener aus humanen Epithelzellen aufgereinigter dimerer Ubiquitin-kojugierender Komplex identifiziert, der TRIKA1 genannt wurde. Er enthielt die Enzyme Ubc13 und Uev1A, welche für den Aufbau dieser Kette verantwortlich und notwendig für die Aktivierung des IKK-Komplexes sind. Gleiches wurde für die TRAF2 vermittelte IKK-Aktivierung gezeigt (Deng, I. et al., 2000).

Anschließende Experimente zeigten, dass ein weiterer derart identifizierter Komplex, der TRIKA2 genannt wurde, die Proteine TAB1, TAK1 und /TAB2 enthielt. TRIKA2 phosphoryliert *in vitro* den IKK-Komplex in Abhängigkeit von TRIKA1 und der Ausbildung von K63-Ubiquitinketten an TRAF6. Das auslösende Ereignis der TRIKA2

Aktivierung ist hierbei eine Poly-Ubiquitylierung von TRAF6, die zu einer Konformationsänderung von TRAF6 und damit zu einer spontanen Oligomerisierung führt, welche dann wie oben dargestellt den IKK Komplex und NF- κ B aktivieren kann. Eine direkte Ubiquitylierung von TAB1, TAK oder TAB2 konnte aber nicht gezeigt werden (Wang, C. et al., 2001).

1.6.6 TAK1 als ein universeller Effektor immunmodulatorischer Stimuli

Zu Beginn der Untersuchungen war eine wichtige Rolle von TAK1 bei durch IL-1 und Mitglieder der TGF β induzierten Aktivierung der MAP-Kinase Signalwege und des NF- κ B Signalweges gut untersucht. Außerdem gab es eine Veröffentlichung, die zeigte, dass endogenes TAK1 auch durch TNF α aktiviert wird, und dass eine katalytisch inaktive Mutante von TAK1 die TNF α induzierte Aktivierung eines NF- κ B Reporters inhibierte (Sakurai, H. et al., 1999).

Mittlerweile ist klar, dass TAK1 auch bei der Signalweiterleitung anderer Stimuli, die Rezeptoren der TIR-Familie verwenden, eine ähnlich wichtige Rolle spielt wie bei IL-1. So konnte gezeigt werden, dass TAK1 bei der Signaltransduktion von LPS (Irie et al., 2000), IL-18 (Wald, D. et al., 2001) und RANKL (Mizukami, J. et al., 2002) wichtig ist, sowie bei der durch Stimulation von TLR2 durch *Hemophilus influenzae* (Shuto, T. et al., 2001) und von TLR3 durch synthetisches Poly(dIdC) (Jiang, Z. et al., 2003) vermittelten Aktivierung der Stress-Signalwege.

Bis auf TNF α verwenden alle diese Stimuli TRAF6 als cytosolisches Adaptermolekül (Chung, JY. et al., 2002).

Die Rolle von TAK1 bei der TNF α induzierten Signaltransduktion wurde kürzlich eingehender untersucht. Dabei wurde durch die Verwendung von siRNA (*small interfering RNA*) die Expression von endogenem TAK1 in Zellen inhibiert und gezeigt, dass TAK1 für die TNF α induzierte Aktivierung des IKK Komplexes essentiell ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TAK1 TNF α -abhängig mit TRAF2, IKK α und IKK β assoziiert (Takaesu, G. et al., 2003). Durch diese Daten zeichnet sich inzwischen ab, dass die MAPKKK TAK1 eine zentrale Rolle bei ist bei der Signalweiterleitung von inflammatorischen Stimuli zu den Stress-Signalwegen besitzt.

Die prinzipiellen Mechanismen, die zur Aktivierung von TAK1 und der nachgeschalteten Signalwege durch IL-1 und TNF führen sind noch einmal in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt

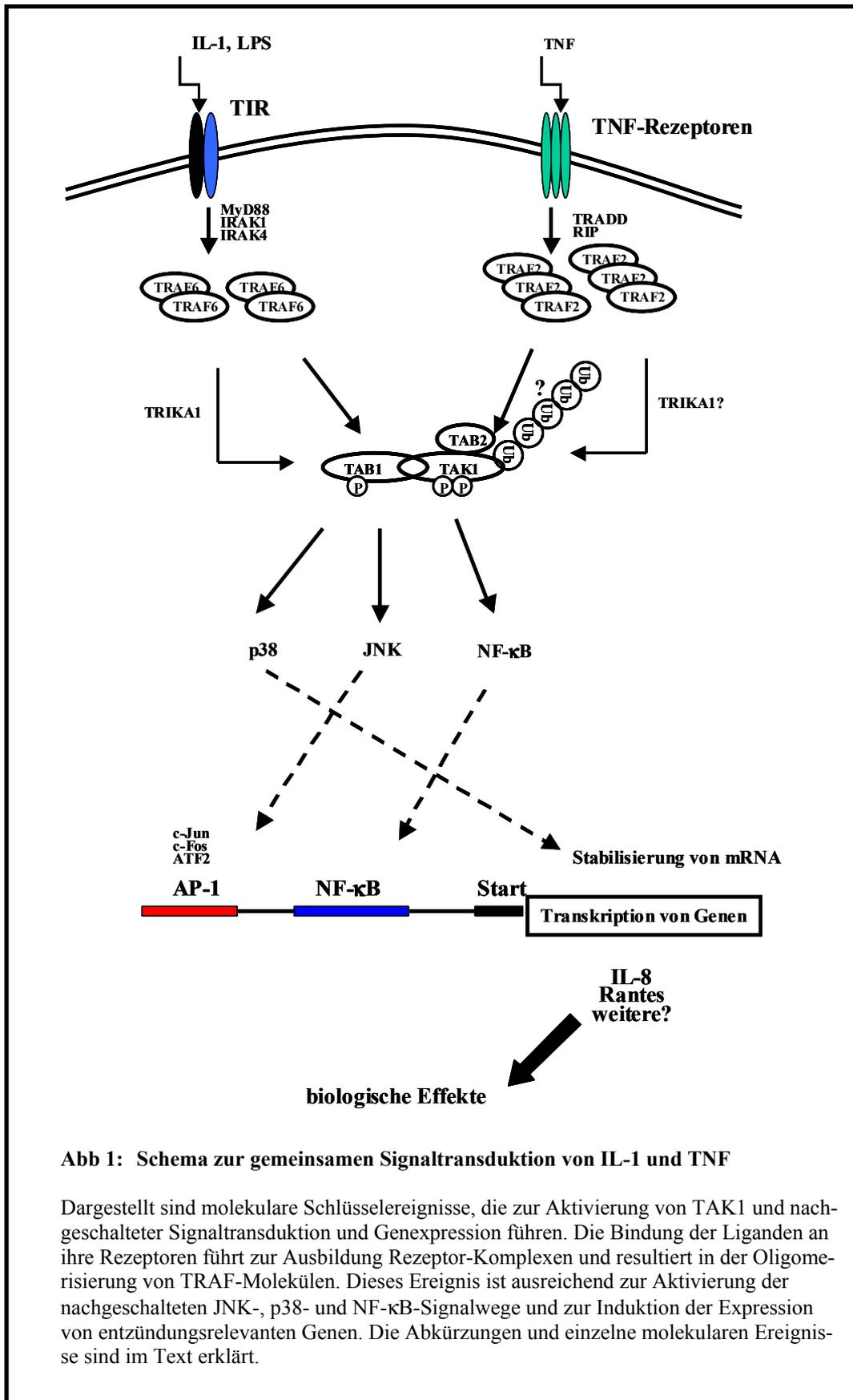


Abb 1: Schema zur gemeinsamen Signaltransduktion von IL-1 und TNF

Dargestellt sind molekulare Schlüsselereignisse, die zur Aktivierung von TAK1 und nachgeschalteter Signaltransduktion und Genexpression führen. Die Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren führt zur Ausbildung Rezeptor-Komplexen und resultiert in der Oligomerisierung von TRAF-Molekülen. Dieses Ereignis ist ausreichend zur Aktivierung der nachgeschalteten JNK-, p38- und NF-κB-Signalwege und zur Induktion der Expression von entzündungsrelevanten Genen. Die Abkürzungen und einzelne molekularen Ereignisse sind im Text erklärt.

1.7 Die Rolle von TAK1 als Effektor der TGF-beta-Familie

Ausgehend von den ersten Befunden (s.o.) ist mittlerweile die Rolle von TAK1 in der Signaltransduktion von TGF β und Cytokinen der TGF β -Familie weiter erhärtet worden. So konnte gezeigt werden, dass TAK1 wichtig ist bei der TGF β induzierten Aktivierung des JNK-MAPK Signalweges und dabei von der Kinase HPK-1 aktiviert wird (Wang, W. et al., 1997, Zhou, G. et al., 1999). Außerdem ist der TAB1/TAK1 Komplex involviert bei den Vorgängen der Embryonalentwicklung von *Xenopus leavis*, die von den BMP(*bone morphogenic protein*)-Rezeptoren 2/4 abhängen. Dazu gehören die Ausbildung der dorso-ventralen Achse, die Inhibition der Epidermis-Induktion und die Differenzierung zu neuralem Gewebe (Shibuya, H. et al., 1998, Goswami, M. et al., 2001).. Diese Ergebnisse wurden jüngst von einer Untersuchung zur Expressionsverteilung von TAK1 während der Maus-Embryonalentwicklung unterstützt, die zeigt, dass TAK1 in der Embryogenese zunächst ubiquitär, zu einem späteren Zeitpunkt aber restriktiver exprimiert wird und hohe Expressionsspiegel bei der Entwicklung von Organen, wie z.B. dem Nervengewebe und der Leber zeigt (Jadrich, JI. et al., 2003).

1.8 Die biologische Rolle von TAK1 bei der Genexpression

Im Gegensatz zu den sehr detaillierten Untersuchungen über den Aktivierungsmechanismus von TAK1 durch IL-1 α gibt es bis heute sehr wenig Informationen über die physiologische Funktion von TAK1 und MAPKKK generell im Rahmen einer Entzündung.

Bislang sind in Säugern mindestens 15 MAPKKK bekannt. Diese Enzyme sind funktionell verwandt aufgrund ihrer Eigenschaft, MAPK Kinasen (MAPKK) zu aktivieren. Darüber hinaus kann eine Reihe von MAPKKK den NF- κ B-Signalweg aktivieren, nämlich MEKK1-3, TPL2/Cot und TAK1. Aufgrund dieser Redundanz ist es völlig unklar, ob und inwieweit bestimmte MAPKKK stimuluspezifisch aktiviert werden, oder ob bestimmte MAPKKK stimulusübergreifend für die Regulation bestimmter Gengruppen verantwortlich sind. Nur wenige Untersuchungen aus defizienten Mäusen liegen vor (für MEKK1, MEKK3, NIK, Tpl-2 und Raf) (Kracht, M. and Saklatvala, J., 2002). Diese geben keine klare Aussage darüber ab, inwieweit einzelnen MAPKKK spezifische Funktionen bei einer Entzündung erfüllen.

Die Stress-Signalwege – insbesondere der JNK-, der p38- und der NF- κ B-Signalweg – werden nahezu von allen inflammatorischen Stimuli aktiviert. Wie neueste Untersuchungen zeigen haben verschiedene inflammatorische Stimuli zwar auch ein überlap-

pendes, aber auch ein z.T. sehr unterschiedliches Spektrum an regulierten Genen. Daraus lassen sich zwei Punkte schlussfolgern:

1. Da die bekannten Stress-Signalwege uniform von allen Entzündungs-Stimuli aktiviert werden, sind sie ein lohnendes Ziel zur Behandlung pathogener Formen der Entzündung, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis.
2. Die Regulation entzündungsrelevanter Gene kann nicht nur durch die bekannten Stress-Signalwege erfolgen, sondern muss zusätzliche regulatorische Signalwege beinhalten, die bislang weniger gut verstanden sind, und die die Spezifität der einzelnen Stimuli begründen.

Diese Überlegungen werden gestützt durch Versuche, die in den letzten Jahren mit niedermolekularen Inhibitoren der einzelnen MAPK-Signalwege durchgeführt wurden. Diese zeigten, dass die Inhibition einzelner Signalwege zwar die Expression einer Reihe von wichtigen Entzündungsgenen trifft, dass aber diese Inhibitionen z.T. nur partiell erfolgen. Für eine effektive Herunterregulation von Genantwort ist anscheinend die Blockade mehrerer Signalwege gleichzeitig notwendig. Eine gleichzeitige Inhibition mehrerer MAPK-Signalwege und/oder des NF- κ B Signalweges ist jedoch problematisch, weil diese ausser der Regulation von Entzündungsgenen noch viele andere wichtige Funktionen der Zellen regulieren. Daher ist es wichtig Zielstrukturen in der Zelle zu definieren, deren Inhibition zu effektiven Blockade der Signalwege für Entzündungsstimuli, nicht aber andere wichtige physiologische Stimuli führt.

Die Gruppe der MAPKKK die heterogenste der dreigliedrigen MAPK-Signalmodule. Viele MAPKKK besitzen multiple Bindungsstellen für verschiedenste Adapterproteine. Daher bieten sie innerhalb der MAPK-Module die grösste Variationsmöglichkeit, um Spezifität in den Stress-Signalwegen zu erzeugen. Außerdem werden viele MAPKKK von mehreren inflammatorischen Stimuli gleichzeitig verwendet. Aus diesem Grunde sind die MAPKKK allgemein vielversprechende Ziele für eine gezielten, therapeutischen Eingriff in die Signaltransduktion zu inflammatorischer Stimuli.

Zu Beginn der Untersuchungen war es klar, dass TAK1 involviert ist bei der Signaltransduktion der beiden wichtigsten proinflammatorischen Cytokine IL-1 α und TNF α . Im Gegensatz dazu war aber nicht bekannt, ob TAK1 auch essentiell für die IL-1-oder TNF-induzierte Expression von Genen ist, oder ob die gemeinsame Aktion von rezeptornah gelegenen Kinasen dafür erforderlich ist. Unsere Gruppe konnte als erste zeigen, dass die IL-1 α -induzierte Expression des inflammatorischen Cytokins IL-8 von TAK1 abhängt (Holtmann, H. et al., 2001). Bisher wurde nur von zwei weiteren Genen

in einem inflammatorischen Kontext gezeigt, dass ihre Expression von TAK1 abhängt. Ein Beispiel ist, die LPS induzierte Expression des Chemokines RANTES in BV-2-Mikroglia-Zellen (Jang, SB. et al., 2002) und die TNF-induzierte Expression des Proteins A20 (Takaesu, G., et al., 2003).

1.9 TAK1 als mögliche Zielstruktur pathogener Mikroorganismen

Wie anfangs erwähnt ist die angeborene oder auch unspezifische Immunität der erste und schnellste Abwehrmechanismus des Wirtes gegen eindringende Mikroorganismen. Zu den Abwehrmechanismen, die beteiligte Immunzellen verwenden, gehören die Phagozytose der Mikroorganismen, die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen und die Produktion von Cytokinen. Dazu benutzen die Zellen verschiedene Signalkaskaden, von denen einige oben vorgestellt wurden. Pathogene Mikroorganismen haben diverse Strategien entwickelt, um den Abwehrmaßnahmen zu entgehen, und man kann sich gut vorstellen, dass die Inhibition dieser Signalkaskaden ein geeigneter Mechanismus für Pathogene wäre, um die Immunantwort des Wirtes zu unterdrücken.

Die drei pathogenen Yersinien-Stämme *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* besitzen ein extrachromosomales 70 kb großes Plasmid, das die Gene für ein TypIII Transportersystem besitzt, welches in pathogenen gramnegativen Bakterien hoch konserviert ist. Dieses Transportsystem ist verantwortlich für die Translokation von ebenfalls auf diesem Plasmid codierten Virulenzfaktoren der Yop (*yersinia outer protein*)-Familie in die Wirtszelle (Cornelis, GR., 2002). Die Yop Proteine sind in dem Pathogen inaktiv und werden erst nach dem Einschleusen die Wirtszelle aktiv, wo sie die Funktion von immunrelevanten Signalmolekülen inhibieren und dem Pathogen so einen Vorteil bei der Infektion verschaffen (Orth, K., 2002).

Eines dieser Yop Proteine ist YopP aus *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* (YopJ aus *Yersinia pestis*). Die Infektion mit *Yersinia* induziert eine schnelle Aktivierung der MAPK-Signalwege gefolgt von einer starken Inaktivierung dieser Signalwege durch die Yop-Proteine von *Yersinia* (Ruckdeschel, K. et al., 1997). Die Aktivierung der Stress-Signalwege der Zelle erfolgt über Toll-Rezeptoren (Zhang, Y, and Bliska, JB., 2003). Später konnte gezeigt werden, dass YopP für diese Inhibition verantwortlich ist und auch zur Inhibition des NF- κ B-Signalweges führt (Palmer, LE. et al., 1998, Schesser, K. et al., 1998). Es wurde festgestellt, dass auch Mitglieder der MAPKK-Familie, spezifisch MEK1, von dieser Inhibition betroffen sind (Orth, K. et al., 1999). Kurz darauf wurde festgestellt, dass die vorhergesagte Sekundärstruktur von YopP ähnlich der von AVP (*adenovirus protease*) ist. Die Proteasefunktion konnte durch

Mutagenese von konservierten Aminosäuren einer katalytischen Triade in YopP bestätigt werden. Außerdem war bekannt, dass AVP als Protease für Ubiquitin oder Sumo (*small ubiquitin like protein*) fungiert. Entsprechende Versuche mit YopP zeigten, dass die Überexpression von YopP zu einer Abnahme an sumoylierten und ubiquitinylierten Proteinen führt (Orth, K. et al., 2000, Orth, K. et al., 2002). Bis heute ist nicht geklärt, welche(s) Molekül(e) das Ziel von YopP ist.

Die Tatsache, dass der oben beschriebene Komplex TRIKA2, bestehend aus TAB1, TAK1 und TAB2 Ubiquitinylierung für seine Aktivierung benötigt, und TAK1 mittlerweile bei vielen Rezeptoren der Toll-Familie verwendet wird, legt die Vermutung nahe, dass die TAK1 vermittelte Aktivierung der MAPK- und des NF- κ B-Signalweges ein Angriffspunkt für YopP sein könnte.

2 Aufgabenstellung

Die ausführlich zitierte Evidenz zur Rolle von TAK1 in der Signaltransduktion von IL-1, legte nahe, dass TAK1 eine Schlüsselfunktion in der IL-1 Signalübermittlung zum Zellkern besitzt. Außerdem gab es erste Daten, dass mit TNFa auch das zweite wichtige proinflammatorische Cytokin TAK1 zur Signaltransduktion verwendet.

Zusammen mit den Gemeinsamkeiten in der Signalweiterleitung der TIR Rezeptoren liess sich eine universelle Rolle von TAK1 als Effektormolekül im unspezifischen Immunsystem postulieren. Damit wäre TAK1 ein sehr attraktives Zielmolekül, um Effekte von mehreren TIR Rezeptoren gleichzeitig zu blockieren.

Neben den ausführlich dargestellten ungelösten Punkten der komplexen molekularen Regulation der TAK1 Aktivität, gibt es jedoch gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt kaum Daten zu der Frage, welche der mannigfaltigen biologischen Effekte, die von den proinflammatorischen Liganden der TIR und TNF Rezeptorfamilein erzielt werden, von TAK1 abhängen.

Die Klärung dieser Frage ist eine wichtige Voraussetzung zur Abschätzung des potentiellen therapeutischen Nutzens – oder auch Schadens - einer Blockade der IL-1- oder TNF-induzierten Signaltransduktion auf der Ebene von TAK1.

Um diese Frage zu beantworten, sollte zunächst eine Zelllinie hergestellt werden, die eine katalytisch inaktive Mutante von TAK1 überexprimiert. Aus eigenen Vorarbeiten und aus der Literatur war bekannt, dass eine solche Mutante bei Überexpression dominant negativ auf die IL-1 induzierte Signaltransduktion wirkt. Im Vergleich zu geeigneten Kontrolllinien sollte als erstes die Auswirkung dieser Überexpression auf die Cytokin-induzierte Signaltransduktion untersucht werden, mit besonderem Fokus auf die drei wichtigsten Signalwege, den JNK-, den p38-MAPK Signalweg und den NF-kB-Signalweg.

Parallel sollte untersucht werden, ob die Überexpression der TAK1-Mutante auch biologische Konsequenzen für die betreffende Zelllinie und deren Reaktion auf die Stimulation mit den proinflammatorischen Cytokinen hat. So war es z. B. nicht von vorneherein klar, ob die dauerhafte Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante für die Zellen lethal sein würde. In der Tat gab zu Beginn der Arbeit

Hinweise, dass TAK1 im Kontext der TGF β induzierten Signaltransduktion einen antiproliferativen Effekt hat.

Im inflammatorischen Kontext sollte untersucht werden, ob die Überexpression der TAK1-Mutante dazu führt, dass wichtige Gene, die in der Entzündung eine Rolle spielen, nicht mehr oder nur vermindert exprimiert werden.

Diese Untersuchungen sollten dazu dienen herauszufinden, ob die Überexpression der TAK1-Mutante prinzipiell geeignet sein kann, Entzündungen oder pathogene Formen der Entzündung positiv *in vivo* zu beeinflussen.

Aus diesem Grunde sollte die cDNA für Fusionsproteine aus TAK1wt bzw. der katalytisch inaktiven Mutante und dem grün fluoreszierenden Proteins GFP (*green fluorescent protein*) mit Hilfe von Retroviren in die Zellen geschleust werden, um eventuell später die Möglichkeit zu haben, diese *in vivo* anzuwenden – zum Beispiel im Rahmen einer tierexperimentellen Gentherapie- und die Überexpression leicht detektieren zu können. Außerdem könnte die Erfahrung mit den GFP-TAK1 Fusionsproteinen bei einer anderen Form von *in vivo* Modell, z. B. bei transgenen Tieren, auf dieses angewendet werden.

Parallel dazu sollte untersucht werden, ob TAK1 oder eine Komponente der TAK1-abhängigen Signaltransduktion ein Angriffspunkt für den *Yersinia*-Virulenzfaktor YopP ist. Die damit einhergehende Definition von TAK1 als Zielstruktur pathogener Mikroorganismen zur Verhinderung einer entzündlichen Reaktion würde das Konzept von TAK1 als therapeutische Zielstruktur stärken.

Dazu sollte zunächst ein im Labor nicht vorhandener Versuchsaufbau zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von TAK1 etabliert werden, um den Einfluss von YopP auf diese untersuchen zu können. Außerdem sollte untersucht werden, ob der TAB1/TAK1-Komplex durch Ubiquitin modifiziert wird und diese durch YopP beeinflusst wird.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien allgemein

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Serva, Sigma, Merck, Baker, Fluka, Biomol, Promega, Invitrogen und Pharmacia bezogen (Qualitätsstufe „p.a.“, „Für die Molekularbiologie“ oder „*cell culture grade*“).

3.2 Geräte

Elektrophorese-, Westernblot- und Fotografiesysteme

- Biometra BioDoc Analyze UV-Transilluminator
- Biotec Fisher PHERO-STAB 0632 Spannungsgerät
- Hoefer Mighty Small, SE250/260 Gelelektrophorese-Apparatur
- LKB (Schweden) LKB 2051 Midget Multiblot
- Schleicher&Schuell *Semi-Dry-Blotter*
- Sigma Vertikale duale Elektrophoresekammer

Mikroskope und Photometer

- Eppendorf BioPhotometer
- Leitz Diavert
- Leitz Laborlux 11
- MR6500 Dynatech Mikrotestplattenleser
- Shimadzu Spektralphotometer UV-160A
- ULWCD Olympus mit Kameraausstattung
- Zeiss Axiovert 200M

Verschiedenes

- Amersham Pharmacia Biotech ÄKT*Aprime*
- Biometra Gelrockner
- B. Braun Biotech International Certomat H Inkubator
- EG&G Berthold Lumat LB 9507 Luminometer
- Eppendorf Thermomixer 5436
- Heidolph Vortex
- Landgraf Thermocycler
- Lauda C6 CS Wasserbad
- Perkin Elmer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzer)
- Protec Optimax Filmentwicklermaschine
- Ziegra Eismaschine
- *ELISA-Reader* (Firma Dynatech)

Waagen

- Chyo Electronic Balance MP-3000
- sartorius analytic

Zellkultur

- GFL Wasserbad
- Heraeus Brutschrank CO₂ Autozero
- Heraeus Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472

Zentrifugen

- Beckmann J2-21 Centrifuge
- Beckmann L8-70M Ultracentrifuge
- Beckmann TL-100 Ultracentrifuge
- Eppendorf Concentrator 5301
- Heraeus Biofuge Fresco
- Heraeus Biofuge Pico
- Sorvall RC2B
- Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge (DuPont)
- Sigma 4K15
- Sigma 6K10

3.3 Lösungen und Puffer

Coomassie Brilliant Blue-Lösung

0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
50% (v/v)	Methanol
20% (v/v)	Essigsäure

Entfärbelösung

30% (v/v)	Methanol
1% (v/v)	Ameisensäure

2xHeBS (sterilfiltriert)

0,28mol/l	NaCl
0,05mol/l	HEPES
1,5mmol/l	Na ₂ HPO ₄

pH 7,05 mit 5mol/l NaOH einstellen

10x Laemmli-Laufpuffer

0,5mol/l	Tris
1,92mol/l	Glycin
0,5% (w/v)	SDS

4x Laemmli-Auftragspuffer

100mmol/l	Tris (pH 8,8)
8% (w/v)	SDS
24% (v/v)	Glycin
16% (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,02% (w/v)	Bromphenolblau

mit ddH₂O auf 25ml auffüllen

Luziferase-Reagenz

200mmol/l	Tricin
-----------	--------

10,7mmol/l (MgCO₃)₄Mg(OH)₂ * 5H₂O
26,7mmol/l MgSO₄
333mmol/l DTT
10mg Coenzym A
5,931mg Na-Luziferin
5,3mmol/l ATP

10 x MOPS:

200 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
mit NaOH auf pH 7 eingestellt

Milch

5ml 5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBST-Puffer

10x Nass-Blotpuffer (pH 8,3)

30,25g Tris
144,2g Glycin
7,5g SDS
20% (v/v) Methanol

PBS

137mmol/l NaCl
2,7mmol/l KCl
4,3mmol/l Na₂HPO₄
1,4mmol/l KH₂PO₄

RNA/DNA Auftragspuffer

50 % (v/v) Glycerol
1 mM EDTA pH 8
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Sammelgelpuffer

1mol/l Tris (pH 6,8)

10x Semi Dry Blotpuffer

10x Nass-Blotpuffer ohne SDS

20x SSC-Puffer

3M NaCl
300mmol/l Tri-Natrium-Citrat
einstellen auf pH 7,0

20x SSPE

3M NaCl
200mmol/l NaH₂PO₄
20mmol/l EDTA

TAE-Puffer

4mmol/l Tris

0,11% (v/v) Essigsäure
1mmol/l EDTA

TE-Puffer

10mmol/l Tris (pH 7,0-8,0)
1mmol/l EDTA

TBS-Puffer (pH 7,4)

10mmol/l Tris
1,54mol/l NaCl

TBST-Puffer

TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20

Trenngelpuffer

1mol/l Tris (pH 8,8)

TSS-Lösung

10% (w/v) Polyethylenglykol 6000
5% (v/v) DMSO
50mmol/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
mit LB-Medium auf 25ml auffüllen

LB-Medium

10g BactoTrypton
10g NaCl
5g Hefeextrakt
mit ddH₂O auf 1l auffüllen und autoklavieren

3.4 Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits

Bradford-Kit	Protein Assay Dye Reagent, Bio Rad
dNTP Set	New England Biolabs
GSH-Sepharose	Pharmacia
G418 (Geneticin)	Calbiochem
Hybond-N	Amersham
Medium und Zusätze (Zellkultur)	GibcoBRL
Molekulargewichtsstandard für	
Mini-Präp Kit	Pharmacia
Protein A-/G-Sepharose	Pharmacia
PVDF-Membran	Millipore
pd(N ₆)	Pharmacia
Qiagen Plasmid Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
Radioaktive Isotope	ICN
	Hartmann Analytics
	Pharmacia (Freiburg)
Restriktionsendonukleasen	MBI (St. Leon-Rot), Pharmacia
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen
Röntgenfilme	Biomax-ML, Biomax-MR (Kodak)
Taq-DNA-Polymerase	GibcoBRL
Zellkulturmaterial	Nunc

Antikörper und rekombinante Proteine

SAK-9 (Prof. Saklatvala, London, UK)

Antiserum aus Kaninchen, polyklonal (nicht aufgereinigt)
immunisierendes Peptid von p54SAPK α (Ratte)/human JNK2 α 2(409-423) abgeleitet
DSSLDDASTGPLEGCR-COOH

SAK-7 (Prof. Saklatvala, London, UK)

Antiserum aus Kaninchen, polyklonal (nicht aufgereinigt)
immunisierendes Peptid vom C-Terminus von p38 MAPK α abgeleitet
ISFVPPLDQEEMES

anti-GFP (Boehringer Mannheim)

Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern aus der Maus (Klone 7.1 und 13.1) gegen GFP; Immunisierung von Mäusen mit partiell gereinigtem rekombinanten *Aequorea victoria* GFP als Immunogen

anti-JNK1 (C-17, Santa Cruz)

polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus Ziege,
immunisierendes Peptid abgeleitet von C-terminalen Aminosäuren von humanen JNK1

anti-TAK1(M579, Santa Cruz)

polyklonaler affinitätsgereinigter Antikörper aus Kaninchen
Immunisierung von Kaninchen mit rekombinantem vollständigem TAK1 als Immunogen

anti-TAB1(Prof. Matsumoto, Nagoya ,Japan)

polyklonaler affinitätsgereinigter Antikörper aus Kaninchen
Immunisierung mit Peptid der Aminosäuren 480-500 aus TAB1

anti-Caspase 3 (H-277, Santa Cruz)

polyklonaler affinitätsgereinigter Antikörper aus Kaninchen
Immunisierung mit dem kompletten Protein als Immunogen

anti-Cytochrom-c(Klon 7H8.2C12; Pharmingen)

monoklonaler affinitätsgereinigter Antikörper aus der Maus; Isotyp IgG2

anti-Ubiquitin (P4D1; Santa Cruz)

monoklonaler affinitätsgereinigter Antikörper aus der Maus; Isotyp IgG1
Immunisierung mit dem kompletten Protein als Immunogen

anti-Maus IgG-POD

Pharmacia, Freiburg

anti-Kaninchen IgG-POD

Pharmacia, Freiburg

humanes, rekombinantes GST-c-Jun (1-135)

PD Dr. Kracht

GST-SAPK β

Prof. Saklatvala

His-MKK6

Arbeitsgruppe Dr. Kracht

humanes, rekombinantes IL-1 α

Prof. Saklatvala

TNF α

Dr. Wajant

Fas-Ligand

Prof. D. Wallach

Plasmide

pEGFP-TAK1wt	Arbeitsgruppe Dr. Kracht
pEGFP-TAK1 _{K63W}	Arbeitsgruppe Dr. Kracht
pM5XNeo	Arbeitsgruppe Dr.D. Wirth, GBF, Braunschweig
p5XNeo-GFP-TAK1wt	Arbeitsgruppe Dr. Kracht
pM5XNeo-GFP-TAK1 _{K63W}	Arbeitsgruppe Dr. Kracht
pEGFPc1	Clontech, Heidelberg
pSR α Ha-TAK1	Arbeitsgruppe Prof. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
pEF-TAB1wt	Arbeitsgruppe Prof. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
pEGFP-TAB1wt	Ph. D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pEGFP-TAB1C(437-504)	Ph. D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pQBI-MEKK1(998-2743)-BFP	Arbeitsgruppe Dr. Kracht
pQUE3.1-MKK6	Arbeitsgruppe Prof. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
pCS3MT	Dr. P.Holland
pCDNA3.1	Invitrogen, Mannheim
pMT107-His-Ubiquitin	Dr. H. Wajant
pMT123Ha-Ubiquitin	Dr. H. Wajant
pSV-betaGal	Promega, Karlsruhe
pUHD133-IL-8-Promotor-Luc-wt	Arbeitsgruppe Dr. Kracht
pNF-kB ₃ -Luc	Dr. L. Schmitz
p(Gal4) ₂ -Luc	Dr. L. Schmitz
pGAL4-p65(1-551)	Dr. L. Schmitz
pGal4-p65 Δ C(1-285)	Dr. L. Schmitz
pIC-9mMCP1	Dr. H. Radecke
RSV-c-Jun	Dr. B. Lüscher
RSV-FosGHF	Dr. B. Lüscher
pMPSVHE-IFN- β	Dr. M. Nourbaksh

Oligonukleotide

GFP-cterm

CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G

GFP forward

CA CAA TCT GCC CTT TCG AAA

ClaI5'-GFPse(608)

GCGC **ATCGAT** **CCACC** ATG GTG AGC AAG GG; (rot: *ClaI*-Schnittstelle, blau: Kozak-Sequenz, unterstrichen: Start-Kodon)

ClaI3'TAK1as(3102)

GCGC **ATCGAT** TCA TGA AGT GCC TTG TCG TTT C (rot: *ClaI*-Schnittstelle)

Yop sense

ATT GGG **CCA** ATA TCA CAA ATA AAC AGC

(rot: Punktmutation, keine Änderung der Aminosäuresequenz)

Yop antisense

TTA TAC TTT GAG AAG TGT TTT ATA TTC AGC

mCOX-2se (224-245)

GAG CAC AGG ATT TGA CCA GTA T

mCOX-2as (1577-1597)

GGG TAC AGT TCC ATG ACA TCG

mMCP-3se(223-244)

CTT CAA GAC AAA GAA GGG CAT G

mMCP-3as(566-588)

CTG CAG CTA ACA CAA TGT TAA AG

mSaa3se(49-76)

GAC AGC CAA AGA TGG GTC CAG TTC ATG

mSaa3as(344-369)

CAG TAT CTT TTA GGC AGG CCA GCA G

Slpi se (385-410)

TTA CCT TTC ACG GTG CTC CTT GCT

Slpi as (726-751)

CAG GCA GAC TTT CCC ACA TAT ACC C

NF-κB Konsensus Oligo

TGA CAG AGG GGA CTT TCC AGA GA

(plus revers komplementäre Sequenz)

Sonden für Northern-Blot Analysen

mcp-1

Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI

cox-2

RT-PCR

retrovirale *long term repeats* (LTR's)

Restriktionsverdau mit *Pst*I

c-myc

von Dr. B. Lüscher

c-Fos

Restriktionsverdau mit *Bgl*II und *Nco*I

c-Jun

Restriktionsverdau mit *Bam*HI, *Nco*I und

*Pst*I

saa3

RT-PCR

slpi

RT-PCR

3.5 Arbeiten mit Bakterienkulturen

Material

E.coli Bakterienstamm LKIII, (r_k⁻, m_k⁺, thi-1, thr 1, leuB6, onA21supE44, lacI^qYZΔM15, Hfrλ⁺)

E. coli Bakterienstamm TOP10 ; (F - *mcrA* .(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* M15
.lacX74 *deoR recA1 araD139.(ara-leu)*7697 *galU*
galK rpsL (Str_R) *endA1 nupG*) (Invitrogen)

LB-Medium
Kanamycin 50mg/ml
Ampicilin 100mg/ml
TSS

3.5.1 Allgemein

Alle verwendeten Bakterienstämme leiten sich von dem *E. coli* Sicherheitsstamm K12 ab. Die Aufzucht der Bakterien erfolgte in Flüssigkulturen mit LB-Medium und Antibiotika entsprechend den Plasmid-codierten Resistenzen bei 37°C und 200rpm in einem Schüttelinkubator(Certomat H, B. Braun Biotech int.). Ampicilin wurde mit einer finalen Konzentration von 100µg/ml und Kanamycin bei einer finalen Konzentration von 50µg/ml verwendet.. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme TOP10 und LK111 verwendet.

Zur Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Prep)

Zur Präparation von Plasmiden im analytischen Maßstab wurden 3ml-Flüssigkulturen oder 1,2ml-Flüssigkulturen von Bakterienkolonien von Agarplatten angeimpft und über Nacht bzw. für 6-8h im Schüttelinkubator kultiviert. Aliquots der Kulturen wurden bei 13.000xg für eine Minute zentrifugiert. Die Pellets wurden dann nach der Vorschrift für die Mini-Prep aufgearbeitet.

Zur schnellen Analyse von Plasmid-DNA mit der Quick-Check Methode wurden von Bakterien-Kolonien 0,3ml-Flüssigkulturen angeimpft und für mindestens 5 Stunden wachsen gelassen

Zur Plasmid-Präparation im großen Maßstab (Maxi-Prep)

Zur Aufreinigung von Plasmiden im präparativen Maßstab wurden 200ml-500ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum aus der gewünschten Bakterien Dauerkultur oder aus einer Vorkultur angeimpft und über Nacht kultiviert. Die Kulturen wurden für 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert(Modell 6K10, Sigma) und gleich nach der Vorschrift für eine Maxi-Prep aufgearbeitet oder bei -20°C eingefroren.

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Flüssigkultur (5ml LB-Medium) des LKIII(λ)-Leerstammes angesetzt und ü.N. bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann eine größere Flüssigkultur angesetzt (50-150ml LB-Medium) und so lange inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,3-0,5 erreicht war. Die Zellen wurden pelletiert (4°C, 3000g, 10min.) und in 1/10 Volumen TSS bei 4°C resuspendiert. Die Suspension wurden sofort auf Eis in 200µl Portionen aliquotiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Transformation der kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Eingefrorene 200µl-Aliquots der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit einer entsprechenden Menge Plasmid-DNA vereinigt (10ng zirkuläres Plasmid, 2-10µl eines Ligationsansatzes) und 30min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt bei 42°C in einem vorgeheizten Wasserbad für 45Sekunden. Der Ansatz wurde dann auf Eis 2min. lang abgekühlt. Durch diese Prozedur nehmen die Bakterien die vorgelegte Plasmid-DNA auf. Anschließend wurden 800µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wird u.a. das plasmidkodierte Resistenzgen exprimiert.

Um Klone zu vereinzeln, wurde ein Teil dieser Vorkultur auf Agarplatten ausplattiert, die den entsprechenden Selektionsmarker enthielten. Wurde ein Ligationsansatz transformiert, dann wurden die Bakterien sedimentiert (5min., 2000g, Raumtemperatur), in 100µl LB-Medium resuspendiert und komplett ausplattiert.

Herstellung von Dauerkulturen

Die Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen erfolgt bei -80°C als Glycerin-Dauerkultur. Die Herstellung erfolgte nach Standard-Methoden (Sambrook et al, 1989).

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Quick-Check Methode

Material

gepuffertes Phenol/Chloroform/Isoamyalkohol-Gemisch (25:24:1), (Roth)

gesättigt mit TE-Puffer, pH 7,5-8,0

DNA-Auftragspuffer

Methode

Ein 100µl Aliquot der entsprechenden Kulturen wurde mit 10µl DNA-Auftragspuffer und 50µl Phenol/Chloroform-Gemisch versetzt, heftig geschüttelt und für eine Minute bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem wässrigen Überstand, in dem sich unter anderem die Nukleinsäuren der Bakterien befinden, wurden 20µl auf einem Agarose-Gel analysiert. Neben Signalen für die chromosomale DNA und die RNA der Bakterien sind auch Banden der Plasmid-DNA sichtbar. Bei einem ausreichenden Größenunterschied zwischen neu kloniertem Plasmid und Mutterplasmid sind positive Klone anhand der Laufstrecke der *super-coiled*-Form der Plasmide im Vergleich zu mitgelaufenen Referenzprobe des Mutterplasmides sichtbar.

3.6.2 Mini-Prep von Plasmiden

GFX Micro Plasmid Prep Kit (Firma Amersham Pharmacia

Bakterienpellet aus einer entsprechenden Kultur

TE-Puffer, pH 7,6

Methode

Zur Mini-Präp. von Plasmiden wird der *GFX Micro Plasmid Prep. Kit* verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgte zum Schluß mit 30-50µl Wasser oder TE-Puffer, pH 7,6.

3.6.3 Maxi-Prep von Plasmiden

Material

Maxi-Plasmid Prep Kit (Firma Qiagen)

Bakterienpellet aus einer entsprechenden Kultur

Methode

Zur Maxi-Präp. wird der *Maxi-Plasmid Prep Kit* verwendet. Auch hier erfolgt die Aufarbeitung nach den Herstellerangaben.

3.6.4 Restriktionsverdau von DNA

Material

Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas), Aktivität immer 10U/µl

Puffer für Restriktionsendonukleasen: kommerziell erhältliche 10x- Puffer (MBI Fermentas)

Methode

Ein analytischer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurde zum Nachweis einer Restriktionsschnittstelle oder zum Nachweis eines DNA-Fragmentes bestimmter Größe durchgeführt. Je nach Art der zu analysierenden DNA und der zu erwartenden Fragmente wurden 100-500ng DNA eingesetzt oder 2-5µl Plasmid DNA einer Mini-Prep unbekannter Konzentration. Der Verdau erfolgte für eine Stunde unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen mit 2-3U des Enzymes in einem 20µl-Ansatz. Die Analyse des Verdau erfolgte auf durch Elektrophorese auf einem Agarosegel.

Restriktionsverdau-Ansätze im präparativen Maßstab wurden gemacht, um DNA-Fragmente oder Plasmid-DNA für eine Klonierung vorzubereiten oder um DNA-Sonden zum Einsatz bei einer Northern-Blot Analyse zu präparieren. Dabei wurden immer Überverdau-Bedingungen eingehalten, um sicher zu gehen, dass die DNA vollständig geschnitten wurde. Zur Klonierung in den Vektor pM5XNEO wurden 30µg dieses Plasmides 50U *ClaI* für 16h bei Raumtemperatur inkubiert. Die in diesen Vektor klonierten PCR-Fragmente wurden zur Generierung der kompatiblen Enden für 2h mit 40U *ClaI* inkubiert.

Zum Einsatz in der Northernblot-Analyse wurden Sonden für *mcp-1*, *c-jun*, *c-fos* und retrovirale LTR (*long term repeats*) durch Restriktionsverdau hergestellt. Dabei wurden jeweils immer 30-50µg Plasmid DNA mit 50U der entsprechenden Enzyme in 100µl-Ansätzen inkubiert, so dass der Überverdau 10-30fach war.

Die Aufreinigung der gewünschten, verdauten DNA-Fragmente erfolgte nach Agarosegel-Elektrophorese mit einem Gel Extraktions Kit (Qiagen) oder mit einer DEAE-Membran.

3.6.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Material

cloned Pfu-Polymerase (Stratagene)

10x *cloned Pfu DNA Polymerase Buffer* (Stratagene)

Taq-DNA Polymerase (Invitrogen)

10x Taq DNA Polymerase Puffer ohne MgCl₂ (Invitrogen)

10x Taq-Polymerasepuffer ohne MgCl₂

dNTP-Mix, 10mM pro Nukleotid in Wasser (Roche)

50mM MgCl₂ (Stratagene)

Primer, synthetische Oligonukleotide (MWG Biotech AG)

DMSO

Mineralöl

*Thermocycler Varius TCV 5*9* (Firma Landgraf)

Methode

Bei der PCR-Technik werden DNA-Abschnitte von einer thermostabilen DNA-Polymerase durch zyklisches Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge und Neusynthese der komplementären DNA-Stränge durch die Polymerase amplifiziert, ausgehend von sich an den 3'-Enden der Einzelstränge anlagernden komplementären Oligonukleotiden (Primer). Dabei ist theoretisch eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erreichbar. Das standardmäßig Verwendete Temperaturprofil zeigt die folgende Tabelle

	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min.]
1	initiale Denaturierung	95	1-5
2	Denaturierung	95	1
3	Anlagerung der Primer	55-70	1
4	Elongation	72	1-2/kB(Taq); 0,5/kB(Pfu)
5	finale Elongation	72	6-12

Die optimale Anlagerungs-Temperatur der Primer hängt von deren Sequenz ab und muß experimentell bestimmt werden. Zur Orientierung kann sie einfach mit der 2+4-Formel abgeschätzt werden: 4°C pro C oder G und 2°C pro A oder T.

Die PCR-Reaktionen wurden unter den folgenden Standard Bedingungen durchgeführt.

DNA-Matrize (Plasmid)	50-100ng
Primer sense	0,5mmol/l
Primer antisense	0,5mmol/l
10x Puffer	1x
dNTP	0,2mmol/l pro Nukleotid
MgCl ₂	1,5-5 mmol/l
Pfu oder Taq Polymerase	2,5U
Wasser	ad 50µl

Die zur Klonierung in den Vektor pM5XNeo amplifizierten PCR-Produkte wurden mit der Pfu-Polymerase hergestellt, alle anderen verwendeten PCR-Produkte mit der Taq-Polymerase. Die Pfu-Polymerase hat aufgrund einer 3'-5' Proofreading-Aktivität eine deutlich geringere Fehlerrate aber auch eine geringere Prozessivität bei der Synthese als die Taq-Polymerase.

3.6.6 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor

Material

Präpariertes DNA-Insert

Präparierter Zielvektor

T₄-DNA-Ligase, (MBI Fermentas) 5U/µl

10x Ligasepuffer MBI Fermentas)

NT-GFP Fusion TOPO TA Expression Kit (Invitrogen)

Methode

Zur Ligation eines DNA Fragmentes in einen Vektor wurden 200ng Vektor und das DNA-Fragment in verschiedenen molaren Verhältnissen zu einander in einem Ansatz mit 10U der T₄-DNA Ligase, 2µl des 10x Ligasepuffers und zusätzlich 0,5mmol/l ATP in 20µl Ansätzen bei 16°C für 4-16h inkubiert. Das optimale Verhältnis muß experimentell bestimmt werden. Für die Klonierung der GFP-TAK1-Fragmente war ein Vektor/Fragment-Verhältnis von 1:3 optimal. Von den Ansätzen wurden 2-5µl-Aliquots zur Transformation verwendet.

Die Ligation des YopP-PCR Produktes in den Vektor pCDNA3.1-NT-GFP-TOPO erfolgte mit den in dem Kit vorhandenen Reagenzien und nach den Angaben des Herstellers. Die Ligation eines PCR-Fragmentes erfolgt in diesen linearisierten Vektor durch an den Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus.

3.6.7 Agarose-Gelelektrophorese

Material

Agarose, (Sigma-Aldrich)

TAE Laufpuffer

Ethidiumbromid-Lösung, 10mg/ml (Sigma)

10x Auftragspuffer

DNA-Standards λ -DNAx *EcoRI*x *HindIII*; c = 100ng/ μ l; 5000bp-1200bp

Φ -DNAx *HaeIII* (MBI Fermentas); 1353bp-72bp

1kB-Leiter (New England Biolabs); 10kb-1kb

Methode

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zu analytischen und präparativen Zwecken in einem 0,5- 2,5%igen Agarosegel durchgeführt. Zu dessen Herstellung wurde die entsprechende Menge Agarose mit 100ml Laufpuffer in einer Glasflasche aufgekocht bis sich alle Agarose gelöst hatte. Anschließend werden 10 μ l Ethidiumbromidlösung zugegeben (Endkonzentration =10 μ g/ml) und unter Rühren abkühlen gelassen. Sobald die Lösung handwarm war, wurde das Gel gegossen.

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert.

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Fragmente in den Proben wurden in weiteren Geltaschen 3-15 μ l geeigneter DNA-Standards aufgetragen. Die Gelkassette wurde in einer Elektrophoreseapparatur mit TAE-Laufpuffer bedeckt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 6-8V/cm und wurde bei gewünschter Auftrennung gestoppt. Die DNA-Banden mit interkaliertem Ethidiumbromid werden auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und photographiert. Eine Konzentrationsbestimmung kann erfolgen, indem die Bandenintensität der Probenfragmente mit Bandenintensitäten von Proben mit bekannter Konzentration verglichen wird

Die Durchführung einer präparativen Agarosegel-Elektrophorese erfolgte auf die gleiche Weise. Da die Probenvolumina größer sind, wurden auch größere Geltaschen benötigt. Die gewünschten DNA-Fragmente werden auf einem UV-Leuchttisch kurz sichtbar gemacht und ausgeschnitten.

3.6.8 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Material

QIAquick Gel Extraction Kit, (Firma QIAGEN)

DEAE-Membranen, NA45, (Firma Schleicher& Schuell)

Waschpuffer, pH8,0 (50mmol/l Tris, 5mmol/l EDTA, 0,15mol/l NaCl)

Elutionspuffer, pH8,0 (50mmol/l Tris, 5mmol/l EDTA, 1mol/l NaCl)

100% Isopropanol, 70% Ethanol

TE-Puffer

Methode

Die Extraktion der gewünschten DNA-Banden aus einem präparativen Agarosegel erfolgte entweder unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit*, oder durch Elektroelution der DNA auf eine DEAE-Membran.

Die Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die DNA-Bande im UV-Licht identifiziert, aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück entsprechend seiner Masse in einem bestimmten Volumen eines chaotropen Puffers aufgelöst. Die DNA wurde an einer Säule mit einer porösen Silicagelmatrix immobilisiert und nach einem Waschschrift mit 50 μ l ddH₂O oder Puffer (10mM Tris, pH 8,5) eluiert.

Bei der Elektroelution der DNA-Bande auf eine DEAE-Membran wurde nach erfolgter Trennung der DNA-Fragmente auf einem präparativen Agarosegel ein Schnitt genau unterhalb der gewünschten Bande gesetzt und dort ein DEAE-Membranstück vertikal hinter die gesamte Fläche der DNA-Bande gesetzt. Die Membran wurde durch eine Klammer, die das gesamte Gel umfaßt, an den Gelrand gedrückt. Durch Anlegen einer Spannung (50V, 15min.) wurde die DNA auf die Membran transferiert. Der vollständige Transfer wurde auf einem UV-Tisch kontrolliert. Die Membran wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann in 400µl Elutionspuffer inkubiert (1h, 70°C), wobei sich die DNA von der Membran löst. Die vollständige Elution von der Membran wird im UV-Licht kontrolliert und ggf. weiter inkubiert. Das Eluat wurde mit 400µl Isopropanol (100%) gemischt, die DNA ü.N. bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation (4°C, 15000g, 15min.) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 500µl 70%Ethanol gewaschen erneut sedimentiert (4°C, 15000g, 15min.) und nach Entfernen des Überstandes getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen (5 - 20µl).

3.6.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch anhand der Extinktion der gereinigten Nukleinsäure-Lösung bei einer Wellenlänge von 260nm gegen den Lösungspuffer als Referenz.. Dabei wurden die folgenden Extinktionskoeffizienten angenommen: dsDNA: 1OD entspricht 50µg/ml
RNA: 1OD entspricht 40µg/ml

Alternativ wurde die Konzentration von DNA nach Agarose-Gelelektrophorese durch einen Vergleich mit den Banden von definierten Mengen des DNA-Standards λ -DNAx EcoRIx HindIII abgeschätzt.

3.6.10 DNA-Sequenzierung

Material

Plasmid-DNA (*Template*): ca.200- 500ng

DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction
(*ready reaction mix* [RRM],*template supression reagent* [TSR]) ,(ABI PRISM)

Primer , Stocklösung $c_{DNA} = 100\text{pmol}/\mu\text{l}$

3M Natriumacetat (Sigma)

Ethanol: 100%, 70%

Methode

Die Sequenzierung erfolgte nach einer Methode, die als Kombination aus PCR und Sequenzierungsverfahren nach Sanger (vgl. Sanger et al. 1977) aufzufassen ist (auch als „*Taq-cycle-sequencing*“ bezeichnet). Das Grundprinzip der *Template*-Vermehrung ist dasselbe wie bei der PCR. Jedoch enthält der Reaktionsansatz einen kleinen Anteil an den vier Didesoxynukleotiden, deren Einbau zum Abbruch der Kettenreaktion aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe führt. Jede Spezies der Dideoxynukleotide trägt eine bestimmte Fluoreszenzmarkierung. Auf diese Weise erhält man DNA-Stränge, die sich um die Länge eines Nukleotids unterscheiden, und deren letztes Nukleotid fluoreszenzmarkiert ist.

Im *Sequencer* erfolgt dann eine säulenchromatographische Auftrennung der DNA-Stränge anhand der Länge und die Detektion der Fluoreszenz des letzten Nukleotids zur Identifizierung der Base.

Das Pipettierschema für einen Sequenzierungsansatz:

	Vol. [μ l]	m
DNA		200 - 500ng
<i>Primer</i> 1:100)	2 – 10 μ l	2 - 10pmol
RRM	4 μ l	
Wasser	ad 20 μ l	

Das Temperaturprogramm zur Sequenzierung:

Zeit	T [$^{\circ}$ C]
30''	96
15''	<i>Annealing</i> -Temperatur (meist 50 $^{\circ}$ C, je nach Pri- mer)
4'	60

Es wurden 25 Zyklen durchlaufen. Anschließend wurden 80 μ l dest. Wasser zugefügt und der gesamte Ansatz in ein Sequenziergefäß umgefüllt. Zum Fällen der DNA wurden dann 10 μ l der NaAc-Lösung und 250 μ l 100%Ethanol hinzugegeben. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (30', 22 $^{\circ}$ C, 13000rpm in Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgezogen, die DNA mit 200 μ l 70%Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10', 22 $^{\circ}$ C, 13000rpm in Tischzentrifuge). Das DNA-Pellet wurde bei 37 $^{\circ}$ C vollständig getrocknet, in 20 μ l TSR aufgenommen und erhitzt (2', 95 $^{\circ}$ C). Das Erstellen der Sequenz erfolgte durch den 310 *Abi Prism*TM Genetic Analyzer.

3.6.11 Isolierung von totaler RNA aus Zelllinien

Material

RNeasy-Mini-Kit (Qiagen)

QIAshredder Kit (Qiagen)

70% Ethanol

Methode

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen vom Typ NIH3T3 erfolgte nach Herstellerangaben. In Kürze: Zellen aus konfluenten T75 Zellkulturflaschen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, geerntet, und in 650 μ l Lysepuffer lysiert. Die Lysate wurden mit QIAshredder-Säulchen homogenisiert. Nach Klärung des Lysates durch Zentrifugation wurde die Gesamt-RNA nach Vorschrift über Säulchen mit einer Silica-Gel Matrix aufgereinigt und in 50 μ l Wasser eluiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.6.12 Northern-Blot Analyse

Material

10 x MOPS:

RNA-Stoppuffer:

RNA-Probenpuffer (für einen Ansatz):

3,75 μ l Formaldehyd

1,5 μ l 10 x MOPS

1 μ l Ethidiumbromid (200 ng/ml)

10xSSC

RNA-Gel, große Kammer (360 ml):

3,6	g	Agarose
36	ml	5 x MOPS
67,5	ml	Formaldehyd
ad 360 ml		H ₂ O

Methode

Für die Elektrophorese und den Northern Transfer von RNA wurden autoklavierte, RNase-freie Materialien verwendet. In einem 1 % (w/v) igen Agarose-Gel mit 6 % (v/v) Formaldehyd wurden gleiche Mengen RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde eine spezielle RNA-Flachbett-Elektrophoresekammer verwendet, die mit 1 x MOPS gefüllt wurde.

Je 5 - 15 µg RNA in 10µl Wasser pro Ansatz wurden mit 7,5 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 56°C für 15 min, worauf die RNA-Probe kurz zentrifugiert und mit 3 µl RNA-Stoppuffer versetzt wurde.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (70 V, 3h) wurde das Gel auf einem UV-Tisch kontrolliert, um die Integrität der RNA sicherzustellen, sowie um die Auftragsmengen anhand der Anfärbungsintensität der 18S und 28S rRNA zu überprüfen.

Zur Vorbereitung auf den Northern-Blot wurde das Gel zweimal für je 30 min in sterilem Wasser und anschließend einmal in 10x SSC für 20 min leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine mit Blotpuffer (10 x SSC) gesättigte Whatman-(3MM)-Filterpapierbrücke gelegt, die beidseitig in einem Reservoir mit 10x SSC-Puffer endete. Auf das Gel wurde die Nylonmembran (Hybond N, Amersham), und darauf eine doppelte Lage auf Gelgröße geschnittene, in Blotpuffer äquilibrierte 3MM-Filterpapiere luftblasenfrei gelegt. Das Gel wurde mit einem Rahmen Kunststoffplatten umgeben und mit drei Lagen einer bedeckt, die mit einem etwa 1 kg schweren Stahlblock beschwert wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht für ca. 18 Stunden. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen, für 10min. bei 80°C getrocknet und anschließend für 75 Sekunden auf dem UV-Leuchttisch bestrahlt, um eine Kreuzvernetzung der RNA mit der Membran zu erreichen. Die Membran wurde anschließend lose in Klarsichtfolie eingepackt und bei 4°C gelagert.

3.6.12.a radioaktive Markierung von DNA-Sonden für den Northern Blot

Material

doppelsträngige DNA-Sonde

Gemisch aus DNA-Hexameren p(N)₆, 2µg/µl (Pharmacia),

Klenow Polymerase 10U/µl (MBI Fermentas)

10x Klenow Puffer (MBI Fermentas)

10x Nukleotid-Mix d(A,T,G)TP (0,5mmol/l pro Nukleotid

α³²P-dCTP, 10µCi/µl und >3000Ci/mmol (ICN)

Micro-Spin S-200 HR Columns (Amersham)

TE-Puffer, pH 7,6

0,5mmol/l EDTA (Sigma)

Methode

100ng der Sonde und 2µg der Hexamer wurden in einem 12,5µl-Ansatz 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dann auf Eis abgeschreckt. Dann wurde der Ansatz mit 12,5µl eines Markierungs-Mixes (2,5µl 10x Klenow-Puffer, 2,5µl Nukleotid-Mix, 1µl Klenow-Polymerasen 5µCi radioaktives dCTP, Wasser ad 12,5µl) gemischt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100µl TE-Puffer und 1µl EDTA gestoppt. Nicht eingebaute Radioaktivität und Hexamer-DNA wurde mit Micro-Spin-Säulchen abgetrennt. Die Einbau-Effizienz wurde durch Aktivitätsmessung vor

und nach der Aufreinigung abgeschätzt. Die markierte Sonde wurde für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und gleich zur Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

3.6.12.b Hybridisierung von Northern Blots

Material

20x SSC

20x SSPE

50x Denhardts Lösung(1%Ficoll Typ 400, 1% BSA, 1% Polyvinylpyrrolidon)

Formamid

gescherte Heringssperma-DNA 1mg/ml (Gibco)

50% Dextransulfat-Lösung

20% SDS-Lösung

Methode

Northernblots wurden für mind. 1h bei 42°C in 10ml Prähybridisierungslösung (5ml Formamid, 2,5ml 20x SSPE, 1ml 50x Denhardts Lösung, 250µl 20% SDS-Lösung, 200µl Heringssperma DNA, 1ml 50% Dextransulfat-Lösung) inkubiert. Die markierten, denaturierten Sonden wurden dazugegeben und über Nacht hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal kurz mit 2x SSC-Puffer und einmal für 15 Minuten mit 1x SSC +0,1% SDS-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Dann erfolgte ein Waschschrutt für 15 Minuten bei 42°C mit 0,2% SSC +0,1% SDS-Puffer. Die Membran wurde in Klarsichtfolie gepackt und mit einem Röntgenfilm exponiert bei -80°C.

3.6.13 Reverse Transkription

Material

MMLV-Reverse Transkriptase, 200U/µl (Gibco BRL)

5x MMLV-Reverse Transkriptase Puffer

Gemisch aus DNA-Hexameren p(N)₆, 200ng/µl (Pharmacia),

dNTP-Mix, 10mM pro Nukleotid (Roche)

0,1mol/l DTT (Gibco BRL)

Methode

Bei der reversen Transkription werden von RNA-Transkripten ausgehend die koplementären DNA-Stränge synthetisiert, die anschließend z.B. durch PCR amplifiziert werden können. Mit dieser Methode wurden die Northern Blot Sonden für cox2-, mcp-3-, und slipi-mRNA hergestellt.

Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben in einem 20µl Ansatz mit 0,1-2µg Gesamt-RNA als Vorlage.

für eine PCR-Amplifikation wurden 1-3µl des Reverse-Transkriptionsansatzes als Vorlage in einem 50µl-PCR Ansatz verwendet.

3.7 Zellkulturmethoden

3.7.1 Allgemein

Die verwendeten Zelllinien sind adhärent und wurden in 25 oder 75 mm² Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und einer wassergesättigten Atmosphäre in Vollmedium kultiviert.

Material

DMEM-Vollmedium mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco BRL)
10x Trypsin-EDTA Lösung (Gibco BRL)
PBS für die Zellkultur (Gibco BRL)
Plastikwaren für die Zellkultur (Nunc)

Zelllinien

HEK293IL-1R: adenovirustransformierte embryonale Nierenzelle (human), Dr. K. Matsumoto, Nagayo Japan
HeLa: (humane epitheloide Cervix-Carcinoma Zelllinie), DSZM Braunschweig
NIH3T3: murine Fibroblasten; Dr. D. Wirth, GBF, Braunschweig
GP+E86: Verpackungszelllinie zur Herstellung von Retroviren mit ecotropen Wirtsspektrum, murine Fibroblasten

Alle Zellen wurden in DMEM-Vollmedium mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Passage der adhären Zellen erfolgte alle 3-4 Tage, sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten. Dazu wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit 2x mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung solange inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Der Suspension wurde neues Komplettmedium zugefügt und die Zellen in der gewünschten Verdünnung wieder ausgesät. Typische Verdünnungsraten zum Erhalt der einzelnen Linien waren:

HEK293IL-1R	1:10
HeLa	1:10
NIH3T3	1:6
GP+E86	1:8

3.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Material

FKS
DMSO (Sigma)
Kryoröhrchen (Nunc)

Methode

Zum Einfrieren wurden die mit Medium abgelösten Zellen bei 300x g für 5 Minuten bei RT sedimentiert. Danach wurde das Zellpellet in 500 µl DMEM (mit 40 % (v/v) FKS resuspendiert und in Eis auf 0°C gekühlt. In ein Kryoröhrchen wurden 500 µl DMEM (20 % (v/v) DMSO) vorgelegt und die resuspendierte Zellsuspension dazu pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten Nalgene-Cryo Freezing Container über Nacht in einem -80°C Tiefkühlschrank gestellt und zur längeren Lagerung in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde aus dem Dewargefäß ein Kryoröhrchen entnommen, schnell aufgetaut und in 10 ml Medium überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 Minuten, 300x g, RT), um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, und die Zellen wurden im Brutschrank weiter kultiviert.

Das Einfriermedium für NIH3T3-Zellen bestand aus 40% DMEM, 50% FKS und 10% DMSO. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für einen Tag in DMEM-Vollmedium mit 20% FKS kultiviert.

3.7.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Methode

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt, indem die Zellsuspension 1+1 mit Trypanblau (0,8 % (v/v) in PBS) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage Trypanblau aktiv auszuschleiden, während tote oder geschädigte Zellen dazu nicht in der Lage sind und blau gefärbt werden. Für die Bestimmung der Zellzahl gilt die Formel: $\text{Zellzahl} / \text{ml} = \text{ausgezählte Zellen} / \text{Großquadrat} \times 2 \times 10^4$

3.7.4 Transfektion von Zellen

HEBS (2 x)

2M CaCl₂ (Gibco BRL)

HeLa-Schock-Medium (10% Glycerin in DMEM-Medium)

Methode

Je nach Versuch und Zelllinie wurden $1-5 \times 10^5$ Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte am Vortag ausgesät. In jedes Loch wurden 225µl 2 x HEBS, 250µl H₂O und 20µl einer DNA-Verdünnung (1 – 10 µg) zusammenpipettiert und gemischt. Nach vorsichtiger Zugabe von 31,5 µl einer kalten 2 M CaCl₂-Lsg. bildeten sich Präzipitate. Die Suspension wurde auf die Zellen pipettiert und diese dann 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zum Entfernen der Präzipitate wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und erhielten anschließend 2 ml frisches Medium. Zellmenge und die Menge des Transfektionsansatzes wurde entsprechend der Wachstumsfläche verändert. Für Transfektionen in T75-Flaschen in HeLa- und HEK293IL-1R-Zellen wurden standardmäßig 30×10^5 Zellen in 15ml Medium ausgesät. Zur Transfektion wurden 37,5µg DNA insgesamt eingesetzt. HeLa-Zellen wurden nach 5 Stunden für drei Minuten mit Schock-Medium behandelt, zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Medium weiter kultiviert.

Außerdem wurden HEK293IL-1R Zellen mit dem kationischen Transfektionsreagenz Rotifect (Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben transfiziert

3.7.5 Herstellung von stabil transfizierten retroviralen Verpackungslinien

Material

retrovirale Plasmide

siehe „Transfektion von Zellen

Verpackungslinie GP+E86

Geneticin (G418-Sulphat), 500mg/ml; (PAA Laboratories GmbH)

Methode

Zur Herstellung von stabil infizierten Verpackungslinien wurden am Vortag 1×10^5 Zellen in 5ml Vollmedium in einer T25-Flasche ausgesät. am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2,5ml frischem Medium bedeckt und mit 5µg Plasmid-DNA in einem 500µl-Ansatz (25µl CaCl₂, 250µl 2x HEBS, H₂O ad 500µl) transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt und nach weiteren 24h wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Die Selektion der Plasmid-kodierten Neomycin-Phosphotransferase-Aktivität der pM5XNEO-Plasmide erfolgte für mindestens zwei Wochen mit 1mg/ml Geneticin. Dabei musste darauf geachtet werden, dass es während der Selektion nicht zu einer Konfluenz der Zellen kam.

3.7.6 Herstellung von stabil infizierten NIH3T3-Zellen

Material

Sterilfilter für Spritzen (0,45µm)
Polybren-Lösung in PBS(4mg/ml)

Methode

Virusproduzierende Zellen wurden zwei Tage vor der Infektion so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion konfluent waren. Am nächsten Tag wurden 1×10^5 Zellen der zu infizierenden NIH3T3-Linie in T25-Flaschen ausgesät. Am Tag darauf wurde zur Infektion der Überstand der viruproduzierenden Zellen mit Polybren vermischt (final 8µg/ml), durch einen Sterilfilter (0,45µm) zum Abtrennen von zellulären Partikeln filtriert und mit polybrenhaltigem Medium (8µg/ml) in geeigneten Verdünnungen vermischt. Polybren erhöht die Infektionseffizienz durch verbesserte Virusaufnahme der Zellen. Nach 24-48 Stunden wurde das Medium gegen Genitacin-haltiges Selektionsmedium ausgetauscht. Die Selektion erfolgt wie für die Verpackungslinien beschrieben.

3.7.7 Bestimmung des Virus-Titers der Verpackungslinien

Material

wie bei „Herstellung von stabil infizierten Linien“

Methode

Zur Bestimmung des Virus-Titers von virusproduzierenden Zellen wurden in 24-Lochplatten jeweils 5000 NIH3T3-Zellen in 1ml Medium ausgesät. Das erste Loch wurde mit 111µl des virushaltigen Überstandes wie beschrieben infiziert. Die folgenden Zellen einer Reihe wurden in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 infiziert, indem von Loch zu Loch 111µl des gut gemischten Überstandes weitergegeben wurden. Die Zellen wurden wie beschrieben selektiert, bis sich bei den größeren Verdünnungen einzelne Kolonien herausgebildet hatten, die jede auf ein Infektionsereignis zurückführbar war. Die Zellen wurden nach der Kristallviolett-Methode gefärbt und die Kolonien gezählt. Der Titer wurde anhand des Verdünnungsfaktors kalkuliert.

3.7.8 Kristallviolettffärbung

Material

1% Glutaraldehyd in PBS
0,1% Kristallviolett in Natriumacetat-Lösung (200mmol/l, pH4,1)

Methode

Die Zellen werden mit der Glutaraldehyd-Lösung bedeckt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerüttelt. Die Platte wurde fünfmal in destilliertes Wasser getaucht und vollständig getrocknet (ca. 30 min, Trockenschrank 80°C). Anschließend wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung bedeckt, für 20 Minuten gerüttelt und gewaschen, bis ungebundenes Kristallviolett entfernt war. Anschließend wurde die Zahl der Kolonien durch Auszählen bestimmt.

3.7.9 Zellfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342

Material

Farbstoff Hoechst 33342, 10mg/ml in DMSO (Sigma)

Methode

Zur Anfärbung von Zellen und des Chromatins von Zellen wurde die Farbstoff-Stammlösung mit einer Verdünnung von 1:1000 zu dem Medium dazugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit einem geeigneten Filter fluoreszenzmikroskopisch beobachtet.

3.7.10 Zytotoxizitäts-Versuch mit Neutralrotfärbung

Material

TNF α -Standardlösung, 3100ng/ml

Fas-Ligand-Standardlösung, 2x Standardlösung (Prof. David Wallach, Israel)

Cycloheximid-Standardlösung, 1mg/ml (Sigma)

Neutralrot-Standardlösung, 10mg/ml in PBS

Methano/Sörensen-Citrat-Puffer (75mmol/l Na₃Citrat, 37mmol/l Citronensäure, pH 5,0 mit HCl), 1:1 (v/v)

Methode

Bei diesem Versuch wurden nur vitale Zellen angefärbt, die den Farbstoff Neutralrot aufnehmen können.

Am Vortag wurden 1×10^4 Zellen der von NIH3T3 abgeleiteten Zelllinien pro Loch einer 96-Lochplatte in 100 μ l Vollmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entsprechend der Fragestellung mit Verdünnungsdreihen oder mit gleichen Konzentrationen der apoptotischen Stimuli in einem Zeitverlauf-Experiment stimuliert. Als Referenz wurden Zellen für den Versuchszeitraum im gleichen Volumen an Vollmedium inkubiert oder mit Fas-Ligand(1:2) und Cycloheximid (50 μ g/ml) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand abdekantiert und abtropfen gelassen. Dann wurden in jedes Loch 100 μ l der Neutralrot-Gebrauchslösung pipettiert und für 1h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abdekantiert und gut abtropfen gelassen. Die Platten wurden einmal bis zweimal in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, so daß der überschüssige Farbstoff entfernt wurde und anschließend komplett abtropfen gelassen. Anschließend wurden in jedes Loch 150 μ l Methano/Sörensen-Puffer pipettiert um den Farbstoff aus den Zellen in Lösung zu bringen. Die Absorptionmessung erfolgte bei 550nm auf einem *ELISA-Reader*.

3.7.11 Reporter-genversuche

Material

Luziferase-Reagenz

(Luziferin von AppliChem)

β -Gal.-Reaktionspuffer, (Clontech)

Lysate der entsprechenden Zellen

Methode

Durch die Transfektion von plasmid-kodierten Reporter-genen, die unter der Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors oder Promotorabschnittes stehen, lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivierung des Promotors ziehen. Als Reporter-gen wurde das Luziferase-gen verwendet. Die Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch mit CoA den Farbstoff Luziferin um, wobei es durch Chemilumineszenz zur Aussendung von Licht kommt. Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte immer als Doppelwert. Dazu wurden 20 μ l Lysat in einem Meßröhrchen vorgelegt und in das Luminometer gestellt. Nach Zugabe von 100 μ l des Luziferase-Reagenzes durch das Gerät erfolgte 5 Sekunden später die Messung der Chemilumineszenz für 10 Sekunden.

Es wurden drei verschiedene Reporter-genplasmide verwendet. Bei dem Plasmid pNF-kB₃-Luc wurde die Expression von Luziferase durch einen Promotor mit einer

dreifachen Konsensus-Bindungsstelle für den dimeren Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert. Mit diesem Konstrukt kann die IKK-abhängige und –unabhängige Aktivierung von NF- κ B gemessen werden.

Bei dem Plasmid pUHD133-IL-8-Promotor-Luc-wt wird das Reportergen von einem minimalen humanen IL-8 Promotor kontrolliert, der unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B besitzt.

Das Reporterplasmid p(GAL4)2-Luc besitzt Bindungsstellen für die DNA-bindende Domäne des Hefe-Transkriptionsaktivators GAL4, von dem in höheren eukaryotischen Zellen keine Bindungspartner bekannt sind. Bei Expression von Fusionsproteinen aus Transkriptionsfaktoren und der DNA-bindenden GAL4-Domäne ist es daher prinzipiell möglich, durch den Reportergenversuch das transaktivierende Potential der dieses Fusionsproteines zu messen.

β -Gal.-Reportergenversuch

Da die Transfektionseffizienz einen Einfluß auf die Messwerte aus Reportergenversuchen hat, wurde ein zweites konstitutiv exprimiertes Reportergen zu Normalisierung kotransfiziert. Dazu wurde das Plasmid pSV β -Gal verwendet, bei dem das β -Galactosidasegen unter der Kontrolle eines SV40 Promotors exprimiert wird. Die β -Galactosidaseaktivität wurde ebenfalls durch Messung der Chemilumineszenz eines umgesetzten Substrates bestimmt. Dazu wurden in einem Mikrozentrifugenröhrchen 15 μ l Lysat 1h bei 50°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und wieder auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Messung wurden 5 μ l-Aliquots in ein Luminatorröhrchen pipettiert und mit 50 μ l β -Gal.-Puffer für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgt für 10sec.

3.8 Proteinbiochemische Methoden

3.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Material

BSA(*Bovine Serum Albumin*) Eichreihe, $c_{\text{Protein}} = 0-35\text{mg/ml}$ in PBS Puffer

Farbstoffkonzentrat Roti Quant (Firma Roth GmbH), 1:2,5 in PBS Puffer

PBS-Puffer

Methode

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm auf 595nm. Die Farbintensität ist abhängig vom Gehalt an basischen Proteinen. Das Reagenz wurde aus einer Mischung von dem Farbstoffkonzentrat Roti Quant (40%v/v) und ddH₂O (60%v/v) hergestellt.

In einer 96-Loch-Platte wurden 100 μ l der zu messenden Probe und der BSA-Eichreihenlösung als Dreifachwerte vorgelegt und mit 100 μ l der Farbstofflösung versetzt. Nach ca. 5min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 595nm in einem *Elisa Reader*. Die Konzentration der Probe wird anhand der Eichreihe bestimmt.

3.8.2 SDS-PAGE

Material

Trenngelpuffer

Sammelgelpuffer

10x Elektrophoresepuffer

Auftragspuffer
 30% Acrylamid/Bisacrylamidlösung 29:1 (Roth)
Low molecular weight marker (LMW), (Amersham)
 2% SDS Standardlösung
 TEMED
 40% APS Standardlösung
 Gradientenmischer

Methode

Das Trennverfahren ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Denaturierte Proteine bilden mit SDS einen negativen Ladungskomplex, der im elektrischen Feld zur Anode wandert. Der Vernetzungsgrad des Acrylamid-Gels bestimmt die Trennleistung, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine umgekehrt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse ist.

Pipettierschema für Lämmli-Gele		
	Trenngel (10%PAA)[μ l]	Sammelgel (5% PAA)[μ l]
bidest.	2740	3255
Puffer pH 8,8	4600	0
Puffer pH 6,8	0	630
AA/BA 30%	4000	840
SDS 2%	600	250
APS 40%	36	15
TEMED	24	10
	Σ 12000	Σ 5000

Zum Herstellen der Gele wurde das in der oben abgebildeten Tabelle gezeigte allgemeine Pipettierschema verwendet. Die Konzentration der Trenngele wurde durch Variation der Menge der Acrylamid-Stammlösung variiert. In einem Gelgießstand wurde zuerst das Trenngel mit einer Konzentration von 7,5-15%; je nach Versuch; gegossen. Bei Herstellung eines Gradientengeles wurden zwei verschieden konzentrierte Lösungen vorbereitet und mit Hilfe eines Gradientenmischers mit von unten nach oben abnehmender Konzentration gegossen. Nach dem Auspolymerisieren erfolgte dann die Herstellung des 5 %-igen Sammelgels mit den Probenaschen. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Lämmli-Auftragspuffer versetzt, 5 min. bei 95°C denaturiert, abzentrifugiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke, abhängig von den verwendeten Gelen.

Gele mit 10 cm Trennstrecke: 35 mA pro Gel

Gele mit 18 cm Trennstrecke: 50 mA pro Gel

Nach der Elektrophorese wurden die Gele je nach Anwendung mit Coomassie gefärbt, im Western Blot verwendet oder getrocknet.

3.8.3 Coomassie Färbung von Gelen

Material

Coomassie färbelösung

Entfärbelösung

Methode

Das Anfärben und Fixieren der Proteinbanden erfolgte mit einer Coomassie-Lösung. Hierzu wurden die SDS-Polyacrylamidgele für 30min. bei Raumtemperatur mit der

Färbelösung inkubiert. Da der Farbstoff das gesamte Gel zunächst auch unspezifisch färbt, wurden die Gele anschließend mit Entfärbelösung für mind. 2 h inkubiert, bis nur noch die gefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Anschließend wurden die Gele auf dem Gelrockner bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

3.8.4 Western Blot

Material

10x Blotpuffer
Blotting-Papiere, 1,2mm Dicke, (Schleicher und Schuell)
Methanol
PVDF-Membran (Millipore)
Coomassie-Färbelösung
Entfärbelösung für Western Blot

Methode

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im *semi dry* Western-Blot Verfahren. Dazu wurde auf das Gel eine nach Herstellerangaben vorher aktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei gelegt und von oben und unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier luftblasenfrei eingepackt, das zuvor in 1x Puffer mit 20% Methanol gut getränkt wurde. Die Elektrophorese erfolgte für 2h bei 0,75mA/cm².

Anschließend wurde der Transfer überprüft, in dem die Membran für eine Minute in Coomassie-Lösung gefärbt und der Hintergrund mit Entfärbelösung entfärbt wurde. Nach Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit 100% Methanol vollständig entfärbt und in TBST-Puffer gequollen.

3.8.5 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot

Material

Blockpuffer (5% Magermilch in TBST)
Primärantikörper
HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (Amersham)

Methode

Zur antikörpervermittelten Detektion wurde die Membran in 5% (in TBS-Puffer) Magermilchpulver 1h unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Die Membran wurde mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in 5% Magermilch für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Membran viermal in TBST-Puffer gewaschen und mit einer Verdünnung des zweiten HRP-Antikörpers in 5% Magermilch für 1-2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert und erneut viermal mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte anhand der Chemilumineszenz, die durch die Enzym-Substrat Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz entstand, nach den Angaben des Herstellers.

3.8.6 Herstellung von Lysaten

Die Herstellung von Lysaten aus den zu untersuchenden Zellen erfolgte, um bestimmte biochemische Fragestellungen zu beantworten. Je nach Fragestellung wurde die Art der Lyse verändert. Allgemein wurden Lysate immer in der Kälte hergestellt, um enzymatische Aktivitäten oder Protein-Protein Interaktionen zu erhalten. Die Herstellung von denaturierenden Lysaten dagegen erfolgten bei Raumtemperatur.

Bei allen nicht-denaturierenden Herstellungsmethoden wurden die Zellen mit kaltem PBS zweimal gewaschen, bei 300x g und 4°C pelletiert und in einem geeigneten Volu-

men Lysepuffer aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis lysiert, wobei die Probe zwischendurch kurz heftig geschüttelt wurde. Anschließend wurde das Lysat in einer Tisch-Kühlzentrifuge für 15 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand in dem sich die cytosolischen Proteine und membranöse Fragmente befinden wurde zur Untersuchung eingesetzt. Eine Ausnahme bildete die Prozedur zur Herstellung von Lysaten für EMSA-Experimente, die weiter unten beschrieben wird.

Die Herstellung der Lysate unterschied sich durch die Puffer und Inhibitoren

Herstellung von Lysaten für Reportergenversuche

Material

Zellen aus 6-Lochplatten

beta-Gal Lysepuffer (4,25ml PufferA, 45,75ml PufferB, 200µl Triton X-100, ddH₂O ad 100ml)

PufferA (200mM KH₂PO₄)

PufferB (200mM K₂HPO₄)

Proteinaseinhibitoren final

1 µmol/l Pepstatin

2,5 µg/ml Leupeptin

0,5 mmol/l PMSF

Methode

Die Zellen aus einer 6-Lochplatte werden geerntet und in 100µl Lysepuffer lysiert.

Herstellung von Lysaten zur Immunpräzipitation von JNK- oder p38-MAPK

Material

Zellen aus 6-Lochplatten

4x Lyse- und IP-Puffer:

40mmol/l Tris pH 7,05

120mmol/l Na₄O₇P₂

200mmol/l NaCl

4% TritonX-100 (v/v)

8mmol/l Na₃VO₄

200mmol/l NaF

80mmol/l β-Glycerophosphat

zusätzliche Inhibitoren frisch dazu:

0,5mmol/l PMSF

0,5 µg/ml Leupeptin

1 µmol/l Pepstatin

10mmol/l PNPP

400nmol/l Okadainsäure

Methode

Standardmäßig wurden die Zellen der NIH3T3-Linien aus zwei bis drei Löchern einer 6-Lochplatte in 100µl Lysepuffer lysiert.

Herstellung von Lysaten zur Detektion von Caspase 3/Caspase 8 Aktivierung

Material

Zellen aus konfluenten T25-Flaschen

Lysepuffer:

50mmol/l Tris pH 7,2-7,5

250mmol/l NaCl

5mmol/l EDTA

1%(v/v) NP40)
zusätzliche Inhibitoren frisch dazu:
0,5mmol/l PMSF
0,5µg/ml Leupeptin
1µmol/l Pepstatin
10mmol/l PNPP
400nmol/l Okadainsäure

Methode

Zur Detektion von Caspase-Aktivierung wurden Zellen entsprechend einem Verhältnis von 10^8 Zellen/ 5ml Lysepuffer lysiert.

Herstellung von Lysaten zur Immunopräzipitation von überexprimierter TAK1

Material

Zellen aus konfluenten, transfizierten T75-Flaschen

Lysepuffer

20mmol/l HEPES pH 7,4
150mmol/l NaCl
1,5mmol/l MgCl₂
2mmol/l EGTA,
10mmol/l NaF
2mmol/l DTT
1mmol/l Na₃VO₄
1mmol/l PMSF
0,5% TritonX-100

Methode

Die Zellen aus je einer konfluenten T75-Flasche wurden in 300-400µl Lysepuffer lysiert.

Herstellung von Lysaten zur Immunopräzipitation endogener TAK1

Material

Zellen aus konfluenten T75 Flaschen

Lysepuffer

10mmol/l HEPES pH 7,4
150mmol/l NaCl
2mmol/ EGTA
0,5% TritonX-100
1mmol/l PMSF
2,1µg/ml Aprotinin
8µmol/l MG132
250ng/ml Ubiquitinaldehyd

Methode

Die Zellen aus je einer konfluenten T75-Flasche wurden in 800µl Puffer lysiert wie beschrieben.

Herstellung von nukleären Extrakten für EMSA-Experimente

Bei dieser Zellaufarbeitung wurden die Zellen milde aufgeschlossen, um die Zellkerne möglichst intakt zu lassen. Die Kernfraktion wurde dann separat lysiert, um die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B in dieser Fraktion in einem EMSA-Experiment zu untersuchen.

Material

4x PufferI Standardlösung

40mmol/l Hepes pH7,9,
40mmol/l KCl,
6mmol/l MgCl₂,
1,2mmol/l Na₃VO₄,
80mmol/l beta-Glycerophosphat

4x PufferII Standardlösung

80 mmol/l HEPES pH7,9
1.68 mmol/l NaCl
6mmol/l MgCl₂
0.8 mmol/l EDTA
1.2 mmol/l Na₃VO₄,
80 mmol/l β-Glycerophosphat

Puffer A

1x PufferI
10μmol/l E64
2,5μg/ml Leupeptin
0,3mmol/l PMSF
1μmol/l Pepstatin
5mmol/l DTT
400nmol/l Okadainsäure

PufferA mit 0,1% NP-40

Puffer B

1x PufferII
10μmol/l E64
2,5μg/ml Leupeptin
0,3mmol/l PMSF
1μmol/l Pepstatin
5mmol/l DTT
400nmol/l Okadainsäure
25% Glycerol

Methode

Zellen aus einer konfluenten T75-Flasche wurden in kaltem PBS gewaschen und bei 300x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 150μl PufferA resuspendiert und für 5 Minuten bei 4°C und 10.000x g pelletiert. Das Pellet wurde in 150μl PufferA mit 0,1% NP-40 resuspendiert, stark geschüttelt und für 10 Minuten auf Eis gelassen. Das Lysat wurde erneut zentrifugiert (5 Minuten, 10.000x g, 4°C). Der Überstand, in dem u.a. die cytosolischen Proteine vorhanden sind wurde abgenommen und bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde in 60μl PufferB resuspendiert, für eine Stunde auf Eis gelassen und ab und zu stark geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 10.000x g, 4°C) wurde der Überstand als nukleäres Extrakt verwendet.

Herstellung von Direktlysaten

Material

Zellen aus 6-Loch oder 24-Lochplatten

Lysepuffer

62,5mmol/l Tris pH 6,8
2% SDS(w/v)

10% Glycerol
50mmol/l DTT,
0,01% Bromphenol-Blau

Methode

Die Zellen aus dem Loch einer 6-Lochplatte wurden mit kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Dann wurden die Zellen aus einem Loch einer 6-Lochplatte in 100µl Direktlysepuffer direkt von der Platte abgekratzt und auf Eis gestellt. Alle Proben wurden gleichzeitig für 5-10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Aliquots von 50µl wurden zur Untersuchung im Western Blot eingesetzt. Das Volumen des Direktlysepuffers wurde proportional zur Fläche der Zellkulturgefäße variiert.

Herstellung von denaturierten Lysaten zur Ni-NTA-Agarose Präzipitation von His-Epitop-fusionierten Proteinen

Material

Zellen aus konfluenten T75-Flaschen
Lysepuffer

6mol/ Guanidiniumchlorid
0,1mol/l NaH₂PO₄
0,01mol/l Tris pH 8,0

Methode

Bei dieser Lyse wurden Zellen direkt in einem stark denaturierenden Puffer aufgeschlossen, der keine Protein-Protein Interaktion mehr erlaubt. Es wurden die Zellen einer konfluenten T75-Flasche in 1ml Lysispuffer direkt in den Zellkulturgefäßen lysiert oder ein Aliquot der PBS gewaschenen Zellsuspension. Die Lysate wurden auf Eis ca. 1 min. z sonifiziert, bis die DNA gesichert war. Die Lysate wurden kurz zentrifugiert und der Überstand wurde weiterverwendet. Falls alle Zellen direkt lysiert wurden, wurde ein Aliquot von 100µl zur TCA-Präzipitation abgenommen. Der Rest wurde zur Präzipitation der His-Epitop fusionierten Proteine mit Ni-NTA-Agarose eingesetzt.

3.8.7 TCA-Präzipitation

Material

100% TCA (Trichloressigsäure)

Methode

Diese Präzipitation wurde verwendet, um Proteine aus den Lysaten zur Ni-NTA-Agarose Präzipitation zu fällen und im Western Blot die Expression kontrollieren zu können. Die Lysate wurden dazu mit 1/10 Volumen der TCA gemischt und für ca. 15 Minuten auf Eis gestellt, bis sich ein massiver weißer Niederschlag gebildet hatte. Die Proben wurden in einer Tischzentrifuge für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und mit 200µl eisaltem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer Speed-Vac getrocknet. Das Pellet wurde in 100µl 1x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert und aufgekocht.

3.8.8 In vitro Kinaseversuch mit immunpräzipitierter, endogener JNK- oder p38-MAPK

Material

ProteinA-Sepharose; ProteinG-Sepharose
IP-Puffer

20mmol/l Tris, pH 7,4

154mmol/l NaCl
50mmol/l NaF
1mmol/l Na₃VO₄
1% (v/v) Triton X-100

ATP-Puffer

(150mmol/l Tris, pH 7,4, 30mmol/l MgCl₂)

Kinase-Mix

(10µl ATP-Puffer mit 60µmol/l ATP und 4µCi ³²P-ATP pro Probe)

<u>präzipitierte Kinase</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Substrat</u>
JNK2	SAK9	GST-Jun(1-135)
JNK1	anti-JNK1	GST-Jun(1-135)
p38	SAK7	His-MAPKAP2

Methode

Ein 250 µg – 1 mg Protein entsprechendes Volumen wie beschrieben hergestellten Ly-sate wurden ad 500 µl mit IP-Puffer versetzt. Dazu fügte man einen entsprechenden Antikörper (1 µg, wenn nicht anders angegeben) und inkubierte den Ansatz bei 4 °C für mindestens 2 h bei 4°C unter ständigem Rotieren. Mit Hilfe der verwendeten Antikörper wurden die Proteine, deren Aktivität untersucht werden sollte, aus dem Ansatz entfernt. Die Antikörper wurden anschließend durch Inkubation mit Protein A- oder G-Sepharose für mindestens 1 h bei 4 °C unter ständigem Rotieren aus dem Ansatz entfernt. Die Sepharose-Kügelchen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (13 000 UpM, 3 min, 4°C) und dreimal mit 500 µl IP-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde zu den Sepharose-Kügelchen 10 µl IP-Puffer pipettiert und dies in die Kinase Reaktion eingesetzt. Für die Reaktion wurden 10µl Immunpräzipitat, 10µl Substrat in Wasser und 10µl Kinase-Mix für 30 Minuten bei 30°C inkubiert.. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 4fach Lämmli-Auftragspuffer und Inkubation bei 95°C für 5 min gestoppt. Die Proben wurden auf einem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung und Trocknung des Geles wurden die Reaktionsprodukte durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.8.9 *In vitro* Kinaseversuch mit immunpräzipitierter, überexprimierter TAK1

Material

ProteinG-Sepharose

Waschpuffer

(20mmol/l HEPES pH 7,4, 500mmol/l NaCl, 10mmol/l MgCl₂)

5x Kinasepuffer

(100mmol/l Tris pH 7,5, 50mmol/l MgCl₂,)

Antikörper

anti-TAK1, anti-GFP oder anti-Ha

Reaktions-Mix pro Probe

(8µl 5x Kinasepuffer mit 500µmol/l ATP, 2µl (ca. 2µg) rekombinates His-MKK6,
5µCi ³²P-γ-ATP, Wasser ad 15µl)

Methode

Bei sehr gleichmäßig gewachsenen Zellen in allen Proben wurden ein gleiches Volumen, ansonsten nach Proteinbestimmung die gleiche Proteinmenge von allen Proben zur IP eingesetzt. Dazu wurde pro Probe 1µg Antikörper an 20µl ProteinG-Sepharose in Lysepuffer für 1h bei 4°C gekoppelt. Danach wurden die überexprimierten TAK1-

Fusionsproteine mit den entsprechenden Aliquots des Antikörper-ProteinG-Sepharose Komplexes aus den Lysaten für 2h bei 4°C präzipitiert. Die Präzipitate wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und in 35µl 1x Kinasepuffer aufgenommen. Für den *in vitro* Kinaseversuch wurden 5µl des Präzipitates in 20µl Lysepuffer vorgelegt und mit 15µl Reaktionsmix für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden mit 10µl 4x Lämmli-Auftragspuffer für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. die Reaktionsprodukte wurden elektrophoretisch auf einem Lämmli-Gel aufgetrennt, gefärbt, getrocknet und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.8.10 Immunpräzipitation endogener TAK1

Material

anti TAK1 Antikörper
Lysate aus T75 Flaschen

Methode

Zur Immunpräzipitation endogener TAK1 und zur Untersuchung ihrer Ubiquitylierung wurden die Lysate wie beschrieben aus den Zellen konfluenten T75-Flaschen hergestellt und mit 2µg anti-TAK1 Antikörper für 3h bei 4°C inkubiert. 50µl Aliquots der Lysate wurden eingefroren zur Western Blot Analyse. Anschließend wurden die Proben mit 25µl pro Probe ProteinG-Sepharose für 1h bei 4°C inkubiert. Die Präzipitate wurden dreimal mit Lysepuffer ohne Inhibitoren gewaschen und in 100µl 1x Lämmli-Auftragspuffer aufgeköcht. Aliquots dieser Proben wurden zur Western-Blot Analyse eingesetzt.

3.8.11 Denaturierende Präzipitation His-Epitop fusionierter Proteine

Material

Ni-NTA-Agarose (Qiagen)
Waschpuffer A

(8mol/l Harnstoff, 0,1mol/l NaH₂PO₄, 0,01mol/l Tris, pH 8,0 mit NaOH eingestellt)

waschpuffer B

(8mol/l Harnstoff, 0,1mol/l NaH₂PO₄, 0,01mol/l Tris, pH 6,2 mit NaOH eingestellt)

Methode

Mit dieser Methode können His-Epitop fusionierte Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden. Sie wurde verwendet, um bei Koexpression der zu untersuchenden Proteine mit His-Ubiquitin die Ubiquitylierung dieser Proteine anhand der Aufreinigung über den His-Fusionsanteil nachzuweisen. Dazu wurden 30 x 10⁵ Zellen pro T75-Flasche mit insgesamt 37,5µg DNA transfiziert. Wichtige Kontrollen waren die Koexpression von His-Ubiquitin oder die Expression der Proteine ohne koexprimiertes Ubiquitin.

Die Lysate wurden wie oben beschrieben hergestellt und mit je 25µl in Lysepuffer voräquilibriumierter Ni-NTA-Agarose pro Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben dreimal in Waschpuffer A und dreimal in Waschpuffer B gewaschen, wobei die Proben bei den Waschschrritten kurz stark geschüttelt wurden und dann für 5 Minuten inkubiert. Nach einem finalen Waschschrritt mit PBS wurden die Proben für 10 Minuten in 80µl 1x Lämmli Auftragspuffer aufgeköcht. Aliquots von 10-50µl wurden im Western-Blot auf die Anwesenheit exprimierten Proteine untersucht.

3.8.12 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) für den Transkriptionsfaktor NF- κ B

Material

10x Hamburg-Puffer:

Substanz		im 10-x-Puffer	in der Reaktion	
Tris, pH 7.5 (1M)	100 μ l	10mM	1mM	
EDTA (0.5M)	200 μ l	10mM	1mM	
Magermilchpulver	50mg	0.5%	0,05%	
NaCl (5M)	1ml	500mM	50mM	
DTT	15.43mg	10mM	1mM	nach Hitzeinaktivierung
Glycerin	5ml	50%	5%	

20 min bei 95°C hitzeinaktivieren, 30 min bei 10,000 g zentrifugieren, Überstand verwenden.

5x EMSA-Puffer

Substanz	im 5-fach Puffer	in der Reaktion
Hepes pH 8,0	50 mM	10 mM
MgCl ₂	25 mM	5 mM
KCl	250 mM	125 mM
Ficoll	10 %	1 %
Bromphenolblau	0,025 %	0,0025 %
Xylencyanol	0,025 %	0,0025 %

Methode

Der EMSA dient der Untersuchung der Bindung von Proteinen an DNA *in vitro*. Das Prinzip des EMSA ist, daß DNA-bindende Proteine oder Fraktionen mit DNA-bindenden Proteinen und radioaktiv markierte Oligodesoxynukleotide miteinander zu inkubiert werden, und diese Komplexe auf einem nativen PAA-Gel als radioaktive Banden mit verminderter elektrophoretischer Mobilität gegenüber den ungebundenen Oligodesoxynukleotiden erscheinen. Zur Verhinderung unspezifischer Bindung von Protein an das markierte Oligonukleotid wird im Überschuss unmarkiertes poly(dIdC) dazugegeben und als Spezifitätskontrolle kann unmarkiertes Oligonukleotid im Überschuß dazugegeben werden. Mit dieser Methode wurde die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den wie oben beschriebenen hergestellten nukleären Fraktionen überprüft.

Markierung und *Annealing* der Oligonukleotide

Material

T4-Polynukleotid-Kinase

10x T4-Polynukleotid-Kinasepuffer

³²P- γ -ATP

Methode

Zu 10 μ l einzelsträngigem Oligonukleotid wurden 3 μ l 10-fach Polynukleotid-Kinasepuffer, 30 μ Ci γ -[³²P]-ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase gegeben und mit Wasser auf 30 μ l aufgefüllt. Die Reaktionsmischung wird 30 min bei 37°C inkubiert. Sense- und Antisense- Oligonukleotid wurden zusammengegeben, für 5 min auf 95°C

erhitzt und zur Bildung des Doppelstranges langsam auf Raumtemperatur abgekühlt gelassen.

Anschließend wird das freie ATP abgetrennt, indem das Gemisch über eine S-200 HR-Gelfiltrationssäule nach Herstellerangaben aufgereinigt wurde.

Je 1 µl der Lösung vor und nach Zentrifugation wurden abgenommen, um die Effizienz der Markierung zu bestimmen. Die Oligonukleotide wurden bei -20°C aufbewahrt.

DNA-Protein-Bindungsreaktion

Für die Reaktion wurde eine Menge radioaktiven Oligonukleotids eingesetzt, die 100.000 cpm entspricht.

Die nukleären Extrakte, 1 µg nicht markiertes poly(dIdC) als Kompetitor-DNA gegen unspezifische DNA-Protein-Komplexe, der Reaktionspuffer (1 µl 10x Hamburg-Puffer oder 2 µl 5x EMSA-Puffer), das markierte Oligodesoxynukleotid sowie je nach Versuchsansatz kompetitive, unmarkierte DNA wurden zusammengegeben und mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Ansätze werden für 30 min bei Raumtemperatur und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1,1 µl 10x DNA-Auftragspuffer dazugegeben.

Elektrophorese

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 5% PAA-Gel mit 0,25% TBE als Laufpuffer

Nach einstündigen Vorlauf bei 220 V wurde das Gel beladen und für 3 h bei 220 V laufen gelassen. Das Gel wurde auf Filterpapier (Firma Whatman, 3MM) getrocknet. Die radioaktiven Komplexe wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.8.13 Herstellung von cytosolischen und mitochondrialen Fraktionen zum Cytochrom C Nachweis

Material

2x Puffer A

40mmol/l Hepes pH7,5

20mmol/l KCl

3mmol/l MgCl₂

2mmol/l EDTA

2mmol/l IEGTA

2mmol/l DTT

0,2mmol/l PMSF

500mM Sucrose

Tris- Puffer

5mmol/l Tris

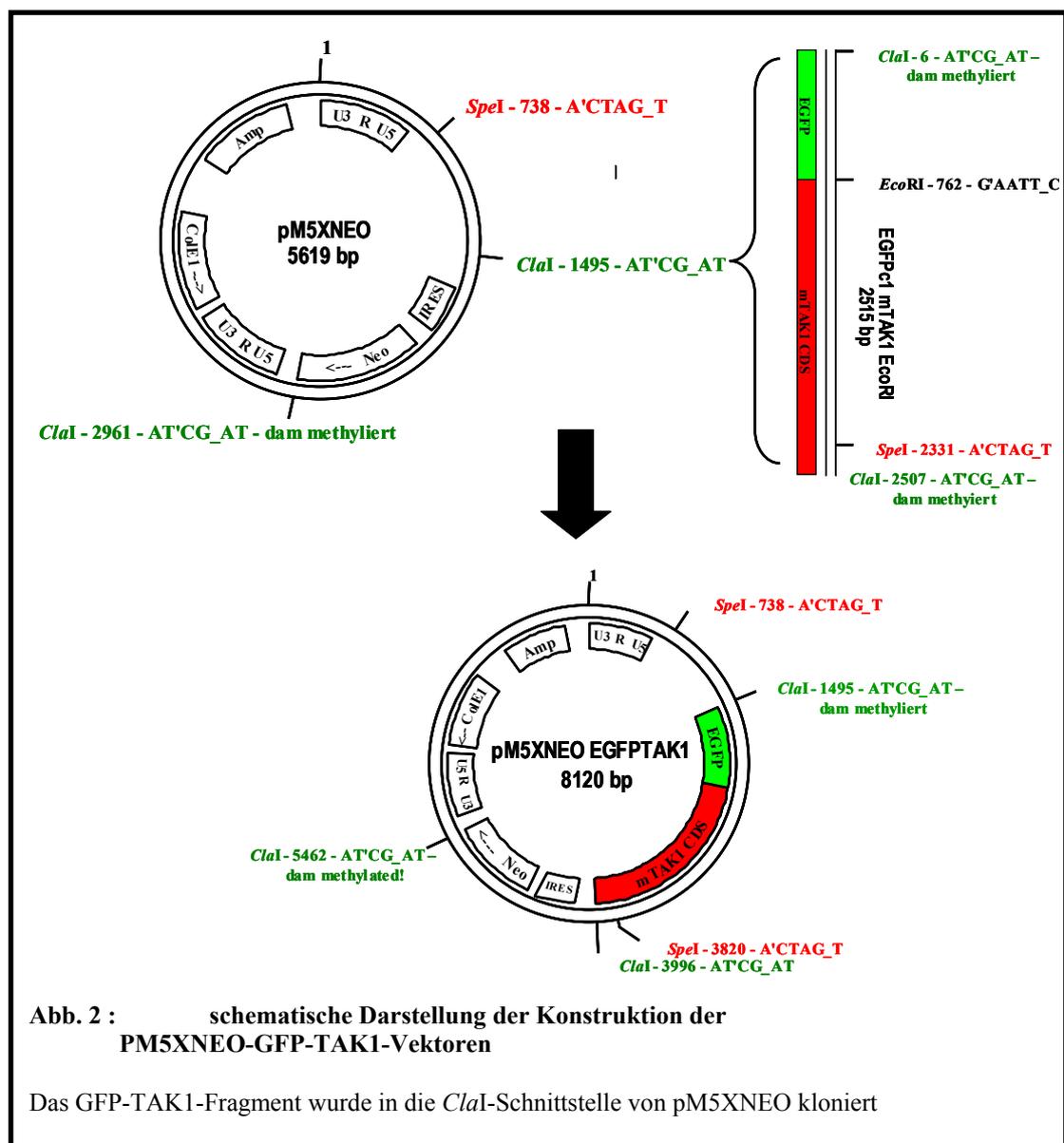
Methode

Zellen der NIH3T3-Linien aus drei T175-Flaschen wurden mit kaltem PBS gewaschen, geerntet und bei 600x g pelletiert. Das Pellet wurde zum Schwellen der Zellen in 400µl Tris-Puffer resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis gelassen und dann mit dem gleichen Volumen an 2x Puffer A aufgefüllt. Die Zellen wurden durch 10 Stöße mit einem Dounce Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 750x g geklärt. Die mitochondriale Fraktion wurde durch weitere Zentrifugation (15 min., 10.000x g) pelletiert, in 30µl Puffer A aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Der Überstand wurde für eine Stunde bei 4°C und 100.000x g zentrifugiert. Der Überstand aus dem letzten Zentrifugationsschritt stellte das cytosolische Lysat dar. Von der mitochondrialen Fraktion wurden 80µg Protein, von der cytosolischen Fraktion 100µg Protein für die Western Blot Analyse eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung von retroviralen Expressionsvektoren für GFP-TAK1wt und GFP-TAK1_{K63W}

Zur Herstellung von retroviralen Expressionsvektoren wurde die cDNA für GFP-TAK1wt bzw. für GFP-TAK1_{K63W} ausgehend von den Vektoren pEGFP-TAK1wt bzw. pEGFP-TAK1_{K63W} durch PCR amplifiziert und in die *Cla*I-Restriktionsschnittstelle des Vektors pM5XNEO kloniert. Das Vorgehen ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



Der Vektor wurde von Frau Dr. Dagmar Wirth, GBF Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Er zeichnet sich im Vergleich zu kommerziell erhältlichen retroviralen Expressionsvektoren durch eine optimierte Verpackungssequenz aus und ergibt daher hohe Virus-Titer.

Die PCR wurde mit 30 Zyklen unter Standardbedingungen mit 240 ng pEGFP-TAK1wt bzw. 120 ng pEGFP-TAK1_{K63W} als *Template* und 2,5 U an *Pfu*-Polymerase pro 50 µl-Ansatz bei einer *Annealing*-Temperatur von 57°C und einer Elongationszeit von fünf Minuten durchgeführt. Die vereinigten PCR-Produkte von je acht Ansätzen wurden nach Phenol-Chloroform Extraktion und Gelelektrophorese mit einer DEAE-Membran aufgereinigt, mit dem Restriktionsenzym *ClaI* geschnitten und erneut nach Phenol-Chloroform Extraktion und Gelelektrophorese über eine DEAE-Membran aufgereinigt. Die Konzentration der Produkte wurde auf einem Agarosegel durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe des DNA-Standards λ x *EcoRI* x *HindIII* für GFP-TAK1wt auf 80 ng/µl und für GFP-TAK1_{K63W} auf 17 ng/µl geschätzt.

Der Vektor pM5XNEO wurde für die Ligation durch einen Restriktionsverdau mit *ClaI* unter Überverdaubedingungen und anschließender Dephosphorylierung mit CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) vorbereitet. Nach Phenol-Chloroform Extraktion und Gelelektrophorese wurde der Vektor mit einer DEAE-Membran aufgereinigt. Die Konzentration des aufgereinigten Vektors von 100 ng/µl wurde photometrisch bestimmt. Zur Ligation wurden jeweils 200 ng des Vektors zusammen mit einem dreifachen molaren Überschuß oder einer äquimolaren Menge an DNA des jeweiligen GFP-TAK1 Fragmentes unter Standardbedingungen inkubiert. Mit verschiedenen Mengen der Ligationsansätze wurden in kompetente Bakterien des *E.coli*-K1-Stammes LK111 transformiert und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Von einzelnen Kolonien der Platten wurden Flüssigkulturen mit 0,3 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium angeimpft und für mindestens sechs Stunden inkubiert. Positive Klone, die das GFP-TAK1-Fragment enthielten, wurden mit der *Quick-Check* Methode identifiziert. Aus neuen Flüssigkulturen von 13 ausgesuchten GFP-TAK1wt-Klonen bzw. zwölf ausgesuchten GFP-TAK1_{K63W}-Klonen wurde die Plasmid-DNA im Mini-Maßstab isoliert und durch einen analytischen Restriktionsverdau mit dem Enzym *SpeI* auf die Orientierung des GFP-TAK1-Fragmentes hin untersucht. Von diesen hatten sieben GFP-TAK1wt-Klone und fünf GFP-TAK1_{K63W}-Klone die richtige Orientierung. Für die weiteren Arbeiten wurde die Plasmide der Klone GFP-TAK1wt #34 und GFP-TAK1_{K63W} #5 verwendet. Das Ergebnis des analytischen *SpeI*-Restriktionsverdaus für diese Klone zeigen die Abbildungen 3 und 4.

Durch DNA-Sequenzierung vom 3'-Bereich der GFP-kodierenden Sequenz ausgehend konnte die K63W-Mutation des Klons pM5XNEO-GFP-TAK1_{K63W} #5 und die entsprechende Originalsequenz des Klons pM5XNEO-GFP-TAK1wt bestätigt werden. Außerdem konnte durch Sequenzierung die korrekte DNA-Sequenz des TAK1-kodierenden Bereiches von Base 34-564 und 1950-2460 bei GFP-TAK1wt bzw. von Base 34-537 und 2470-1900 bei GFP-TAK1_{K63W} bestätigt werden. Von beiden Klonen wurden Glycerin-Dauerkulturen zur Langzeitaufbewahrung angelegt.

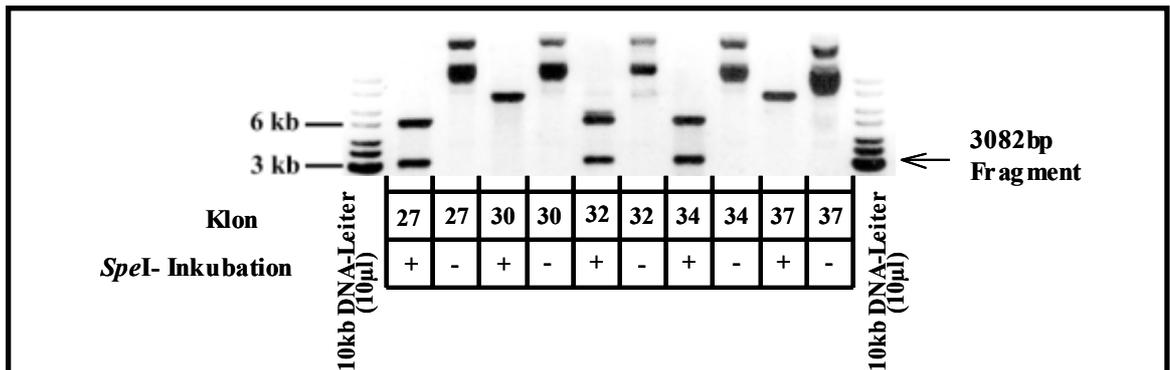


Abb. 3 : analytischer Restriktionsverdau der Klone 27, 30, 32, 34, und 37 des Plasmides pM5XNEO-GFP-TAK1wt

Jeweils 5 µl Plasmid-DNA aus einer Mini-Prep. wurden für 2 h mit dem Restriktionsenzym *SpeI* inkubiert und zum Vergleich neben nicht-inkubierter DNA des gleichen Klones auf einem Agarosegel aufgetrennt. Bei korrekter Orientierung des GFP-TAK1wt-Abschnittes ergibt der Verdau ein 3082 bp großes Fragment, andernfalls ein 933 bp-Fragment.

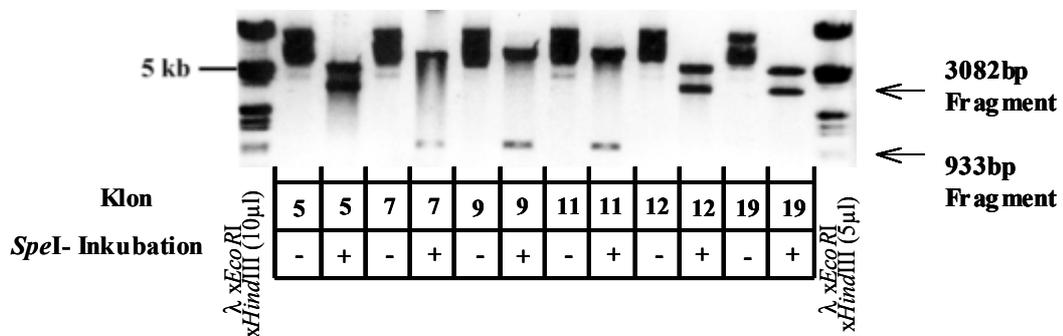


Abb. 4 : analytischer Restriktionsverdau der Klone 5, 7, 9, 11, 12, und 19 des Plasmides pM5XNEO-GFP-TAK1_{K63W}

Jeweils 5 µl Plasmid-DNA aus einer Mini-Präp. wurden für zwei Stunden mit dem Restriktionsenzym *SpeI* inkubiert und zum Vergleich neben nicht-inkubierter DNA des gleichen Klones auf einem Agarosegel aufgetrennt. Bei korrekter Orientierung des GFP-TAK1_{K63W}-Abschnittes ergibt der Verdau ein 3082 bp großes Fragment, andernfalls ein 933 bp-Fragment.

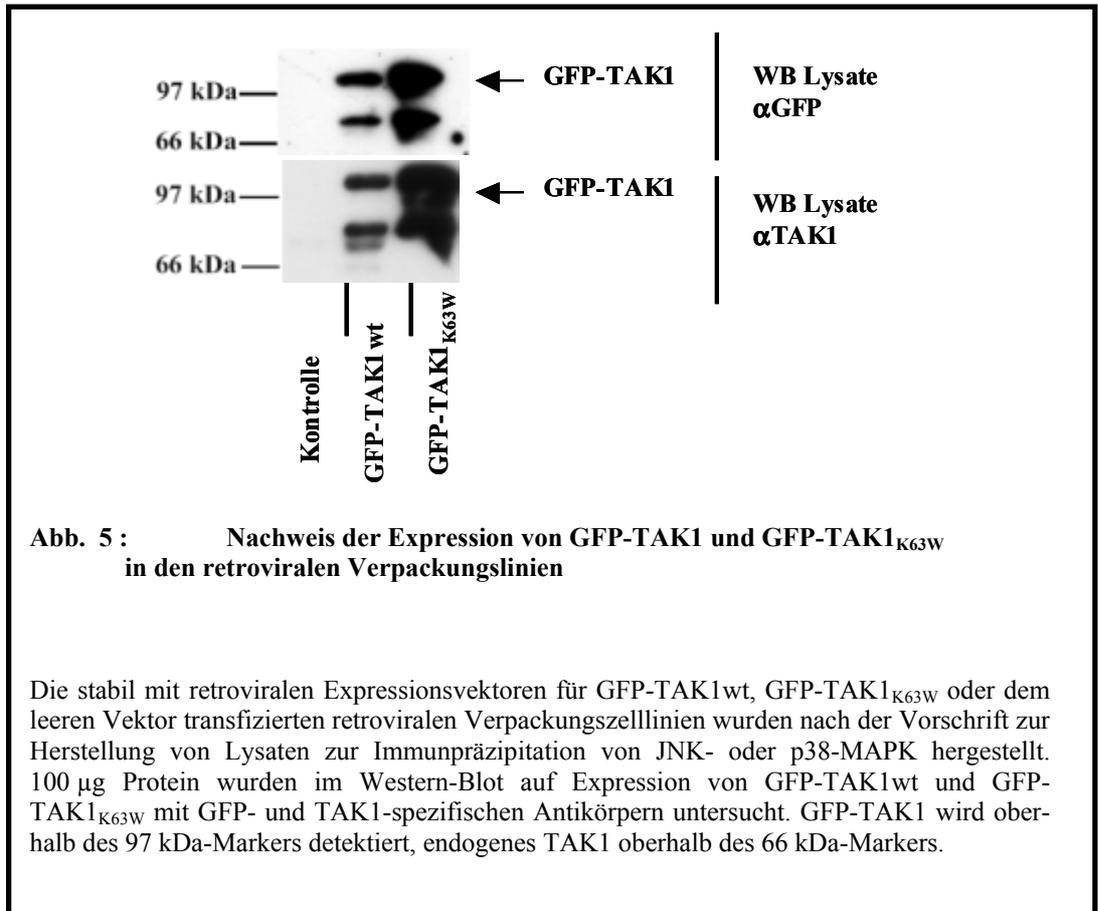
4.2 Herstellung von stabil transfizierten retroviralen Verpackungszelllinien

Die Herstellung von rekombinanten Retroviren aus den retroviralen Expressionsplasmiden geschieht in sogenannten Verpackungs-Zelllinien. Dazu werden die Plasmide in diese Zellen transfiziert. In der Zelle wird der Plasmidbereich vom 5'-LTR (*long term repeats*) bis zum 3'-LTR transkribiert, ausgehend vom U3-Bereich des 5'-LTR. Die entstehende einzelsträngige RNA ist das eigentliche Genom der Retroviruspartikel und wird von Hüllproteinen verpackt, die die Verpackungslinie exprimiert. Die Art der Hüllproteine bestimmt zugleich das Wirtsspektrum der entstehenden Viren.

Zur Herstellung von rekombinanten Retroviren wurden die Plasmide pM5XNEO, pM5XNEO-GFP-TAK1wt und pM5XNEOGFP-TAK1_{K63W} in die Zelllinie GP+E86 transfiziert, die Retroviren mit einem ecotropen, in diesem Fall nagerspezifischen Wirtsspektrum produziert. Nach der Transfektion wurden Zellen mit G418 auf stabile chromosomale Integration des jeweiligen Plasmides hin selektiert. Die überlebenden Zellen aus einer Transfektion wurden vereint, expandiert und als Linie kultiviert.

Die Funktionalität der retroviralen Kasette wurde im Western-Blot anhand der Expression der GFP-TAK1 Proteine überprüft. Das Ergebnis zeigt Abbildung 5.

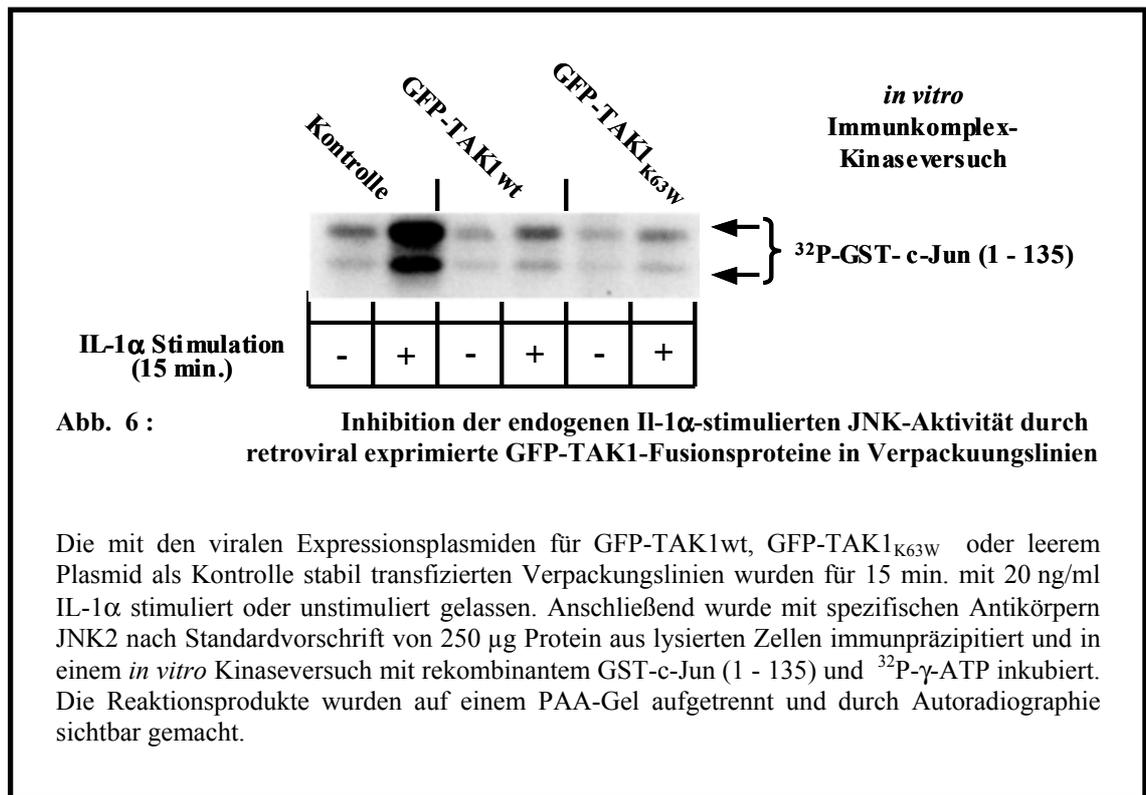
Die Zelllinien GFP-TAK1wt und GFP-TAK1_{K63W} zeigen beide eine starke Expression der Fusionsproteine, die im Western-Blot bei einer apparenten molekularen Masse von 97 kDa von GFP- und TAK1-spezifischen Antikörpern erkannt werden. Außerdem sind C-terminal verkürzte Fragmente zu erkennen. In der mit dem Leervektor transfizierten Linie sind diese Proteine wie erwartet nicht zu erkennen. Der Vergleich mit der Kontrolllinie verdeutlicht, dass die Überexpression sehr stark ist: Das Signal für endogenes TAK1 ist nur schwach zu erkennen, wohingegen die Signale für die Fusionsproteine bereits sehr stark zu erkennen sind.



4.3 Hemmung der IL-1 α -induzierten JNK-Aktivierung in den retroviralen Verpackungslinien

Aus eigenen Vorarbeiten und aus Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass GFP-TAK1-Fusionsproteine prinzipiell funktionell aktiv sind. Beispielsweise kann GFP-TAK1_{wt} bei ektopischer Expression zusammen mit dem Adaptermolekül TAB1 den JNK-Signalweg aktivieren, und die Überexpression von GFP-TAK1_{K63W} ist in der Lage, IL-1 α -induzierte Reporterogenaktivität zu blockieren.

Um die Funktionalität der von der retroviralen Kassette exprimierten Fusionsproteine zu untersuchen, wurde die IL-1 α -induzierte Aktivierung der endogenen JNK in den Verpackungslinien in einem *in vitro* Kinaseversuch untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 6 .



Man erkennt, dass in der Kontrolllinie die JNK-MAPK nach 15-minütiger IL-1α Stimulation sehr stark aktiviert wird. In der GFP-TAK1wt-Linie ist eine Aktivierung ebenfalls deutlich erkennbar jedoch im Vergleich zur Kontrolllinie sehr viel schwächer. Die JNK-Aktivierung ist in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie noch deutlicher als in der GFP-TAK1wt Linie gehemmt, jedoch nicht komplett .

Das von der retroviralen Kasette exprimierte GFP-TAK1_{K63W} ist also funktionell in der Lage, IL-1α-induzierte Signaltransduktion zu beeinflussen. Die Tatsache, dass in der GFP-TAK1wt-Linie die IL-1α-induzierte JNK-Aktivierung inhibiert ist, ist durch das auftreten der C-terminal trunkierten Fragmente erklärbar (siehe auch Holtmann, H. et al., 2001). Daher sind die von der retroviralen Expressionskasette exprimierten Fusionsproteine prinzipiell funktionell und die von diesen Zelllinien produzierten Viren ein geeignetes Werkzeug sind, um Auswirkungen der Überexpression dieser Fusionsproteine in Zielzellen zu untersuchen.

Ein interessanter Aspekt dieser Versuche ist auch, dass unter Bedingungen, die zumindest den JNK-Signalweg (wahrscheinlich auch andere) hemmen, die Verpackungszelllinie komplette biologische aktive Viren herstellen kann. Dieses ist ein starkes biologisches Argument für eine sehr spezifische Rolle von TAK1 in rezeptorvermittelten Signalprozessen.

4.4 Herstellung von stabil mit rekombinanten Retroviren infizierten NIH3T3-Zelllinien und Titerbestimmung

Mit Hilfe der von den Verpackungslinien produzierten Retroviren konnten NIH3T3-Zelllinien hergestellt werden, die die jeweiligen retroviralen Kassetten mit der GFP-TAK1wt- bzw. GFP-TAK1_{K63W}-codierenden Sequenz stabil in ihr Chromosom integriert haben und ausgehend von dieser Kasette stabil die entsprechenden GFP-TAK1-Fusionsproteine exprimieren. Um eine Kontrolllinie als Referenz für die geplanten Experimente zu haben, wurden NIH3T3-Zellen mit „leerem“ Virus ohne zusätzliche codierende Sequenzen infiziert.

Jeweils 10⁵ Zellen wurden mit fünf ml virushaltigem Überstand einer konfluenten Flasche der jeweiligen Verpackungslinien nach Vorschrift infiziert. Nach zweiwöchiger Selektion mit G418 wurden die Zellen expandiert und als Linie gehalten. Der Titer der Verpackungslinien wurde später unter vergleichbaren Bedingungen, wie im Methoden- teil beschrieben, anhand einer Verdünnungsreihe abgeschätzt. Er lag für die Kontrolllinie bei 11 x 10⁴ cfu (*colony forming units*)/ml, bei der Wildtyp-Linie bei 5 x 10⁴ cfu/ml und bei der GFP-TAK_{K63W}-Linie bei 3 x 10⁴ cfu/ml. Daraus ergeben sich für die Infektion bei Herstellung der stabil infizierten Linien die folgenden Bedingungen:

Tabelle 1 : Infektionsbedingungen bei der Herstellung der stabil infizierten NIH3T3-Linien

Linie	m.o.i. (multiplicity of infection)	Anteil uninfizierter Zellen [%]	Anteil einfach infizierter Zellen [%]	Anteil mehrfach infizierter Zellen [%]	Anteil ein- bis dreifach infizierter Zellen [%]
Kontrolllinie	5,5	0,4	2,2	97,4	19,8
GFP-TAK1wt	2,5	8,2	20,5	71,3	67,5
GFP-TAK1 _{K63W}	1,5	22,3	33,5	44,2	71,1

Die m.o.i. ist das durchschnittliche Verhältnis von infizierenden Einheiten (hier also Viren) und den zu infizierenden Zellen. Die Häufigkeitsverteilung der Mehrfachinfektionen kann mit der Poisson-Verteilung beschrieben werden:

$$P_n = m^n e^{-m} / n!$$

- P_n = Anteil n-fach infizierter Zellen an allen Zellen
- m = durchschnittliche Viruszahl pro Zelle; also m.o.i.
- n = Zahl der Mehrfachinfektion; also 0, 1, 2, 3 ...
- e = Eulersche Zahl
- n! = Fakultät von n

Bei der Berechnung wurde eine Poisson-Verteilung für die einzelnen Infektionsereignisse pro Zelle angenommen. Daraus ergibt sich ein sehr hoher Anteil an vielfach infizierten Zellen bei der Kontrolllinie und ein relativ geringer Anteil an einfach infizierten Zellen. Ein Problem bei der Herstellung von retroviral infizierten Linien ist, dass sich bei Vielfach-Infektion die Chance erhöht, ungewollte Phänotypen zu erhalten, indem man die

Bereiche endogener Gene trifft. Insofern kann die Kontrolllinie als gute Negativkontrolle betrachtet werden, da dieser Aspekt bei ihr stark berücksichtigt wird. Die beiden anderen GFP-TAK1-überexprimierenden Linien können als sehr homogen angesehen werden. Statistisch wurden bei der GFP-TAK1wt-Linie 67,5 % aller Zellen und bei der GFP-TAK1_{K63W}-Linie 71,1 % aller Zellen ein- bis dreifach infiziert. Es wurden also bei diesen beiden Linien der Großteil aller Zellen mit einer Anzahl von Viren infiziert, bei der die Wahrscheinlichkeit, wichtige endogene Genabschnitte zu treffen, als sehr gering erscheint.

Alle drei Zelllinien wiesen nach der Selektion bei normalen Wachstumsbedingungen keine morphologischen Unterschiede untereinander oder im Vergleich zur NIH3T3-Mutterzelllinie auf. Später zeigte sich allerdings, dass die GFP-TAK1_{K63W}-Linie sehr stark gegenüber TNF α -induzierter Apoptose sensitiviert war (siehe Kapitel 4.10). Eine Auswirkung der stabilen Infektion auf die Wachstumsrate konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, was zeigt, dass eine dauerhafte Überexpression der MAP3-Kinase TAK1 oder ihrer katalytisch inaktiven Mutante nicht toxisch für NIH3T3-Zellen ist.

4.5 Nachweis der retroviralen Expression der GFP-TAK1-Fusionsproteine in stabil infizierten NIH-3T3-Zelllinien

Durch Untersuchungen in den stabil infizierten Zelllinien sollen Aufschlüsse darüber gewonnen werden, in welche cytokin-induzierten Signalwege TAK1 involviert ist, und inwieweit es für die Expression von entzündungsrelevanten Genen wichtig ist. Der Ansatz beruht darauf, dass die überexprimierte katalytisch inaktive Mutante einen dominant negativen Effekt ausübt; sie verdrängt die Funktion von endogenem TAK1. Eine starke Überexpression der Fusionsproteine ist deswegen eine Grundvoraussetzung dafür, dass die Zelllinien ein geeignetes Untersuchungsmodell darstellen.

Die Expression der GFP-TAK1-Fusionsproteine in den stabil infizierten Zelllinien wurde zunächst im Western-Blot überprüft. Abbildung 7 zeigt ein exemplarisches Ergebnis.

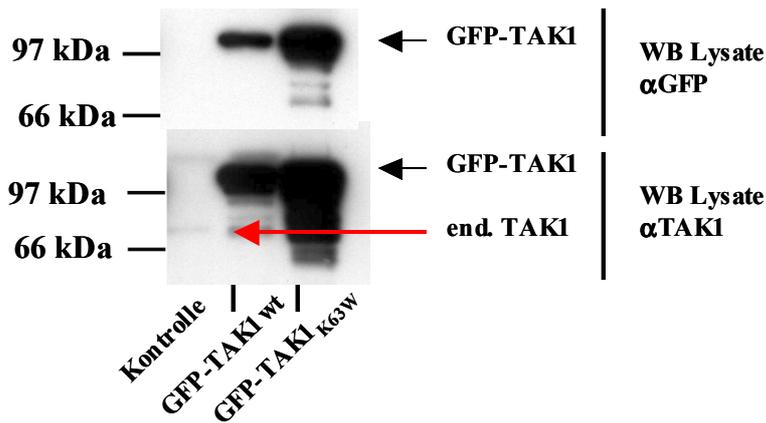


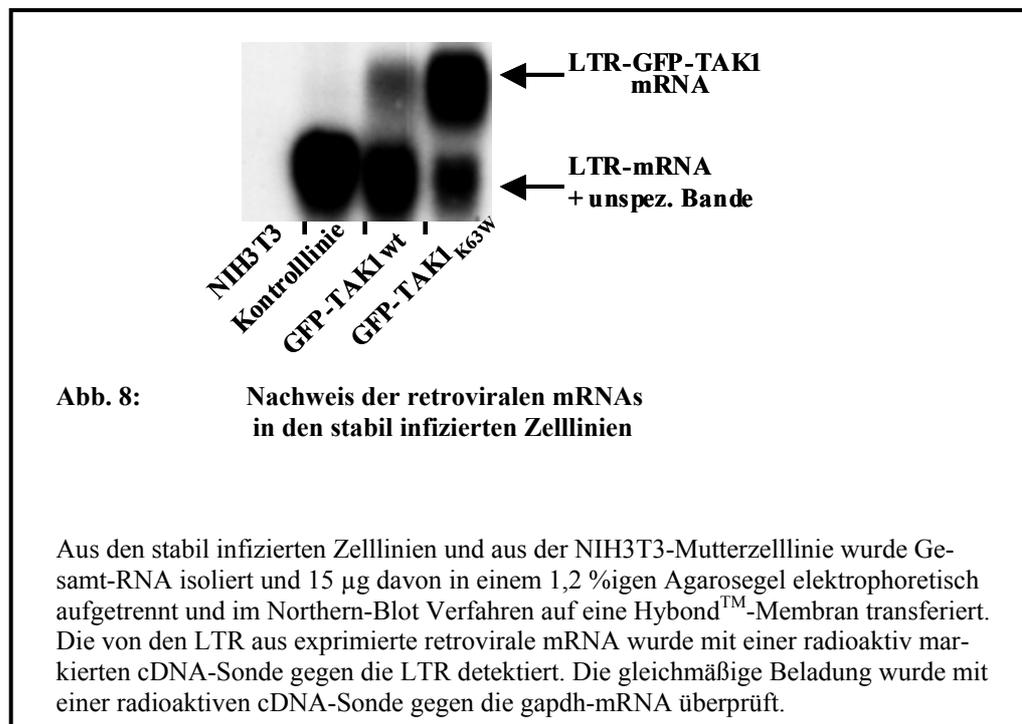
Abb.7: Nachweis der Expression von GFP-TAK1 und GFP-TAK1_{K63W} in den stabil infizierten NIH3T3-Linien

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1 wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder eine mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurden nach der Vorschrift zur Herstellung von Lysaten zur IP von JNK hergestellt. 100µg Protein wurden im Western-Blot auf Expression von GFP-TAK1 wt und GFP-TAK1_{K63W} mit GFP- und TAK1-spezifischen Antikörpern untersucht. GFP-TAK1 wird oberhalb des 97 kDa-Markers detektiert, endogenes TAK1 oberhalb des 66 kDa Markers.

Das Ergebnis ist vergleichbar mit dem Ergebnis aus den Verpackungslinien. Sowohl die Wildtyp-Zelllinie als auch die Zelllinie mit der Mutante zeigen eine sehr starke Überexpression der Fusionsproteine, wobei die Expression in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie deutlich stärker ist als in der Wildtyp-Linie. In beiden Zelllinien treten verkürzte Fragmente der Fusionsproteine auf. Auch hier ist die Überexpression im Vergleich zur Expression des endogenen Proteines sehr hoch. Ob die Fragmente schon in der Zelle auftreten oder es sich um ein Artefakt bei der Herstellung der Lysate handelt, konnte nicht endgültig geklärt werden, jedoch ist eine proteolytische Aktivität in den Lysaten aufgrund der Verwendung von Standard-Proteinaseinhibitoren und Durchführung der Arbeiten in der Kälte unwahrscheinlich. Eine alternative, spekulative Erklärung ist, dass es infolge der massiven Überexpression aufgrund der starken LTR-Promoteraktivität (siehe auch mRNA-Ergebnisse) der Translationsapparat der NIH3T3-Zellen für diese Transkripte „gesättigt“ wird und es zu unvollständig translatierten GFP-TAK1-Proteinprodukten kommt.

Die Überexpression der Fusionsproteine war über den gesamten Zeitraum der folgenden Untersuchungen in diesen Linien stabil, was durch regelmäßige Überprüfungen im Westernblot kontrolliert wurde.

Die Expression wurde ebenfalls auf RNA-Ebene im Northernblot untersucht. Die retrovirale RNA wurde mit einer Sonde gegen die LTR, in deren Bereich der Promotor der retroviralen Kasette liegt, detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 zu sehen.



Die LTR-Sonde detektiert spezifisch in den infizierten Zellen retrovirale RNA, wie der Vergleich mit RNA aus nicht infizierten NIH3T3-Zellen zeigt. In der Kontrolllinie, die mit „leerem“ Virus infiziert wurde, ist nur ein starkes Signal zu erkennen, das auf der Höhe zwischen der 18S-(1874 Basen) und der 28S-(4718 Basen) rRNA läuft und damit der erwarteten Größe der viralen RNA entspricht (ca. 3,7 kb)

In der GFP-TAK1wt-Zelllinie und in der GFP-TAK1_{K63W}-Zelllinie werden jeweils zwei Transkripte detektiert, eines oberhalb der 28S-RNA und eines zwischen der 18S- und der 28S-RNA, auf der gleichen Höhe wie das Transkript des Leervirus. Das größere der beiden Transkripte entspricht der erwarteten Größe der bicistronischen retroviralen RNA (ca 6,2 kb). Die Expression der RNA mit der GFP-TAK1wt-codierenden Sequenz ist dabei deutlich schwächer als die der RNA mit der GFP-TAK1_{K63W}-codierenden Sequenz, was auch das Ergebnis aus der Western-Blot Untersuchung bestätigt, in der eine schwächere Expression des GFP-TAK1wt-Proteins zu erkennen ist.

Das kleinere der beiden Transkripte macht in der GFP-TAK1wt-Zelllinie den größeren Teil und in der GFP-TAK1_{K63W}-Zelllinie den geringeren Anteil der detektierten Transkripte aus. Ob dieses kleinere Transkript eine „Splicing“-Variante der retroviralen RNA ist, wurde nicht näher untersucht.

Da die einzelnen Zelllinien nicht durch Einzelzellklonierung etabliert wurden, sondern bezüglich des chromosomalen Integrationsortes und der Expressionsstärke eine Mischkultur darstellen, stellte sich die Frage nach der Homogenität der Expression innerhalb der Zelllinien.

Daher erfolgte die Untersuchung der Expression auch auf Einzelzellebene anhand der Grünfluoreszenz des GFP-Fusionsanteils der TAK1-Proteine.

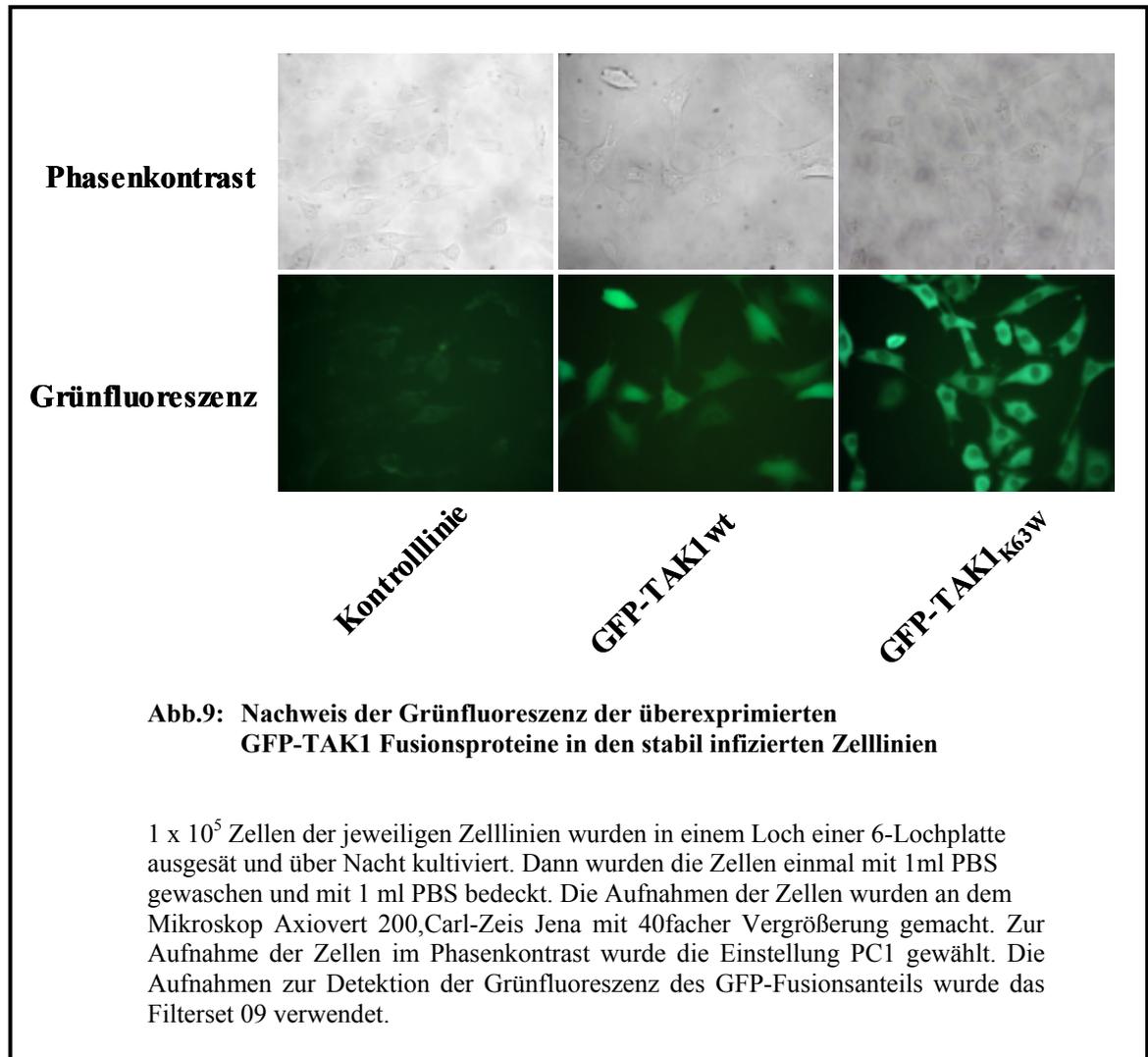


Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen: die Überexpression der GFP-TAK1-Proteine ist in beiden Zelllinien sehr stark, wobei die Intensität der Grünfluoreszenz in der Zelllinie mit der katalytische inaktiven Mutante stärker ist als in der Wildtyp-Zelllinie. Dies stimmt mit den Expressionsdaten aus den Western-Blot Untersuchungen überein. In der Abbildung werden die Unterschiede durch unterschiedliche Integrationszeiten bei der Bildaufnahme und die anschließende graphische Nachberei-

tung der Daten etwas verringert. In beiden Zelllinie ist zu erkennen, dass die Fusionsproteine hauptsächlich cytosolisch lokalisiert sind, wobei eine Lokalisation im Zellkern bei dieser Art der mikroskopischen Aufnahme nicht ausgeschlossen werden kann. Jedoch heben sich zumindest in der GFP-TAK1_{K63W}-Zelllinie die Zellkerne deutlich vom Rest des Zellkörpers ab.

Die zu beobachtenden Intensitätsunterschiede der Grünfluoreszenz innerhalb der Zelllinien sind sehr gering, und Zellen, die eine stark abweichende Fluoreszenzintensität haben, zeigen auch in der Phasenkontrastaufnahme eine entsprechende Abweichung. Die Expression der Fusionsproteine ist innerhalb der Zelllinien also sehr gleichmäßig, was eine sehr wichtige Voraussetzung für die geplanten biochemischen Untersuchungen ist.

4.6 Hemmung der IL-1- und TNF-stimulierten JNK und p38 Aktivität durch Überexpression von GFP-TAK1_{K63W}

Wie in den vorherigen Abschnitten dargestellt, handelt es sich bei den stabil infizierten Zelllinien um genetisch heterogene Zellpopulationen mit jeweils sehr starker und homogener Überexpression der GFP-TAK1-Fusionsproteine. In diesen Zellen beobachtete Unterschiede sollten also nicht auf klonale Unterschiede zurückzuführen sein, sondern auf die Überexpression der jeweiligen GFP-TAK1-Fusionsproteine. Die hergestellten Linien besitzen die Vorteile klonaler Linien – starke, homogene Expression - ohne dass deren Nachteile zu erwarten sind.

Zunächst wurde die Auswirkung der GFP-TAK1 Proteine auf die durch die proinflammatorischen Cytokine IL-1 α und TNF α induzierte Aktivierung von Stress-Signalwegen untersucht, mit Fokussierung auf die JNK-, p38- und NF- κ B-Signalwege.

Für die Untersuchung des JNK-Signalweges wurden alle drei Zelllinien für 15 Minuten mit IL-1 α oder TNF α stimuliert oder unstimuliert gelassen, und lysiert. Aus den Lysaten wurde JNK2 immunpräzipitiert und ihre Aktivität in einem *in vitro* Kinaseversuch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 und 11 zu sehen.

In der Kontrolllinie wird JNK2 sowohl durch IL-1 α als auch durch TNF α aktiviert. Die Aktivierung erfolgt auch in der GFP-TAK1_{wt}-Zelllinie, ist jedoch schwächer als in der Kontrolllinie. In der Linie mit der kinasetoten Mutante hingegen ist die Aktivierung von JNK2 komplett gehemmt.

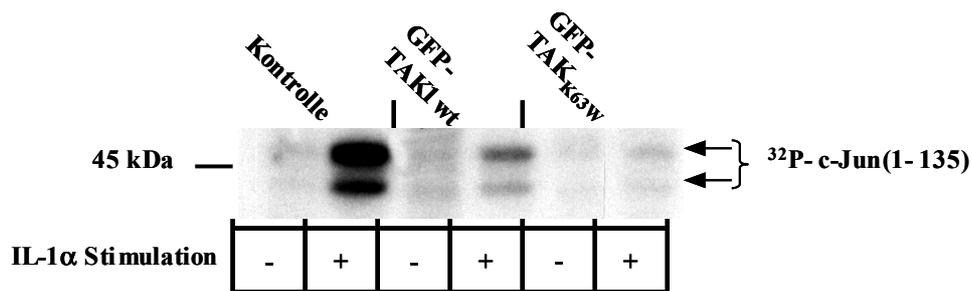


Abb. 10 : Die Überexpression von GFP-TAK1_{K63W} hemmt die IL-1α-induzierte *in vitro* Kinaseaktivität immunpräzipitierter JNK2

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder eine mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurde für 15 min. mit IL-1α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden nach Vorschrift lysiert und in eine nukleäre und eine cytosolische Fraktion unterteilt. Aus den cytosolischen Fraktionen mit 500 µg Gesamtprotein wurden nach Vorschrift JNK2 immunpräzipitiert und *in vitro* mit GST-c-Jun (1 - 135) und ³²P-γ-ATP inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einem solchen Gel, der die IL-1α-abhängige Phosphorylierung des Substrates zeigt.

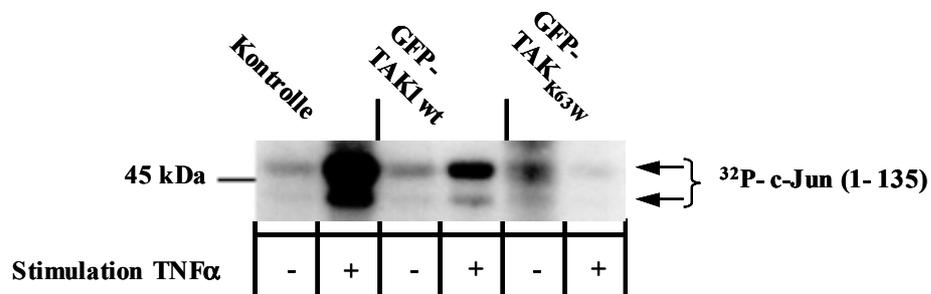


Abb. 11 : Die Überexpression von GFP-TAK1_{K63W} hemmt die TNFα-induzierte *in vitro* Kinaseaktivität immunpräzipitierter JNK2

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder eine mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurde für 15 min. mit TNFα stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden nach Vorschrift lysiert und in eine nukleäre und eine cytosolische Fraktion unterteilt. Aus den cytosolischen Fraktionen mit 500 µg Gesamtprotein wurden nach Vorschrift JNK2 immunpräzipitiert und *in vitro* mit GST-c-Jun (1 - 135) und ³²P-γ-ATP inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dargestellt ist eine Ausschnitt aus einem solchen Gel, der die TNFα-abhängige Phosphorylierung des Substrates zeigt.

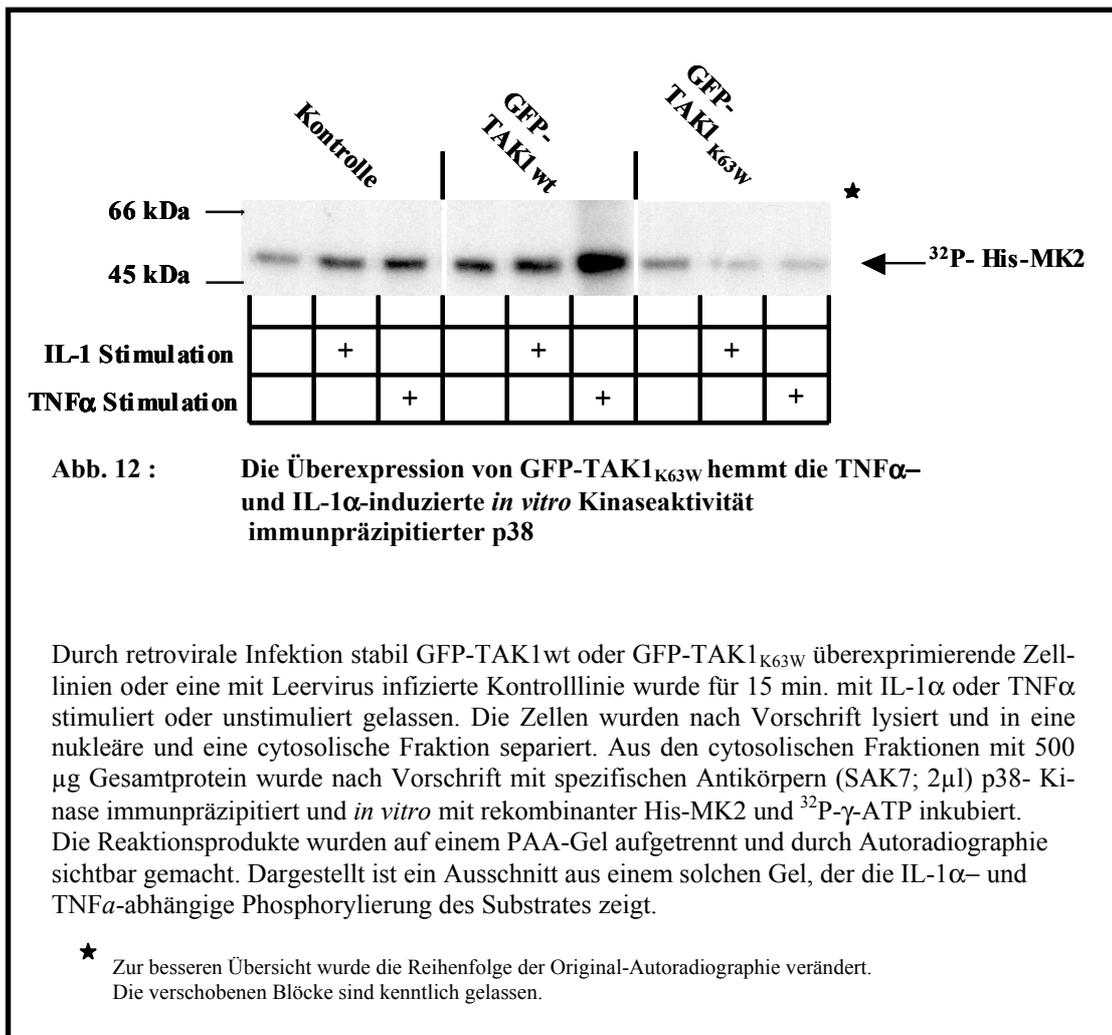
Die Abbildungen 10 und 11 zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis für IL-1α-Stimulation bzw. für TNFα-Stimulation. Für beide Experimente wurden mindestens zwei weitere unabhängige Replikate mit gleichem Ergebnis gemacht (nicht gezeigt). Für

die IL-1 α -induzierte JNK-Aktivierung wurde außerdem der gleiche Versuch für die Isoform JNK1 durchgeführt. Hier zeigte sich das gleiche Ergebnis wie für die Isoform JNK2.

Die Überexpression der kinasetoten GFP-TAK1_{K63W} Mutante hat also einen dominant negativen Effekt auf die IL-1 α - und TNF α -induzierte Aktivierung des JNK-Signalweges, was zu diesem Zeitpunkt für IL-1 α jedoch nicht für TNF α aus der Literatur schon bekannt war.

In gleicher Weise wie für den JNK-Signalweg wurde der Einfluss der Überexpression der Fusionsproteine auf die Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges durch IL-1 α und TNF α untersucht. Dazu wurden die stabil infizierten Zelllinien für 15 Minuten mit IL-1 α oder TNF α stimuliert und die Aktivität der p38-MAPK in einem *in vitro* Kinaseversuch mit rekombinanter His-MK2 untersucht, einem spezifischen „downstream“ Substrat von p38-MAPK. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis des Versuches.

In der Kontrolllinie induzieren IL-1 α und TNF α die Kinaseaktivität der p38-MAPK signifikant, allerdings schwächer als z. B. JNK oder NF- κ B. In der Wildtyp-Zelllinie ist noch eine deutliche Aktivierung der Kinaseaktivität durch TNF α zu erkennen, die Aktivierung durch IL-1 α ist jedoch nur sehr schwach. In der GFP-TAK1_{K63W} Zelllinie war weder durch IL-1 α noch durch TNF α eine Stimulation der p38-MAPK Kinaseaktivität erkennbar. Außerdem schien die basale Kinaseaktivität in dieser Zelllinie erniedrigt zu sein. Insgesamt ist die detektierte Aktivierung der p38-MAPK durch IL-1 α oder TNF α schwächer als die der JNK-MAPK.



Diese Versuche zeigen, dass die Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante dominant negativ auf die IL-1 α - und TNF α -induzierte Aktivierung von JNK und p38 wirken. Für den IL-1-Signalweg ist dies eine Bestätigung schon bekannter Daten, für den TNF-Signalweg wurde dies zum ersten mal gezeigt.

4.7 TAK1-abhängige Regulation des NF- κ B-Signalweges

Der NF- κ B-Signalweg gilt als der zentrale Signalweg bei der Induktion von entzündungsrelevanten Genen. Außer durch die proinflammatorischen Cytokine IL-1 α und TNF α wird er noch von einer Vielzahl anderer Stimuli induziert. Der wichtigste regulatorische Schritt in diesem Signalweg ist die Freisetzung der p50 oder p65 NF- κ B Untereinheiten von Proteinen, die sie im Cytosol der Zelle zurückhalten und weshalb sie als *inhibitor of NF- κ B* (I κ B) Proteine bezeichnet werden. Diese Freisetzung geschieht durch phosphorylierungsabhängige proteasom-vermittelte Zerstörung der I κ B-Proteine. Anschliessend translozieren die NF- κ B-Proteine aufgrund von demaskierten Kernloka-

lisierungssignalen in den Zellkern, wo sie als Homo- oder Heterodimer an ihre Promotorerkennungssequenz binden und in der Lage sind, Genexpression zu aktivieren.

Aus diesem Grund wurde die TAK1-abhängige Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch IL-1 α oder TNF α zunächst anhand der Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern untersucht. Dazu wurden die drei Linien mit IL-1 α oder TNF α für 15 Minuten stimuliert und das Vorhandensein von NF- κ B in nukleären Fraktionen im EMSA-Experiment nachgewiesen. In den Abbildungen 13 und 14 werden repräsentative Ergebnisse gezeigt. Sowohl IL-1 α als auch TNF α induzierten die Translokation von NF- κ B in den Zellkern, was im EMSA-Experiment in den stimulierten Proben als Komplex mit deutlich verringerter elektrophoretischer Mobilität zu erkennen war. Die Spezifität des Komplexes wurde durch Kompetition mit nicht-radioaktiv markierten Oligonukleotid demonstriert.

Das gleiche Bild zeigte sich in der GFP-TAK1^{wt}-Zelllinie. Im Gegensatz zur Aktivierung der JNK- und p38-MAPK-Signalwege (siehe Kapitel 4.6) war die Aktivierung der NF- κ B Translokation im Vergleich zur Kontrolllinie auch quantitativ nicht beeinträchtigt. Die Überexpression der GFP-TAK1_{K63W} Mutante dahingegen inhibierte die nukleäre NF- κ B-Translokation sowohl nach IL-1 α als auch nach TNF α Stimulation fast vollständig. In beiden Versuchsansätzen ist nur noch ein sehr schwaches Auftreten der spezifischen induzierten Protein-DNA-Komplexe zu beobachten. Diese Daten stimmten zu diesem Zeitpunkt mit Literaturdaten überein, die TAK1 in der IL-1 α induzierten Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade oberhalb des IKK-Komplexes einordnen. Für TNF α waren bis zu diesem Zeitpunkt keine entsprechenden Untersuchungen veröffentlicht.

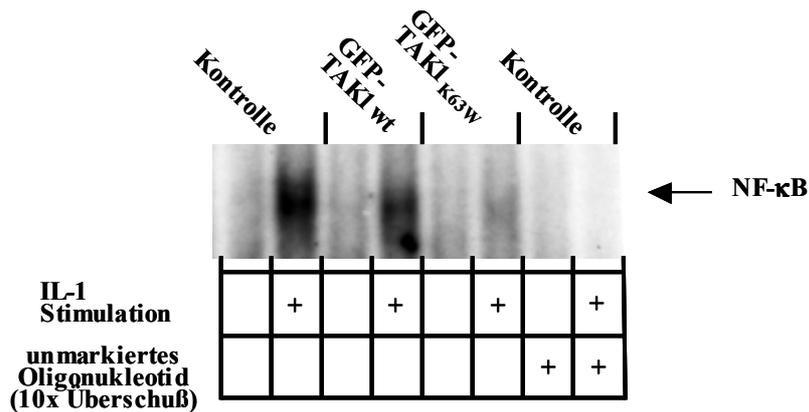


Abb. 13 : Die IL-1 α -stimulierte Translokalisierung von NF- κ B ist TAK1-abhängig

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder eine mit Leervirus infizierte Zelllinie wurden für 15 min. mit 10 ng/ml IL-1 α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden nach Vorschrift lysiert und in eine nukleäre und eine cytosolische Fraktion separiert. Die nukleären Fraktionen mit je ca. 10 μ g Protein wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden für eine NF- κ B-Konsensus-Sequenz inkubiert. Die radioaktiv markierte DNA und die DNA/Proteinkomplexe wurden auf einem PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die NF- κ B/DNA-Komplexe erscheinen als Banden mit deutlich verminderter elektrophoretischer Mobilität. Dieser Ausschnitt der Autoradiographie ist dargestellt.

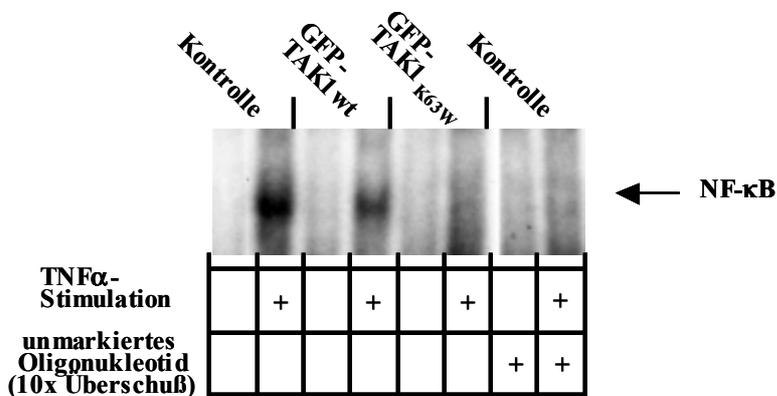


Abb. 14: Die TNF α -stimulierte Translokalisierung von NF- κ B ist TAK1-abhängig

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder eine mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurde für 15 min. mit TNF α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden nach Vorschrift lysiert und in eine nukleäre und eine cytosolische Fraktion separiert. Die nukleären Fraktionen mit je ca. 20 μ g Protein wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden für eine NF- κ B-Konsensus-Sequenz inkubiert. Die radioaktiv markierte DNA und die DNA/Proteinkomplexe wurden auf einem PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die NF- κ B/DNA-Komplexe erscheinen als Banden mit deutlich verminderter elektrophoretischer Mobilität. Dieser Ausschnitt der Autoradiographie ist dargestellt.

Im Folgenden wurde die Funktion von NF- κ B anhand von Reporter-genversuchen mit dem Plasmid NF- κ B₃-Luc, bei dem die Expression des Enzyms Luziferase von einem Promotor mit dreifacher NF- κ B-Konsensus-Erkennungssequenz getrieben wird, analysiert. Nach transienter Transfektion dieses Expressionsvektors in die drei Zelllinien wurden diese für fünf Stunden mit IL-1 α bzw. TNF α stimuliert oder unstimuliert gelassen. In Lysaten dieser Zellen wurde dann die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Abbildung 15 (oberer Teil) fasst die Ergebnisse dieser Versuche als Balkendiagramm zusammen.

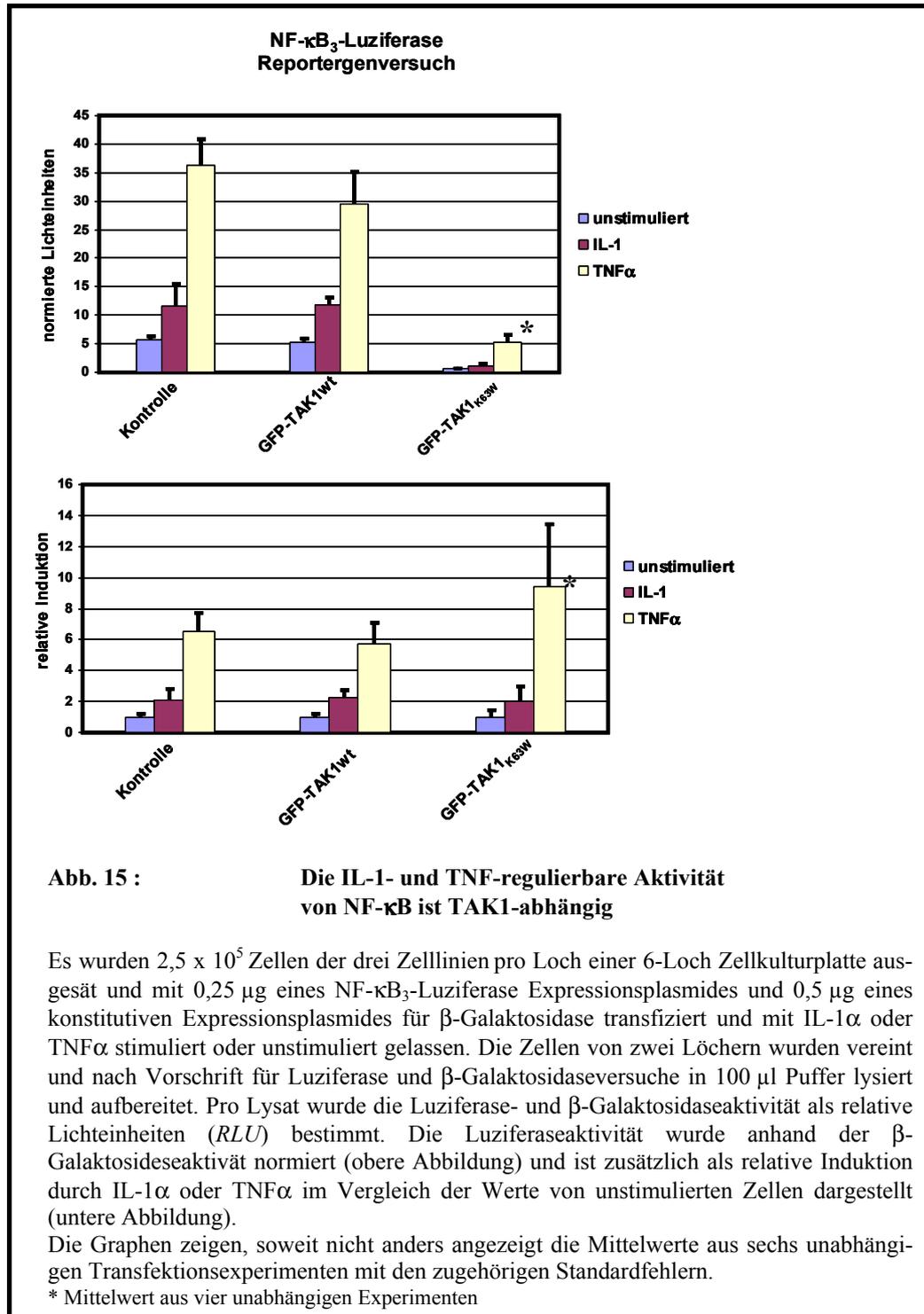
Es zeigte sich, dass die Reporter-genaktivität in der Kontroll- und in der Wildtyplinie nahezu identisch war. Die basale Reporter-genaktivität lag in beiden Linien auf einem Niveau von ca. 5 Einheiten und wurde durch IL-1 α auf ca. 12 Einheiten bzw. durch TNF α auf ca. 30 Einheiten gesteigert.

In der Zelllinie, die die kinasetote TAK1-Mutante überexprimiert, war hingegen die basale Reporter-genaktivität auf einen Wert von ca. 0,5 Einheiten erniedrigt, die Stimulation mit IL-1 α steigerte die Aktivität nur auf einen Wert von ca. 1 Einheit und die Stimulation mit TNF α auf einen Wert von ca. 5 Einheiten. Die Aktivität des Reporter-gens wurde durch die Überexpression der kinasetoten TAK1-Mutante also stark erniedrigt, im basalen und im IL-1 α induzierten Zustand um ungefähr Faktor 10 und im TNF α induzierten Zustand um ungefähr Faktor 7. Die Aussage dieser Daten passte zu den Ergebnissen zur stimulusabhängigen NF- κ B-Translokation aus den EMSA-Experimenten, in denen ebenfalls nur in der GFP-TAK1_{K63W}-Zelllinie eine fast vollständige Inhibition der NF- κ B Aktivierung auf der Ebene der Kerntranslokation zu erkennen war.

Ein differenzierteres Bild ergab sich bei Betrachtung der relativen Induktion der Reporter-genaktivität, bezogen auf den basalen Wert der jeweiligen Zelllinie. In allen drei Linien war die Reporter-genaktivität durch IL-1 α um ungefähr den Faktor 2 steigerbar, durch TNF α in der Kontroll- und in der Wildtyp-Zelllinie um den Faktor 6 und in der Linie mit der kinasetoten Mutante um den Faktor 9. In allen drei Linien waren also sowohl IL-1 α als auch TNF α in der Lage, eine relative Induktion des NF- κ B-Reporter-gens in jeweils vergleichbarem Ausmaß zu bewirken, was zeigte, dass es noch verbliebene NF- κ B-regulierende Signalwege gibt, die nicht durch eine Überexpression der GFP-TAK1_{K63W}-Mutante beeinflusst werden.

Es ist denkbar, dass für die cytosolische Aktivierung von NF- κ B durch IL-1 α und TNF α parallel mehrere additiv oder synergistisch wirkende Signalwege oberhalb

des IKK-Komplexes verwendet werden, so dass die Inhibition durch Überexpression der kinasetoten TAK1-Kinase nicht komplett ist. Ein Indiz hierfür sind die Ergebnisse aus den EMSA-Versuchen, die zeigen, dass ein – wenn auch sehr kleiner - Rest an Induzierbarkeit der NF- κ B Kerntranslokation noch vorhanden ist.

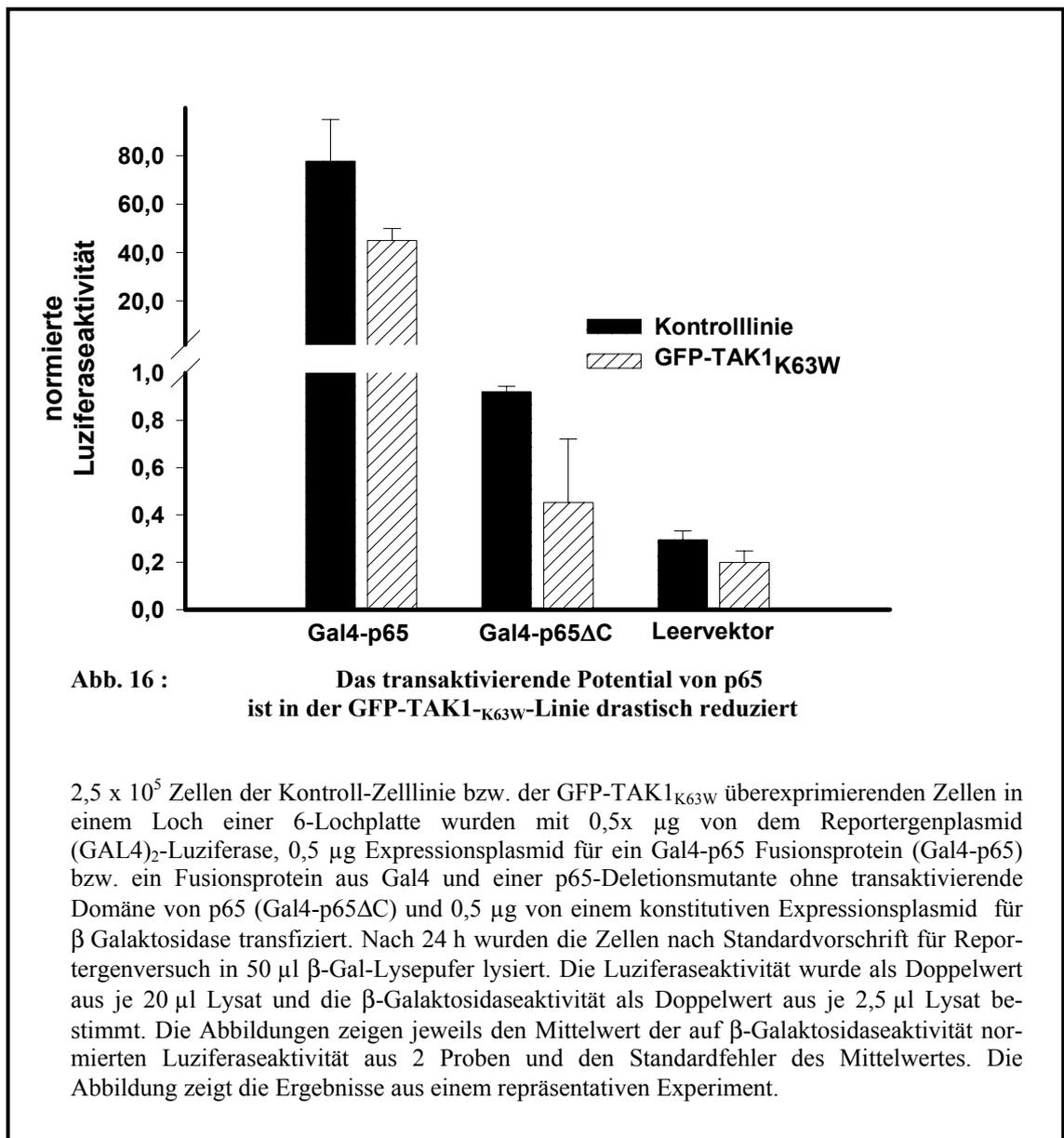


Eine weitere Möglichkeit ist, dass die cytosolische Aktivierung von NF- κ B über den IKK-Komplex durch die Überexpression der kinasetoten TAK1-Mutante inhibiert wird, die nukleäre Aktivierung über andere Signalwege jedoch unbeeinflusst bleibt.

Um diese Frage zu untersuchen, wurden Reportergergenversuche mit GAL4-p65 Fusionsproteinen und GAL4-abhängigen Reporterplasmiden durchgeführt. In diesem System wird NF- κ B p65 anhand der Kernlokalisierungssequenz von GAL4 in den Zellkern gebracht und somit der Schritt der cytosolischen Aktivierung von NF- κ B umgangen.

Dazu wurden die Kontrolllinie und die GFP-TAK1_{K63W}-Linie transfiziert mit Expressionsplasmiden für ein Gal4-p65 Fusionsprotein oder ein C-terminal trunkiertes Gal4-p65 Fusionsprotein, dem die transaktivierende Domäne von p65 fehlt zusammen mit Gal4-Luziferase Reporterplasmid. Das Fusionsprotein ist durch den Gal4-Fusionsanteil nukleär lokalisiert und bindet dort an die konservierte zweifache Gal4-Erkennungssequenz des Reporterplasmides. Die Transkription des Luziferase-Reportergens wird in diesem Fall durch die transaktivierende Domäne des p65-Fusionsanteils angetrieben. Die Luziferaseaktivität ist somit ein direktes Maß für das transaktivierende Potential von p65 in den beiden Zelllinien, unabhängig von der cytosolischen Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Das Ergebnis ist graphisch in der Abbildung 16 dargestellt.

In zwei unabhängigen Versuchen von denen einer hier gezeigt wird war das transaktivierende Potential des p65-Fusionsanteils in GFP-TAK1_{K63W} überexprimierenden Zelllinie deutlich erniedrigt. Die Reportergergenaktivität betrug nur ca. 50% der Werte aus den Kontrolllinien. Bei Coexpression mit dem trunkierten Gal4-p65-Fusionsprotein lag die Reportergergenaktivität nur auf basalem Niveau, was zeigte, dass die erhöhte Reportergergenaktivität bei Coexpression mit dem kompletten Gal4-p65-Fusionsprotein auf die transaktivierende Domäne von p65 zurückzuführen war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Überexpression der GFP-TAK1_{K63W}-Mutante nicht nur inhibierend auf die cytosolische Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wirkt, sondern auch auf seine nukleäre Aktivierung.



In der Literatur sind mehrere IL-1 α - oder TNF α -induzierte Signalwege beschrieben, die durch Phosphorylierung von p65 dessen transaktivierendes Potential erhöhen. Einer dieser Signalwege ist der PI3-PKB/Akt-Signalweg. Daher wurde untersucht, ob die Aktivierung des PI3-PKB/Akt-Signalweges durch IL-1 α oder TNF α in den drei Zelllinien verändert ist.

4.8 TAK1-unabhängige Aktivierung des PI3-Kinase-PKB/Akt-Signalweges

Ein wichtiger Schritt in der PI3-PKB-Signalkaskade ist die Phosphorylierung der ProteinkinaseB/Akt an der Aminosäure Serin 473. Die Phosphorylierung an diesem Aminosäurerest wurde in den drei Zelllinien nach Stimulation mit IL-1 α oder TNF α im Western-Blot mit Hilfe eines phospho-spezifischen Antikörpers gegen die an Serin 473

phosphorylierte Form der PKB/Akt untersucht. Dazu wurden mit IL-1 α bzw. TNF α stimulierte Zellen oder unstimulierte Zellen lysiert und im Western-Blot mit Hilfe des Antikörpers auf die Phosphorylierung hin untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 17 und 18.

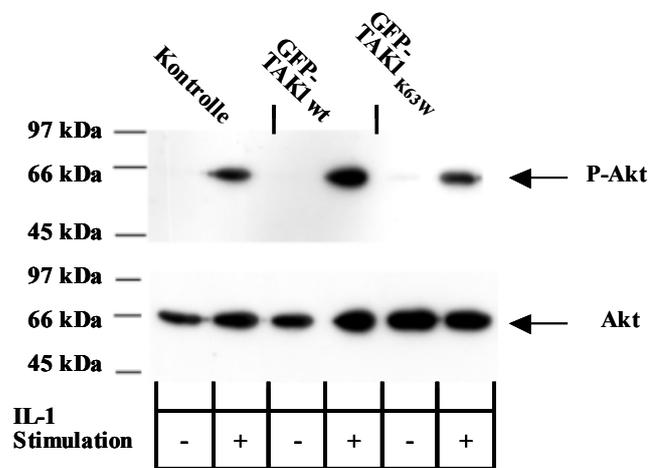


Abb. 17: TAK1-unabhängige Phosphorylierung von PKB/AKT an Serin 473 durch IL-1 α

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1 wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder eine mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurde für 15 min. mit 10 ng/ml IL-1 α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden nach Vorschrift lysiert und in eine nukleäre und eine cytosolische Fraktion separiert. Die cytosolischen Fraktionen mit je 100 μ g Protein wurden im Western-Blot nacheinander mit einem Antikörper gegen die an Ser-473 phosphorylierte Form bzw. gegen die totale Menge der Proteinkinase Akt analysiert. Beide Antikörper geben spezifische Signale auf der Höhe von ungefähr 66 kDa.

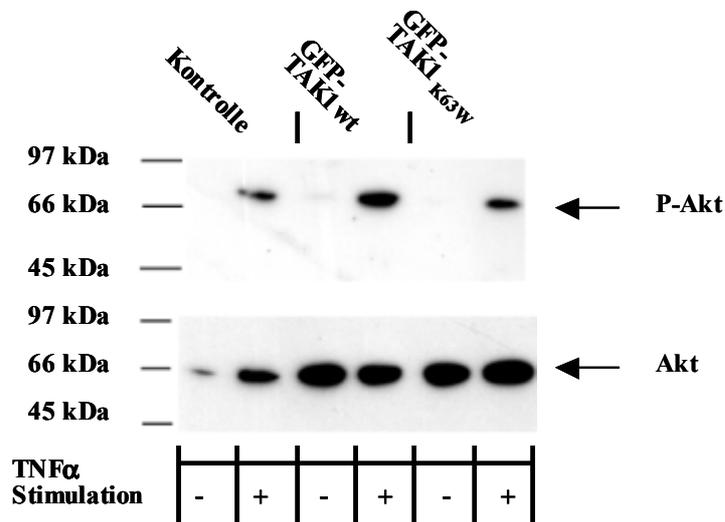


Abb. 18: TAK1-unabhängige Phosphorylierung von PKB/AKT an Serin 473 durch TNF α

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1 wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder eine mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurde für 15 min. mit TNF α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden nach Vorschrift lysiert und in eine nukleäre und eine cytosolische Fraktion separiert. Die cytosolischen Fraktionen mit je 100 μ g Protein wurden im Western-Blot nacheinander mit einem Antikörper gegen die an Ser-473 phosphorylierte Form bzw. gegen die totale Menge der Proteinkinase Akt analysiert. Beide Antikörper geben spezifische Signale auf der Höhe von 66 kDa.

Wie jeweils im oberen Teil der Abbildungen 17 und 18 zu erkennen ist, detektiert der phospho-spezifische Antikörper in allen drei Zelllinien auf der Höhe von 66 kDa nach Stimulation der Zellen mit IL-1 α oder mit TNF α eine spezifische Bande, die der Ser-437-phosphorylierten Form von PKB/Akt entspricht. In den unstimulierten Kontrollen dagegen gibt es kein Signal. Sowohl IL-1 α als auch TNF α sind also in allen drei Zelllinien in der Lage, die Phosphorylierung der PKB/Akt an Ser-473 zu induzieren. Der PI3-Kinase–PKB/Akt-Signalweg ist damit ein Beispiel für einen IL-1 α - oder TNF α - stimulierten Signalweg, der nicht durch die Überexpression der GFP-TAK1_{K63W}-Mutante inhibiert wird. Damit wird gleichzeitig auch gezeigt, dass alle drei Zelllinien prinzipiell noch in der Lage sind, auf die Stimulation mit den beiden Cytokinen zu reagieren. Die bisher beobachtete Inhibition des JNK-MAPK-, des p38-MAPK- und des NF- κ B-Signalweges durch GFP-TAK1_{K63W} ist also nicht auf ein prinzipielles Unvermögen dieser Zelllinie zurückzuführen auf die Stimulation mit diesen Cytokinen zu reagieren, z. B. durch Verlust von IL-1 oder TNF Rezeptorkomponenten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Überexpression der kinasetoten GFP-TAK1_{K63W}-Mutante zu einer starken Inhibition des NF- κ B-Signalweges führt. Durch eine Kombination von EMSA- und Reportergergenversuchen konnte gezeigt werden, dass die cytosolische Aktivierung und die anschließende Translokation in den Nukleus von NF- κ B sehr stark gehemmt ist. Mit Hilfe von Gal4-Reportergergenversuchen wurde gezeigt, dass außerdem das transaktivierende Potential von kernständigem p65 durch die Überexpression von GFP-TAK1_{K63W} erniedrigt wird. Von einem möglichen Signalweg, der zu dieser Transaktivierung beitragen könnte, dem PI3-Kinase–PKB/Akt-Signalweg, konnte jedoch gezeigt werden, dass er durch die Überexpression der kinasetoten TAK1-Mutante nicht beeinträchtigt wird. Die Ergebnisse aus Versuchen mit dem (NF- κ B)₃-Reportergergen zeigen, dass in allen drei Zelllinien immer noch eine vergleichbare relative Induktion dieses Reportergergens stattfindet. Ob diese verbliebene Aktivierbarkeit in der GFP-TAK1_{K63W}-überexprimierenden Zelllinie ausschließlich auf p65-aktivierende Signalwege im Nukleus, z. B. den in diesen Zelllinien nicht inhibierten PI3-Kinase–PKB/Akt-Signalweg, zurückzuführen ist, oder auch auf eine verbliebene cytosolische Aktivierbarkeit von NF- κ B über den IKK-Komplex, konnte nicht abschließend geklärt werden.

4.9 Untersuchung von TAK1-abhängiger Genexpression

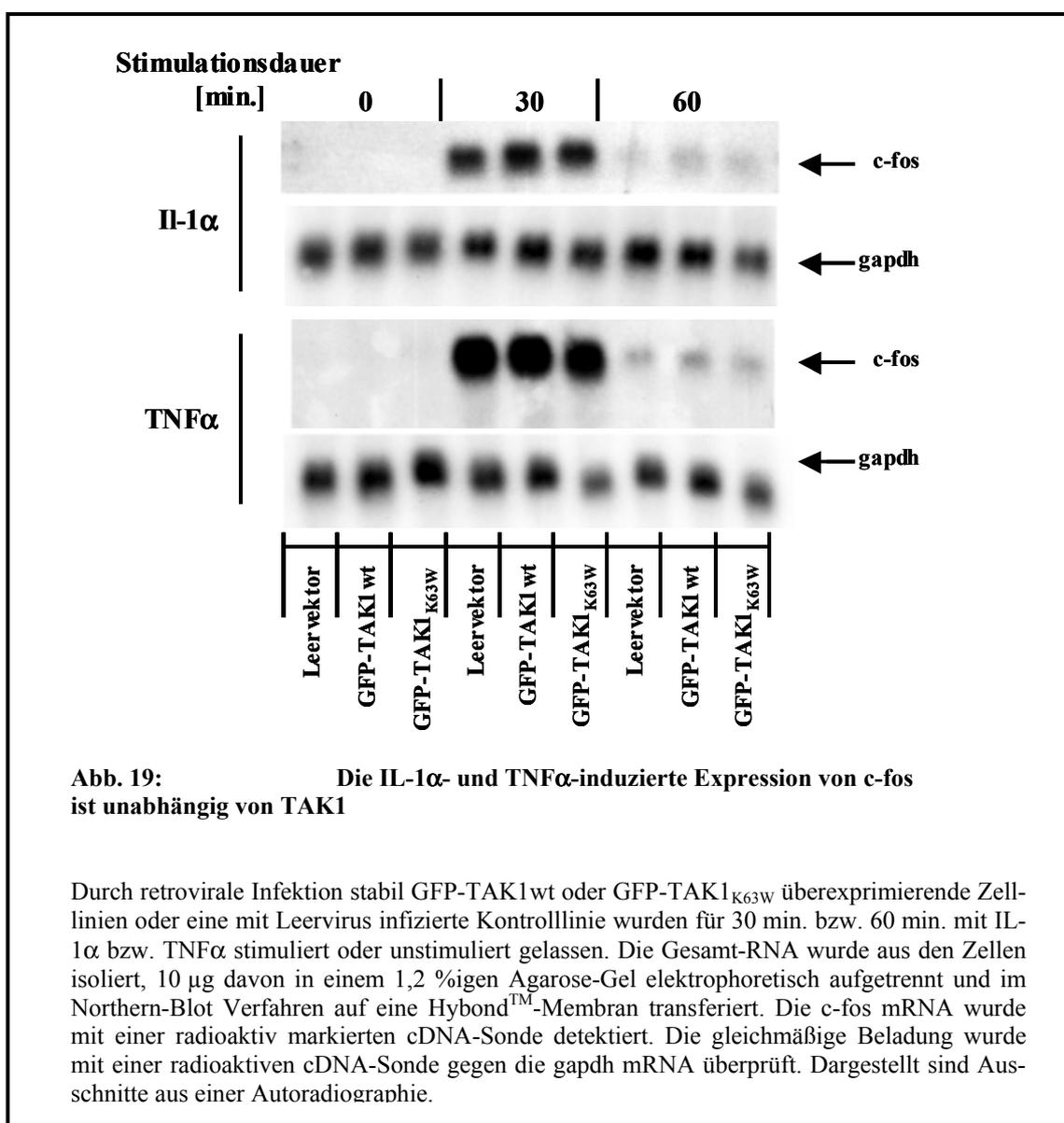
Die Untersuchungen zur Signaltransduktion haben gezeigt, dass die IL-1 α - und die TNF α -induzierte Aktivierung der drei wichtigsten Stress-Signalwege – des JNK, des p38-MAPK- und des NF- κ B-Signalweges – durch die Überexpression der katalytisch inaktiven GFP-TAK1_{K63W}-Mutante inhibiert werden. Die Aktivierung des PI3-PKB/Akt-Signalweges dahingegen ist nicht beeinträchtigt.

Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe war bekannt, dass TAK1 eine wichtige Rolle bei der IL-1 α -induzierten Expression des Cytokins IL-8 in humanen Zelllinien spielt, und zwar auf der IL-8-Promotorebene und auf der Ebene der Stabilisierung der IL-8 mRNA (Holtmann, H. et al., 2001). Eingehende Untersuchungen zur Rolle von TAK1 bei der Expression von anderen Genen im Kontext einer Entzündung waren zum damaligen Zeitpunkt aus der Literatur nicht bekannt.

Aus diesem Grund wurde in den drei stabil infizierten Zelllinien die Expression von verschiedenen Genen untersucht, die bekanntermaßen durch IL-1 α oder TNF α induziert werden. Dazu wurden die drei Zelllinien in zwei verschiedenen Zeiträumen mit IL-1 α oder TNF α stimuliert. Der eine Zeitraum deckte den Zeitraum von 0 - 60 Minuten ab und ist repräsentativ für eine Gruppe von Genen, die als die klassischen *immediate early genes* bezeichnet werden. Ihre Expression ist sehr schnell und oft transient. Die von ihnen codierten Proteine sind häufig selbst Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits an der Expression von Genen von Entzündungsmediatoren partizipieren. Diese werden in dem anderen untersuchten Zeitfenster von 0 bis 8 Stunden erfasst. Die Entzündungsmediatoren werden z. T. genauso schnell wie die *immediate early genes* induziert, oft aber auch langsamer. Sie zeichnen sich durch eine längere Stabilität ihrer Transkripte aus.

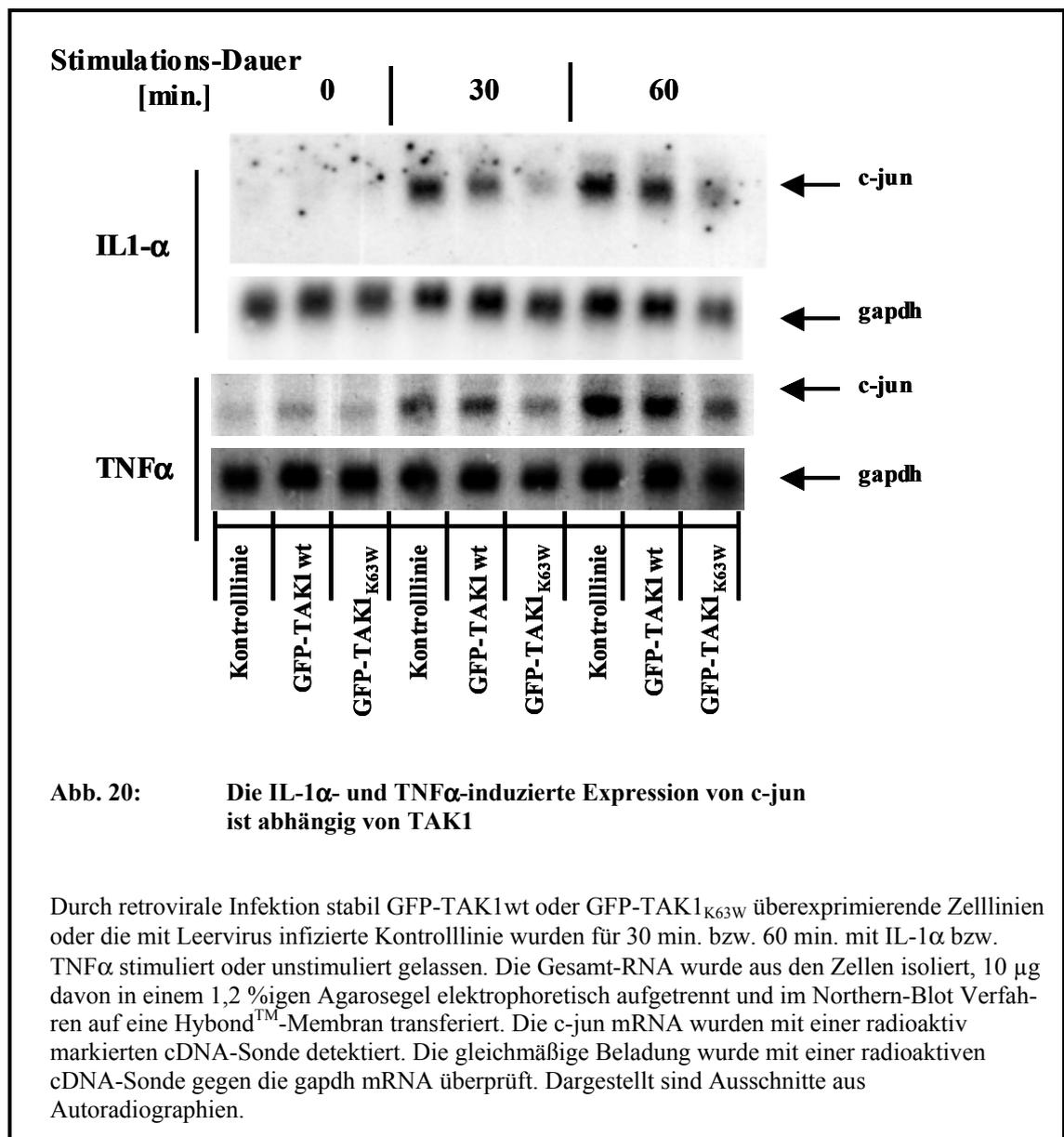
In dem Zeitraum von 0 - 60 Minuten wurde die Expression der Gene c-jun, c-fos und c-myc untersucht. Bei c-Jun und c-Fos handelt es sich um prototypische Komponenten des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 (*Activating Protein-1*), der an die Promotoren vieler inflammatorisch relevanter Gene bindet und zu deren Transkription beiträgt. Beide werden mit einer sehr schnellen Kinetik durch IL-1 α und durch TNF α induziert und zur Gruppe der „*immediate early genes*“ gerechnet. Ebenfalls zu dieser Gruppe gehört c-myc, das für einen Zellzyklus-regulierenden Transkriptionsfaktor codiert, das aber nicht durch IL-1 α oder TNF α reguliert wird. Die Regulation dieses Genes wurde untersucht um auszuschließen, dass mögliche beobachtete Veränderungen der Regulation von c-fos oder c-jun in einer der Zelllinien auf basale Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien in der Expression von *immediate early genes* zurückzuführen ist.

Das Ergebnis der Untersuchung des *c-fos* Genes wird in Abbildung 19 gezeigt. Wie man erkennen kann induzieren $IL-1\alpha$ und $TNF\alpha$ mit einer sehr schnellen und transienten Kinetik die Expression der *c-fos* mRNA: In unstimuliertem Zustand wird keine *c-fos* mRNA detektiert, nach 30 Minuten gibt es ein starkes Signal, das nach 60 Minuten wieder auf fast basales Niveau gesunken ist. Die Kinetik der Induktion entspricht den aus der Literatur bekannten Daten. Sie ist ebenso wie die Expressionstärke in allen drei Zelllinien gleich. Damit ist *c-fos* ein Beispiel für ein Gen, das durch $IL-1\alpha$ und durch $TNF\alpha$ induziert wird und – trotz der Inhibition der drei wichtigsten Stress-Signalwege – nicht durch die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante inhibiert wird.



Die Expression einer anderen AP-1-Komponente *c-jun* wurde auf die gleiche Weise untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 zu sehen.

Die Induktion der c-jun-Expression zeigt einen anderen Verlauf als diejenige von c-fos. Nach 30 Minuten Stimulation mit IL-1 α oder TNF α steigt die mRNA-Menge deutlich an, nimmt aber im Unterschied zu c-fos bis zum Zeitpunkt von 60 Minuten weiter zu. Die Induktion durch IL-1 α ist stärker als die durch TNF α . Bei beiden Stimuli ist die Expression der c-jun mRNA in der Zelllinie mit der katalytisch inaktiven GFP-TAK1_{K63W}-Mutante deutlich gehemmt, wobei die Hemmung nach IL-1 α -Stimulation stärker und deutlicher ist als nach TNF α -Stimulation. Damit ist c-jun ein Beispiel für ein „*immediate early gene*“, das durch beide Cytokine induziert wird und das durch die Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante inhibiert wird.



Als drittes Gen aus der Gruppe der *immediate early genes* wurde c-myc untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 21.

Wie erwartet, ist keine Regulation des *myc*-Genes im untersuchten Zeitraum durch $\text{TNF}\alpha$ oder durch $\text{IL-1}\alpha$ zu beobachten. Alle Zelllinien zeigen zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine gleichmäßig hohe Expression der *c-myc* mRNA. Zu beobachtende Unterschiede korrelieren mit einer ungleichmäßigen Beladung (Linie GFP-TAK1_{K63W}; 30 Minuten $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation)

Die Untersuchungen zum *c-fos*-Gen und zum *c-myc*-Gen zeigen, dass die Inhibition der $\text{IL-1}\alpha$ - und $\text{TNF}\alpha$ -induzierten *c-jun*-Expression ist nicht auf einen generellen Defekt der GFP-TAK_{K63W}-Linie in der Expression und Regulation von *immediate early genes* zurückzuführen ist und ebenfalls nicht auf eine prinzipielle Unfähigkeit dieser Zelllinie, auf $\text{IL-1}\alpha$ oder $\text{TNF}\alpha$ zu reagieren.

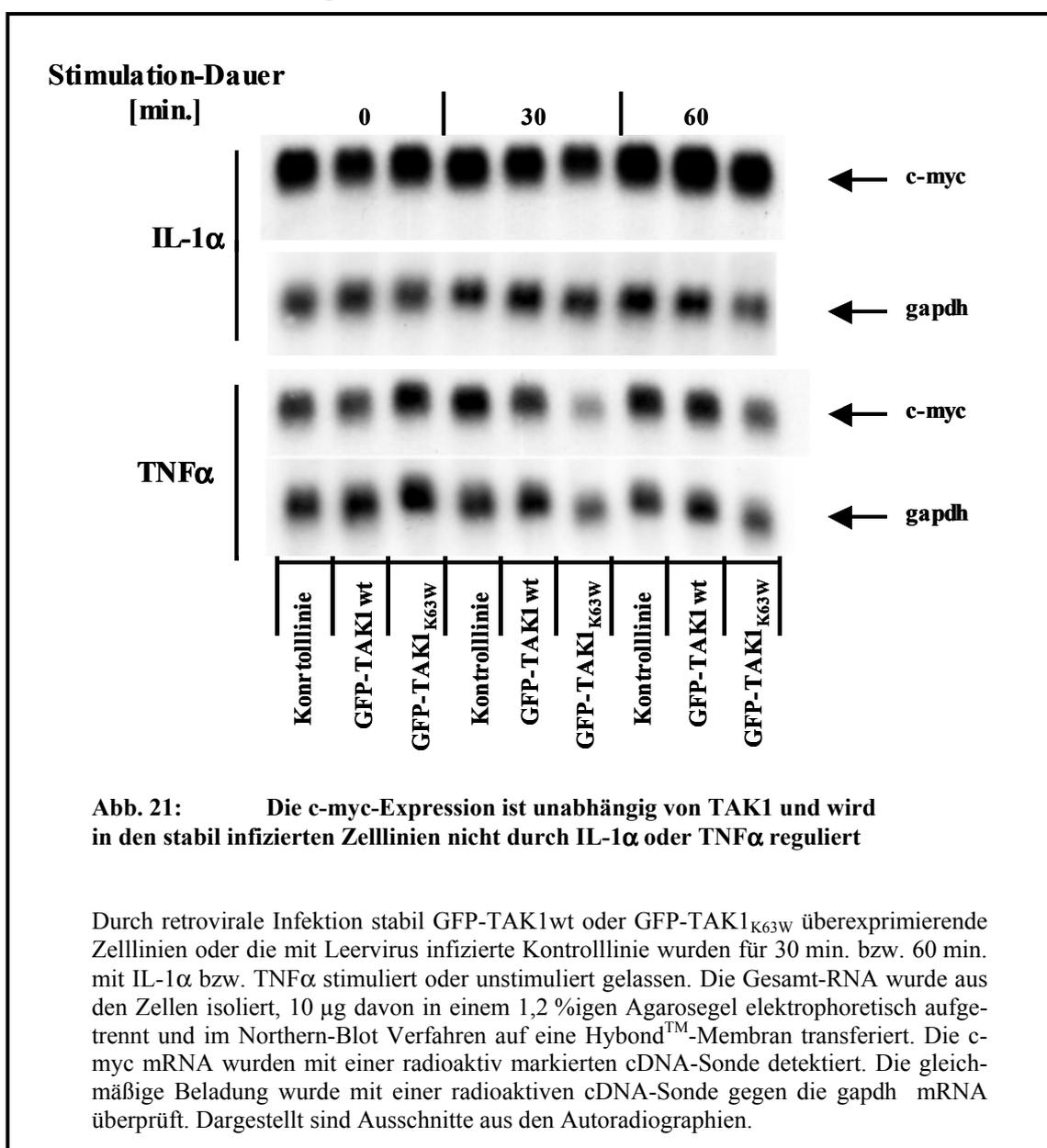


Abb. 21: Die *c-myc*-Expression ist unabhängig von TAK1 und wird in den stabil infizierten Zelllinien nicht durch $\text{IL-1}\alpha$ oder $\text{TNF}\alpha$ reguliert

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder die mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurden für 30 min. bzw. 60 min. mit $\text{IL-1}\alpha$ bzw. $\text{TNF}\alpha$ stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert, 10 μg davon in einem 1,2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und im Northern-Blot Verfahren auf eine HybondTM-Membran transferiert. Die *c-myc* mRNA wurden mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde detektiert. Die gleichmäßige Beladung wurde mit einer radioaktiven cDNA-Sonde gegen die *gapdh* mRNA überprüft. Dargestellt sind Ausschnitte aus den Autoradiographien.

Im zweiten Zeitraum von 0 - 8 Stunden wurde die Expression von Genen untersucht, deren Produkte einen biologischen Effekt im Entzündungsprozess ausüben. Zu dieser

Gruppe gehören beispielsweise die Chemokine, Enzyme zur Synthese sekundärer entzündungsrelevanter Metabolite wie die Cyclooxygenase 2 (Cox-2) oder die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) und Adhäsionsmoleküle. Stellvertretend für diese Gruppe wurde die Regulation des Chemokines MCP-1 und von Cox-2 untersucht. Dazu wurden die Zellen für vier oder acht Stunden mit IL-1 α bzw. TNF α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Expression der mcp-1 mRNA und der cox-2 mRNA aus diesen Zellen wurde im Northern-Blot Verfahren untersucht. Die Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse für mcp-1:

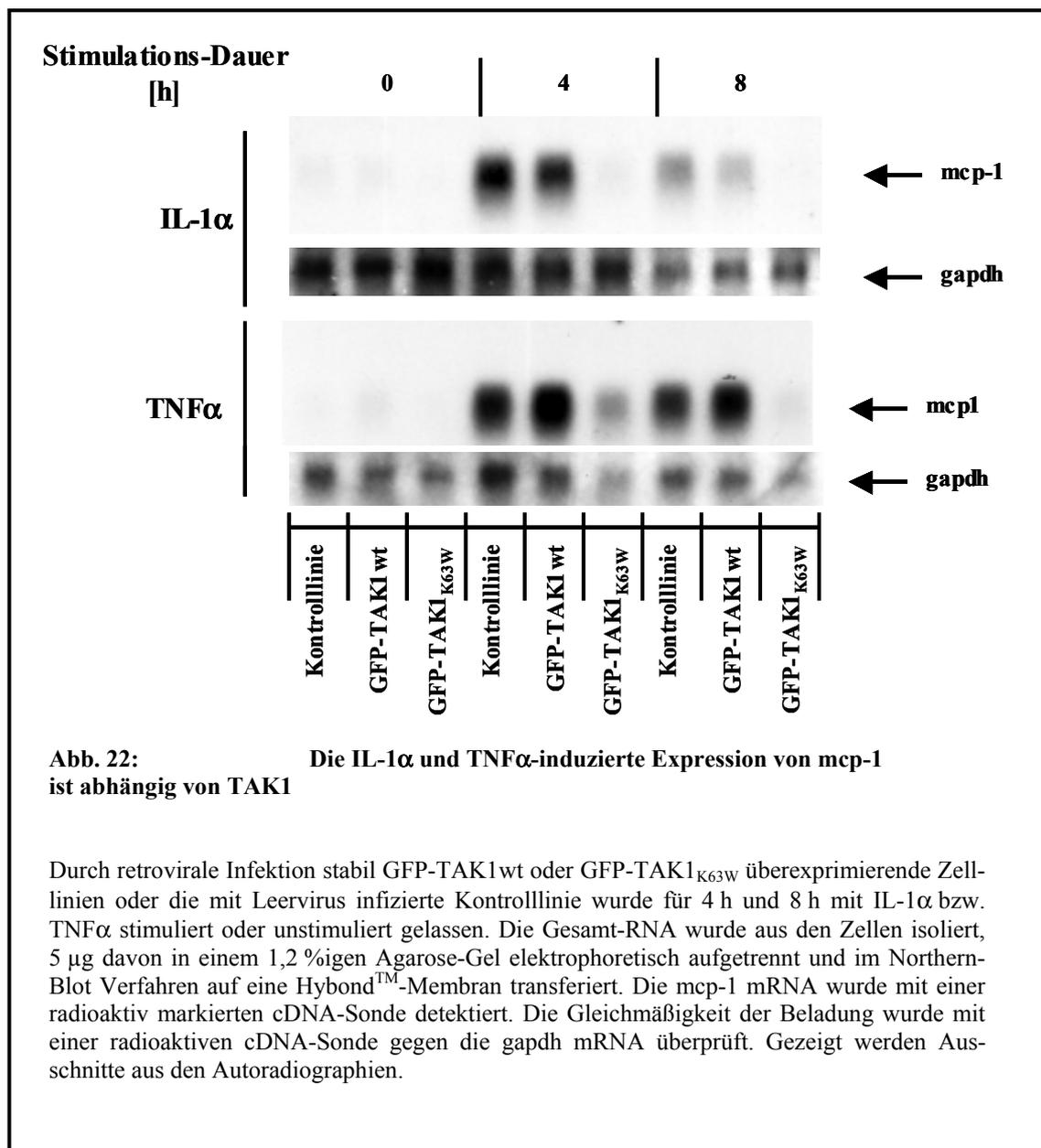


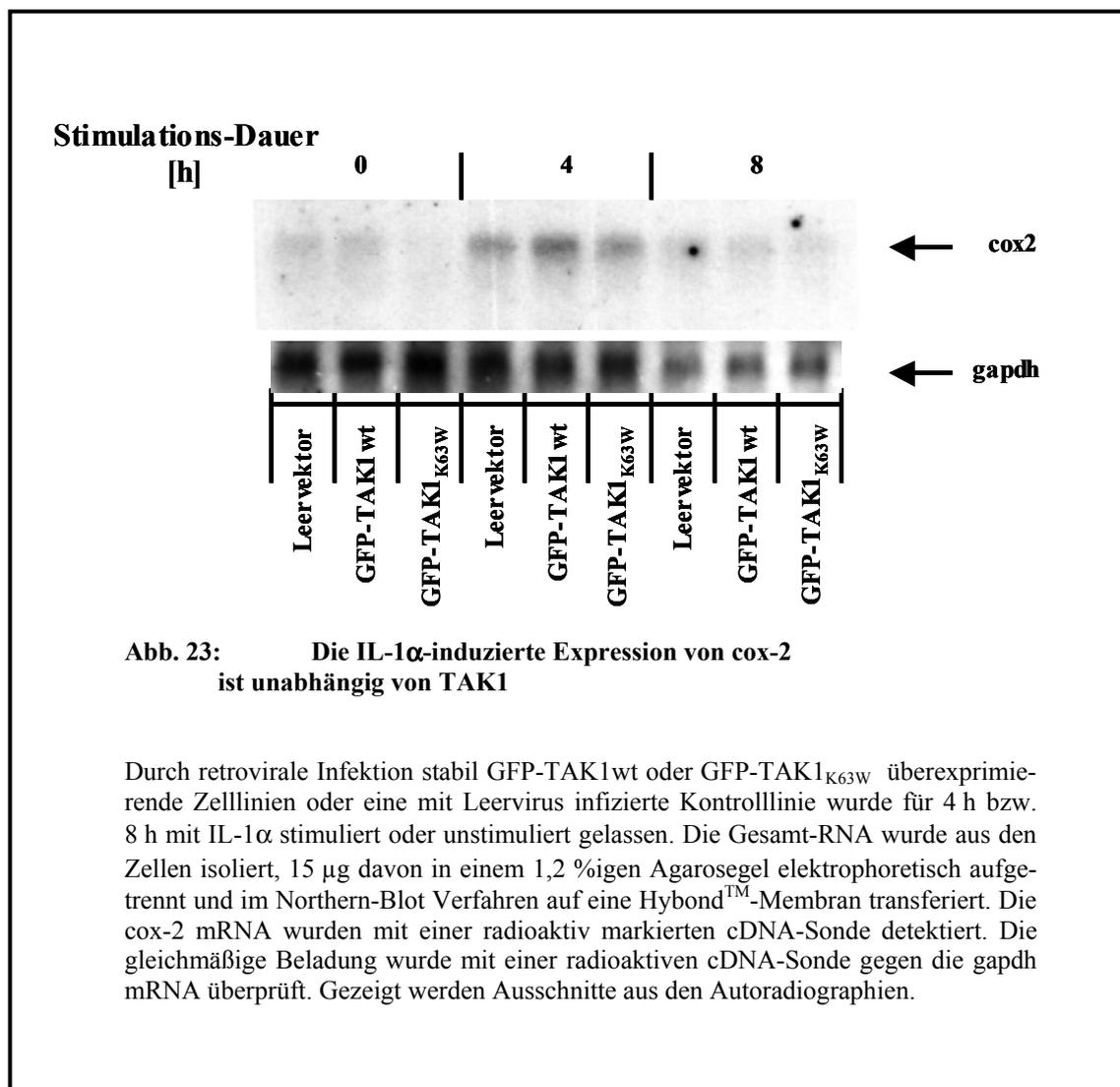
Abb. 22: Die IL-1 α und TNF α -induzierte Expression von mcp-1 ist abhängig von TAK1

Durch retrovirale Infektion stabil GFP-TAK1 wt oder GFP-TAK1_{K63W} überexprimierende Zelllinien oder die mit Leervirus infizierte Kontrolllinie wurde für 4 h und 8 h mit IL-1 α bzw. TNF α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert, 5 μ g davon in einem 1,2 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Northern-Blot Verfahren auf eine HybondTM-Membran transferiert. Die mcp-1 mRNA wurde mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde detektiert. Die Gleichmäßigkeit der Beladung wurde mit einer radioaktiven cDNA-Sonde gegen die gapdh mRNA überprüft. Gezeigt werden Ausschnitte aus den Autoradiographien.

Die mcp-1 mRNA wird im basalen Zustand in keiner der drei Zelllinien detektiert. Nach vierstündiger Stimulation mit IL-1 α oder TNF α ist die mcp-1 mRNA in der Kontrollli-

nie und in der Wildtyp-Linie sehr stark exprimiert und nach acht Stunden immer noch deutlich exprimiert. Die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Expression ist stärker als die $\text{IL-1}\alpha$ -induzierte Expression. In der GFP-TAK1_{K63W}-Linie ist die Expression nach $\text{IL-1}\alpha$ -Stimulation komplett gehemmt. Bei Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ ist die Hemmung auch sehr stark, nach vierständiger Stimulation ist *mcp-1*-mRNA nur sehr schwach exprimiert und liegt nach achtständiger Stimulation nur auf basalem Niveau.

Das zweite untersuchte Gen in diesem Zeitfenster war das *cox-2*-Gen. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der Northern-Blot Untersuchung.



Im unstimulierten Zustand wird die *cox-2* mRNA nur sehr schwach exprimiert. Nach vierständiger Stimulation mit $\text{IL-1}\alpha$ ist die Expression eindeutig induziert und liegt nach achtständiger Stimulation wieder auf basalem Niveau. Die Expression und die

Induktion der Expression ist in allen drei Zelllinien vergleichbar und wird durch die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante nicht inhibiert. Mit TNF α konnte in diesen Zelllinien keine cox-2 Expression nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zur Genregulation in den drei Zelllinien zeigten, dass die Inhibition der wichtigsten Stress-Signalwege durch die katalytisch inaktive GFP-TAK1_{K63W}-Mutante auch in einer Inhibition der Expression bestimmter entzündungsrelevanter Gene resultiert (mcp-1, c-jun). Diese Gene sind wichtig und repräsentativ für genregulatorische Vorgänge bei einer Entzündung. Es wurde deutlich, dass die Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante ein prinzipieller Weg sein kann, um biologische Wirkungen der proinflammatorischen Cytokine IL-1 α und TNF α zu unterdrücken. Bemerkenswert an den Ergebnissen ist auch, dass die Gene, die durch TAK1 inhibiert werden, nahezu vollständig inhibiert werden, und nicht nur partiell.

Um ein erweitertes Bild von den biologischen Auswirkungen der Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante zu bekommen, wurde TNF α -induzierte Genexpression in den Zelllinien mit Hilfe von hochdichten cDNA-*Arrays* untersucht, auf denen die cDNA von 10.000 verschiedenen Maus-Genen vorliegen. Dabei erfolgte eine Fokussierung auf die TNF α -induzierte Genexpression in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie und die mit Leervirus infizierte Zelllinie als Referenz. Diese Arbeiten erfolgten in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Fred Mushinsky, NIH, Washington.

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte in unserem Labor nach dem Standardprotokoll zur Herstellung von RNA für die Northern-Blot Analyse. Die Herstellung der fluoreszenz-markierten cDNA aus den RNA-Proben, die Hybridisierung der *Arrays* und die anschließende Detektion der hybridisierten cDNA erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Mushinsky. Zur Markierung wurden verschieden kommerziell erhältliche *Kits* verwendet, mit denen die aus den RNA-Proben hergestellte cDNA mit den Farbstoffen Cy3 oder Cy5 markiert wurde. Die Hybridisierung der Proben erfolgte als Co-Hybridisierung beider Proben auf einem *Array*, wobei beide Proben mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert wurden. Die Detektion der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Proben erfolgte dann in einem speziellen Scanner in getrennten Kanälen für Cy3 und Cy5. Die Daten konnten durch ein vom NCI (*National Cancer Institute*) zur Verfügung gestelltes Internet-Portal mit verschiedenen Software-Analyse-Werkzeugen ausgewertet werden.

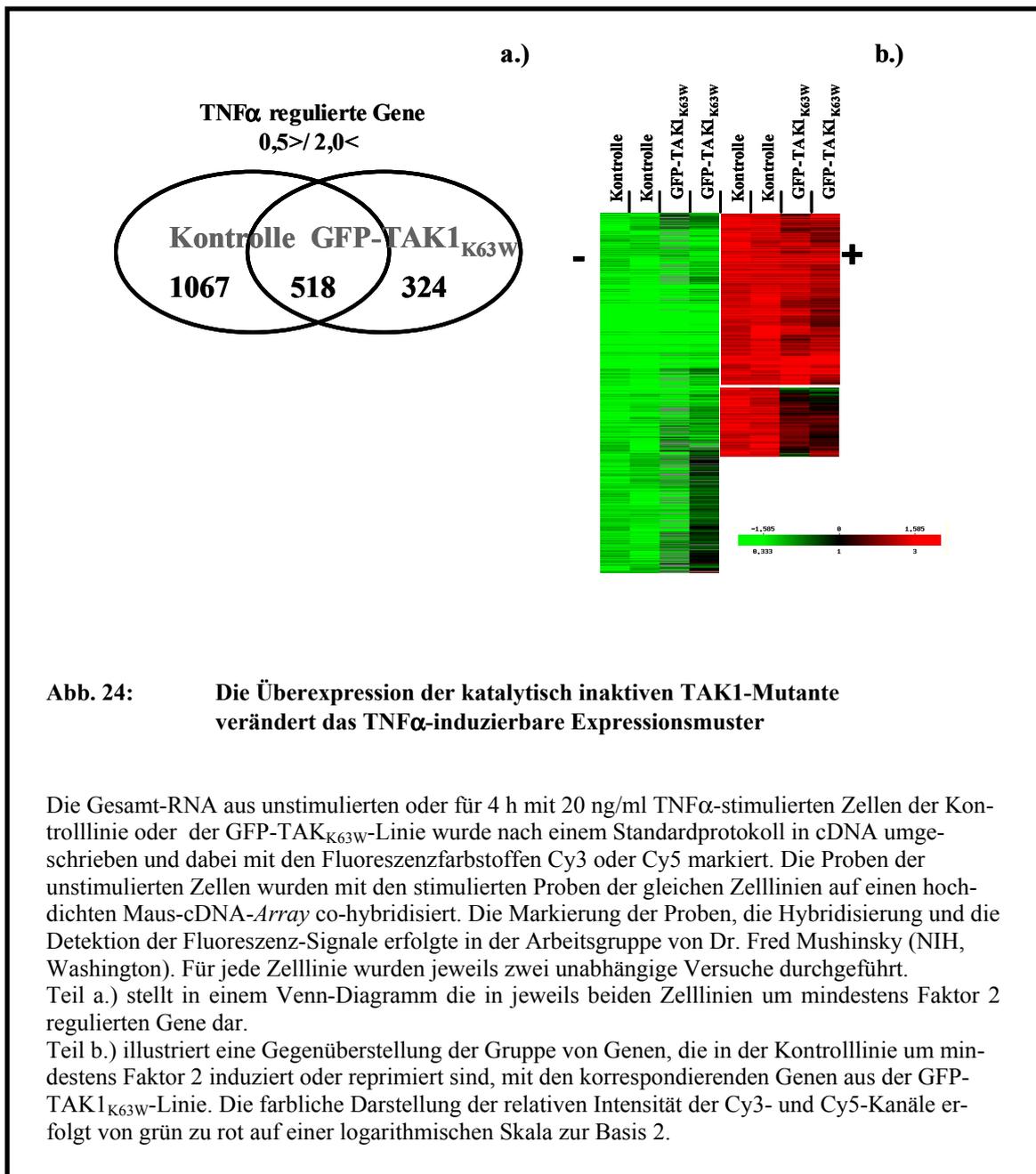
Es wurden nur die Daten von solchen Fluoreszenzpunkten berücksichtigt, deren Signalintensität in beiden Kanälen mindestens 25 Einheiten betrug. Außerdem wurden solche

Fluoreszenzpunkte von der Analyse ausgeschlossen, deren Qualität von einem Algorithmus als „schlecht“ eingestuft wurde. Zur Berechnung der Signalintensität wurde die mittlere Signalintensität des Hintergrundes abgezogen und die Normalisierung der Signale erfolgte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität der jeweiligen Kanäle.

In einer ersten Serie von Experimenten wurde die Genexpression in beiden Zelllinien nach vierstündiger Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ im Vergleich zur Genexpression der jeweils unstimulierten Zellen untersucht. Dabei konnte in der Kontrolllinie die Expression von insgesamt 7569 Genen nachgewiesen und in der Zelllinie mit der katalytisch inaktiven Mutante von 7417 Genen. Von diesen Genen wurde die Expression von 7260 Genen in beiden Zelllinien nachgewiesen, was zeigt, dass die überwiegende Anzahl von exprimierten Genen in beiden Linien unverändert ist.

Um zu untersuchen, wie sich die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation in beiden Zelllinien auswirkt, wurden aus beiden Zelllinien jene Gene herausgefiltert, die mindestens um den Faktor 2 reguliert waren. Beide gefilterten Gengruppen wurden miteinander verglichen. Das Ergebnis des Vergleiches ist in Abbildung 24 a.) zusammengefasst.

In der Kontrolllinie werden 1585 Gene durch $\text{TNF}\alpha$ induziert oder reprimiert und in der Linie mit der katalytisch inaktiven Mutante 842 Gene. Von diesen Genen werden in beiden Linien gemeinsam 518 Gene, also nur rund ein Drittel, bzw. die Hälfte der $\text{TNF}\alpha$ -regulierten Gene, der beiden Zelllinien gemeinsam mindestens um den Faktor 2 reguliert. Dadurch zeigt sich, dass die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Genexpression durch die Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante stark beeinflusst wird. Veranschaulicht wird dies in Abbildung 24 b.). Hier wurden in der Kontrolllinie regulierte Gene gefiltert, in eine induzierte und eine reprimierte Gengruppe aufgeteilt und zusammen mit den korrespondierenden Genen aus der GFP-TAK1_{K63W}-Linie anhand einer Farbskala dargestellt. Man erkennt, dass ein Teil der Gene noch normal reguliert ist, dass aber die Expression von vielen Genen in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie im Vergleich zur Kontrolllinie verändert ist.



Diese Versuchsanordnung ist geeignet, um Aufschlüsse über die relative Induktion von Genexpression in den beiden Linien zu bekommen, bezogen auf den Basalzustand der jeweiligen Zelllinie. Viele TNF α -induzierte Gene, die zur Auslösung einer Entzündung relevant sind, codieren für sezernierte Proteine. Entscheidend für ihre biologische Wirkung ist ihre absolute Menge. Aus diesem Grund wurde in einem zweiten Ansatz untersucht, wie sich die überexprimierte TAK1-Mutante auf die TNF α -induzierte Genexpression im Vergleich zur TNF α -induzierten Kontrolle auswirkt. Dazu wurden stimulierten Proben von beiden Zelllinien direkt gegeneinander hybridisiert. Es wurden drei unabhängige Experimente auf diese Art durchgeführt, wobei in

einem Experiment die Proben umgekehrt markiert wurden, um Artefakte durch unterschiedliche Effizienz bei der Probenmarkierung auszuschließen.

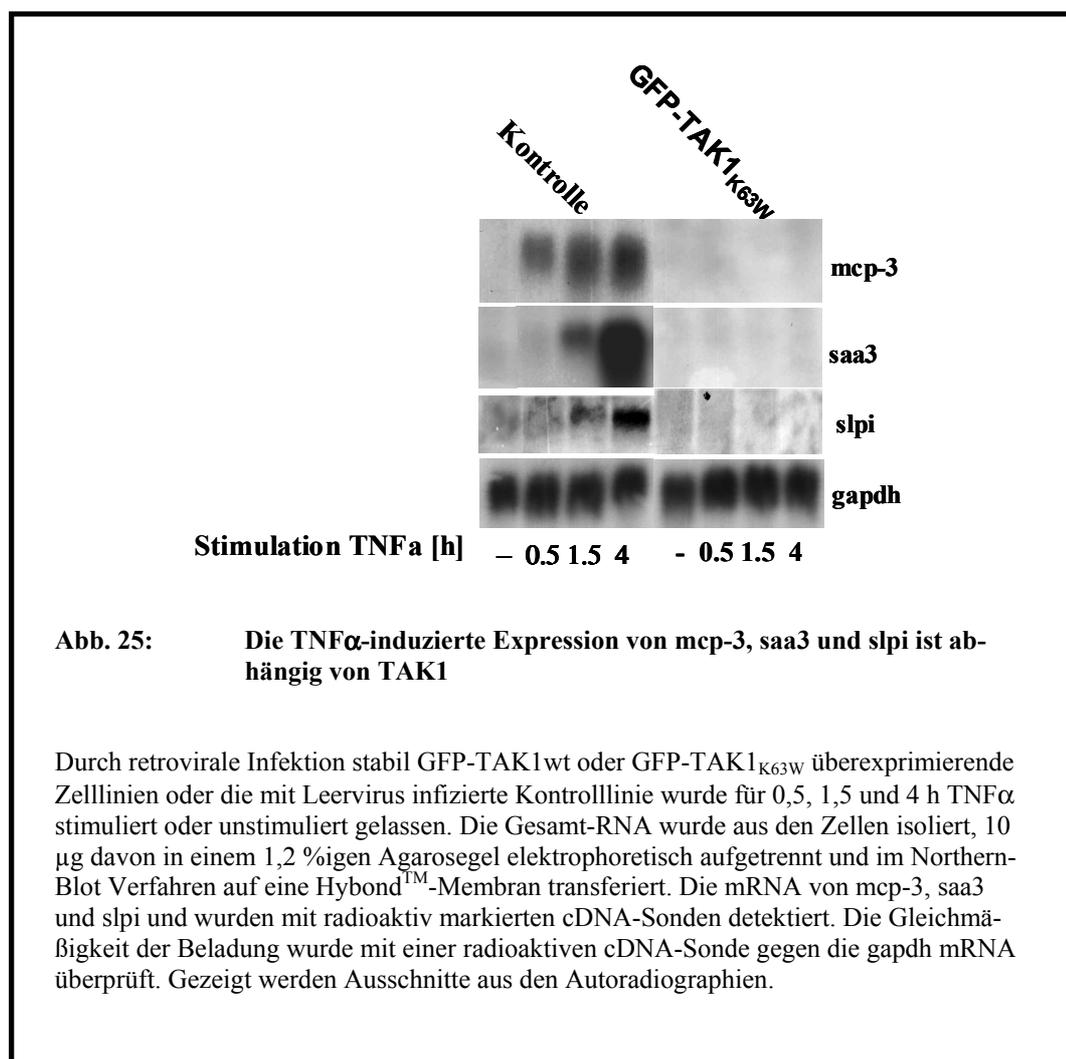
Die Auswertung dieser Experimente ergab, dass in allen drei Experimenten nur 26 Gene durch die TAK1-Mutante inhibiert, und 37 durch sie induziert wurden. Die Gene sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2 : Liste TNF α -regulierten Gene, die abhängig von TAK1 sind

Quotient der Fluoreszenzintensitäten			Quotient der Intensitäten Kontrolle/GFP-TAK _{K63W}		Gen Nummer	Gen	Beschreibung
Exp.1	Exp.2	Exp.3	mean	S.E.M			
0,04	0,06	32,28	0,05	0,01	Mm.16091	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7 (MCP-3)
0,08	0,04	37,23	0,05	0,02	Mm.14277	Saa3	serum amyloid A 3 (SAA3)
0,13	0,11	9,83	0,11	0,01	Mm.1987	Dcn	decorin
0,15	0,28	5,90	0,20	0,05	Mm.213137	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP-1)
0,17	0,27	4,51	0,22	0,03	Mm.9114	Crym	crystallin
0,16	0,12	2,56	0,22	0,11	Mm.22650	Serpina3n	serine (or cysteine) proteinase inhibitor
0,16	0,34	5,63	0,23	0,07	Mm.19131	C3	complement component 3
0,29	0,26	6,73	0,24	0,06	Mm.4376	Chi3l1	chitinase 3-like 1
0,17	0,31	3,64	0,25	0,06	Mm.33771		RIKEN cDNA E030030F06
0,27	0,36	4,77	0,28	0,05	Mm.3869	Prrx1	paired related homeobox 1
0,18	0,48	2,70	0,35	0,11			unknown
0,26	0,36	2,23	0,35	0,06	Mm.3157	Fgfr1	fibroblast growth factor receptor 1
0,39	0,44	4,12	0,36	0,08	Mm.1395	Slpi	secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)
0,22	0,41	2,17	0,36	0,10	Mm.34368		RIKEN cDNA 1810019A08
0,32	0,29	2,06	0,36	0,08	Mm.222679	Nfatc3	nuclear factor of activated T-cells
0,40	0,30	2,57	0,36	0,04	Mm.140084		EST
0,46	0,49	6,04	0,37	0,14	Mm.3383	Ager	advanced glycosylation end product-specific receptor
0,35	0,40	2,74	0,37	0,02	Mm.42163	Casp12	caspase 12
0,48	0,29	2,66	0,38	0,06	Mm.3527	Ccng2	cyclin G2
0,29	0,50	2,50	0,40	0,07	Mm.2433	Man2a1	mannosidase 2, alpha 1
0,49	0,32	2,46	0,41	0,06	Mm.24038	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2
0,35	0,41	2,11	0,41	0,04	Mm.26688	Thbs2	thrombospondin 2
0,39	0,47	2,19	0,44	0,03	Mm.3288	Trim30	tripartite motif protein 30
0,39	0,46	2,05	0,45	0,04	Mm.28197	Crot	carnitine O-octanoyltransferase
0,45	0,47	2,34	0,45	0,01	Mm.112664		RIKEN cDNA 2310036D22
2,14	0,20	15,35	0,80	0,89	Mm.4257	Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1
2,16	2,46	0,50	2,21	0,17	Mm.1791	Dusp6	dual specificity phosphatase 6
2,36	2,27	0,49	2,23	0,12	Mm.40759		EST
2,85	2,21	0,48	2,38	0,31	Mm.24780		EST
2,31	2,26	0,38	2,40	0,15	Mm.34269		EST
2,57	2,39	0,44	2,40	0,11	Mm.35762		EST
2,65	2,02	0,39	2,41	0,26	Mm.105258		EST
2,12	2,14	0,33	2,44	0,41			unknown
2,59	2,18	0,37	2,50	0,21	Mm.227452	LOC211945	hypothetical protein LOC211945
3,31	2,09	0,47	2,51	0,54	Mm.33603		EST
2,09	3,25	0,44	2,54	0,47	Mm.14775		similar to germinal histone H4 gene
3,20	2,31	0,43	2,61	0,39	Mm.31359		ESTs
3,38	2,71	0,47	2,74	0,42	Mm.35111		EST
3,78	2,50	0,48	2,78	0,67	Mm.36573		EST
3,33	2,35	0,36	2,83	0,33			unknown
2,34	3,08	0,30	2,93	0,39	Mm.74758		RIKEN clone:E030040G24
3,64	3,04	0,47	2,94	0,54	Mm.259321		EST
2,77	3,73	0,38	3,05	0,45	Mm.251308		RIKEN cDNA 2810427A07
4,84	2,62	0,49	3,17	1,12	Mm.4218	Tob1	transducer of ErbB-2.1
4,15	2,90	0,36	3,27	0,59			unknown
4,01	3,99	0,38	3,55	0,60	Mm.156002		RIKEN clone:9530076L18
2,49	5,25	0,33	3,59	1,10	Mm.27866	AA409940	expressed sequence AA409940
4,28	3,62	0,35	3,59	0,48	Mm.33385		RIKEN cDNA 1200016G03
3,20	4,68	0,28	3,81	0,58	Mm.30262	Klf5	Kruppel-like factor 5
5,22	4,25	0,40	3,99	1,00	Mm.2271	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
2,49	6,41	0,30	4,08	1,56	Mm.4159	Thbs1	thrombospondin 1
3,51	7,06	0,34	4,51	1,70	Mm.903	Btg2	B-cell translocation gene 2 (Bcl-2)
7,08	5,25	0,46	4,83	1,78	Mm.1359	Plaur	urokinase plasminogen activator receptor
4,08	6,68	0,24	4,96	1,14	Mm.52043		EST
5,33	7,55	0,43	5,07	1,82	Mm.9653	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
2,41	9,58	0,29	5,14	2,96	Mm.243085	LOC223886	hypothetical protein LOC223886
2,52	9,66	0,30	5,16	3,00	Mm.33832		RIKEN cDNA 3021401A05
5,76	5,37	0,22	5,19	0,49	Mm.4661	Dtr	diphtheria toxin receptor
7,69	5,83	0,39	5,36	1,86	Mm.1360	Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta
4,51	9,49	0,23	6,09	2,27	Mm.89859		RIKEN cDNA 2610524G09
2,43	3,79	0,08	6,12	4,01	Mm.154286		RIKEN cDNA 4921528G01
6,98	14,57	0,13	9,70	3,25	Mm.1231	Cyr61	cysteine rich protein 61
5,84	16,78	0,11	10,60	4,12	Mm.5043	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene

In der Gruppe der reprimierten Gene befinden sich viele Gene, die unmittelbar eine Rolle bei der Entzündung spielen. Dazu gehören die Gene der beiden Chemokine mcp-1 und mcp-3, serum amyloid A3 (saa3), der sezernierte Protease-Inhibitor slpi (*secretory leukocyte protease inhibitor*) und die Komplement-Komponente-3 (C3).

Um die mit dem hochdichten *Array* erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und weil diese Gene eine unmittelbare, bekannte Relevanz für die Entzündung haben, wurde die Genexpression von mcp-3, saa3 und slpi durch Northern-Blot Untersuchungen überprüft. Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Abbildung 25 gezeigt. Für alle drei nachuntersuchten Gene konnte die Inhibition durch die katalytisch inaktive TAK1-Mutante bestätigt werden. Auffällig ist hier wiederum, dass die Expression der Gene nicht nur partiell, sondern vollständig gehemmt ist. Die Daten sprechen dafür, dass die Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante dazu führt, dass die Expression einer nur relativ kleinen Gruppe von entzündungsrelevanten Genen durch TAK1 gehemmt wird, diese allerdings sehr stark.



4.10 Untersuchung der TNF α -induzierten Apoptose in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie

Während der Untersuchungen zur Genexpression in den drei Zelllinien trat als unerwartetes Phänomen selektiv in der GFP-TAK1_{K63W}-Zelllinie nach Stimulation mit TNF α ein signifikanter Zelltod auf. Die betroffenen Zellen waren charakterisiert durch den Verlust der Zelladhärenz, Abrundung ihrer Form und eine zerklüftete Morphologie der Zellmembran.

Zunächst wurden Cytotoxizitätsversuche durchgeführt, um das Ausmaß und die Geschwindigkeit des Zelltodes zu quantifizieren. Dazu wurden Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten kultiviert, mit TNF α stimuliert und der Zeitverlauf des Zelltodes mit Hilfe einer Vitalfärbung verfolgt. Das Ergebnis ist als Graph in der Abbildung 26 dargestellt.

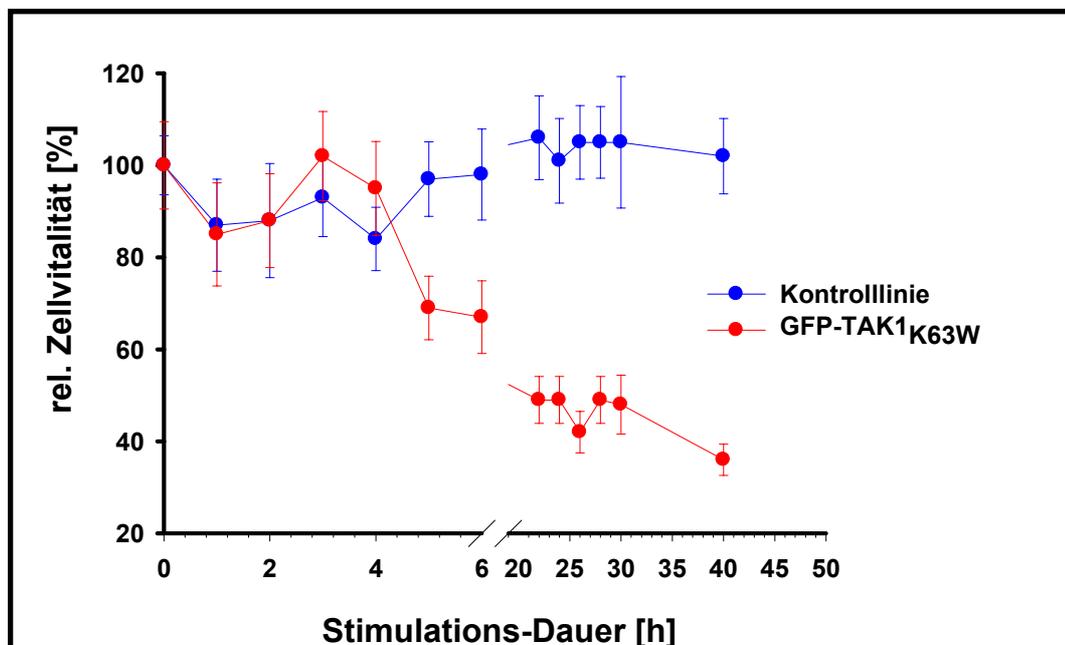


Abb. 26: Untersuchung des Zeitverlaufes des TNF α -induzierten Zelltodes in der GFP-TAK_{K63W}-Linie

In einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden 1×10^5 Zellen pro Loch der Kontrolllinie oder der GFP-TAK1_{K63W}-Linie ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden für die induzierten Zeiträume mit TNF α (20 ng/ μ l) stimuliert oder unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die vitalen Zellen nach Standardprotokoll mit dem Farbstoff Neutralrot gefärbt und in 150 μ l Methanol-Sörensen-Puffer lysiert. Die Extinktion des Farbstoffes in den Lysaten wurde in einem *Elisa-Reader* bei 550 nm bestimmt. Sie ist ein direktes Maß für die Zahl noch vitaler Zellen jedes Messpunktes. In dem Graph wird die Extinktion der Messpunkte bezogen auf die Extinktion der unstimulierten Proben als relative Zellvitalität ausgedrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je zwei Messpunkten von einem repräsentativen Versuch mit den zugehörigen mittleren Standardfehlern.

TNF α verursacht in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie eine Abnahme an vitalen Zellen, wie an dem Graph zu erkennen ist. Durch den Versuch wird ab dem Zeitpunkt von 4,5 Stunden eine erste deutliche Abnahme auf 70 % Vitalität der unstimulierten Kontrollen detektiert, nach 24 Stunden eine weitere Abnahme auf ca. 50 % und nach 40 Stunden auf ca.40 %. Die Vitalität der Kontrolllinie dagegen bleibt durch TNF α -Stimulation unbeeinflusst. Ein vergleichbares Bild ergibt die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Apoptose durch einen Cytotoxizitätsversuch. Dazu wurden Zellen der Kontrolllinien und der GFP-TAK1_{K63W}-Linie über Nacht mit TNF α stimuliert. Das Ausmaß des Zelltodes wurde wiederum durch eine Vitalfärbung untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 zu sehen.

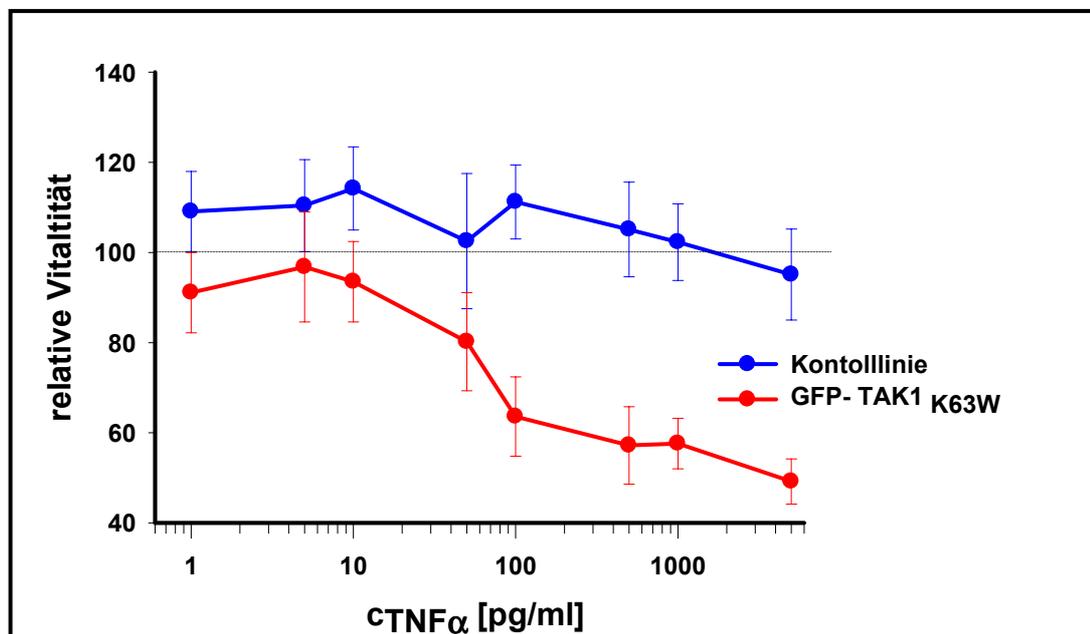


Abb. 27: Die GFP-TAK_{K63W}-Linie ist sehr stark für TNF α -induzierten Zelltod sensitiviert

In einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden 1×10^5 Zellen pro Loch der Kontrolllinie oder der GFP-TAK1_{K63W}-Linie über ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht mit TNF α (20 ng/ μ l) stimuliert oder unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die vitalen Zellen nach Standardprotokoll mit dem Farbstoff Neutralrot gefärbt und in 150 μ l Methanol-Sörensen-Puffer lysiert. Die Extinktion des Farbstoffes in den Lysaten wurde in einem *Elisa-Reader* bei 550 nm bestimmt. Sie ist ein direktes Maß für den Zahl noch vitaler Zellen jedes Messpunktes. In dem Graph wird die Extinktion der Messpunkte bezogen auf die Extinktion der unstimulierten Proben als relative Zellvitalität ausgedrückt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je zwei Messpunkten von einem repräsentativen Versuch mit den zugehörigen mittleren Standardfehlern.

Der Versuch zeigt eine deutliche TNF α -Dosisabhängigkeit des Zelltodes der GFP-TAK1_{K63W}-Linie. Ein Effekt auf die Kontrolllinie kann wiederum nicht beobachtet werden. Schon bei einer Konzentration von 50 pg/ml ist ein signifikanter Zelltod festzustellen (80 % vitale Zellen) und bei 500 pg/ml sind nur noch ca. 55 % der Zellen vital, ein Wert, der schon fast dem Niveau der höchsten eingesetzten Konzentration entspricht. TNF α ist also schon bei 1/40 der standardmäßig eingesetzten Konzentration von 20 ng/ μ l in der Lage, nahezu vollständig den beobachteten Zelltod zu induzieren. Der Versuch zeigt, dass die Überexpression der Mutante die Zellen sehr stark für den TNF α -induzierten Zelltod sensitiviert.

Die beiden Ergebnisse decken sich mit den mikroskopischen Beobachtungen, die zeigen, dass die TNF α -Stimulation selektiv bei der GFP-TAK1_{K63W}-Linie morphologische Veränderungen auslöst.

Prinzipiell unterscheidet man mehrere Arten des Zelltodes, z. B. Nekrose und Apoptose, welche einem programmierten Zelltod entspricht, der durch konservierte zelluläre Mechanismen ausgeführt wird. Kennzeichen der Apoptose sind Ablösung der Zellen von der extrazellulären Matrix, Einstülpungen der Plasmamembran, Kondensation und Fragmentierung des Chromatins und die Aktivierung von Caspasen, wobei Chromatin-Kondensation und Caspase-Aktivierung als entscheidende Kriterien für Apoptose angesehen werden.

Da TNF α bekanntermaßen in der Lage ist, neben der Genexpression über die Aktivierung der Stress-Signalwege als zweiten biologischen Effekt auch Apoptose zu induzieren, lag es nahe zu untersuchen, ob der beobachtete Zelltod ein apoptotischer Vorgang war.

Die ausführenden Enzyme apoptotischer Signalwege sind Caspasen, also Cystein-Proteasen, die ihre Substrate hinter einer Aspartat-Aminosäure an einer Konsensus-Substraterkennungssequenz schneiden. Caspasen liegen als Zymogene, also als inaktive Proformen in der Zelle vor. Man unterscheidet Initiator-Caspasen (Caspase8 und Caspase9), die auf Stimulation hin z. T. durch Selbst-Prozessierung in ihre katalytisch aktive Form überführt werden, und Effektor-Caspasen, die durch Initiator-Caspasen proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert werden. Die aktivierten Effektor-Caspasen ihrerseits zerstören die vitale Funktion zellulärer Proteine und lösen dadurch den Zelltod aus.

Der wichtigste durch TNF α induzierte apoptotische Signalweg ist die Aktivierung der Initiator-Caspase8, mittels ihrer Rekrutierung an den TNF-R1-Komplex über die Adap-

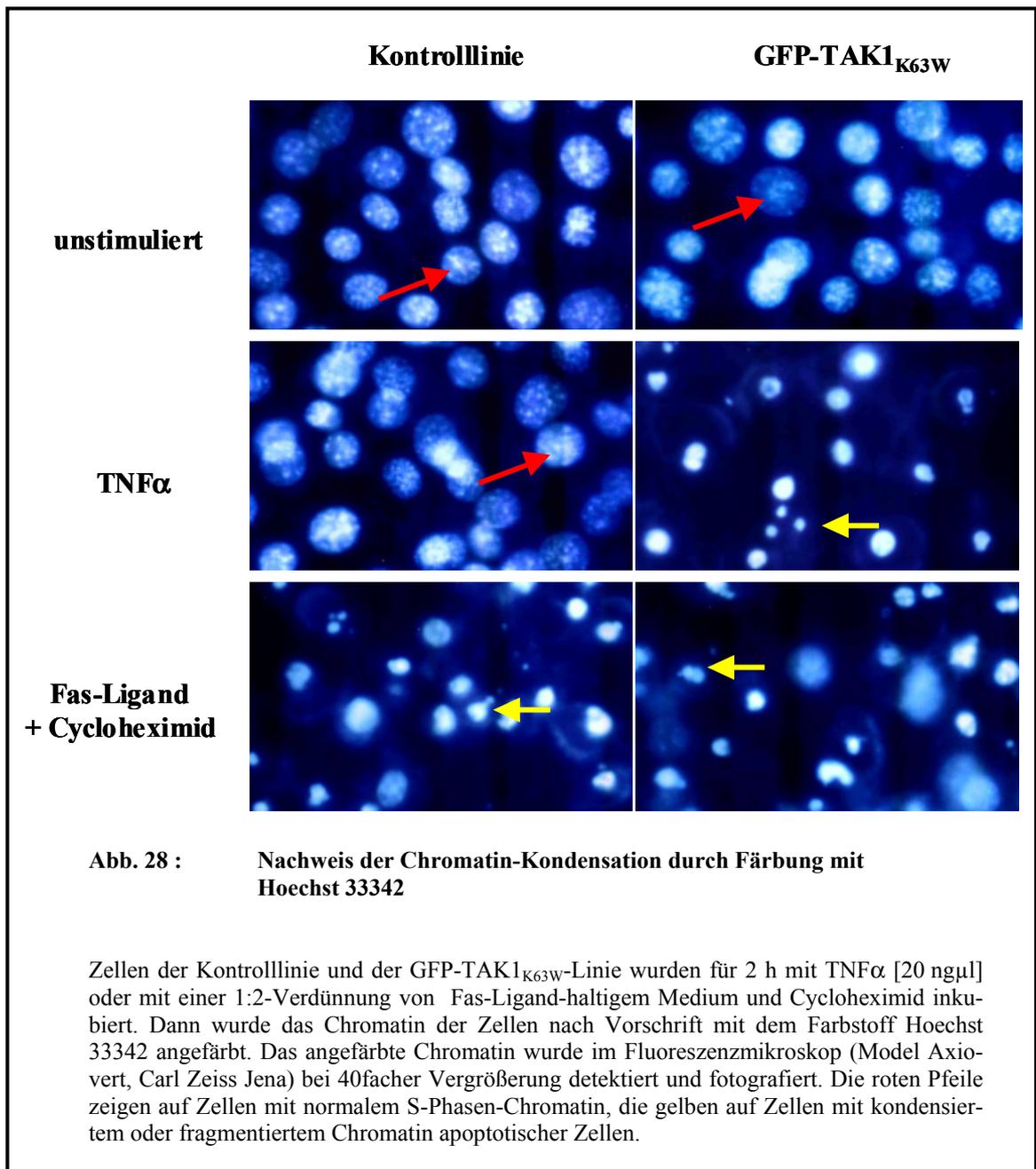
termoleküle TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*) und FADD (*Fas associated death domain protein*). Dieses führt zur autokatalytischen Prozessierung der 32 kDa großen Proform der Caspase8 in eine heterotetramere Form mit zwei katalytisch aktiven 18 kDa Untereinheiten, welche wiederum die Effektor-Caspase3 aktiviert.

Neben diesem schnellen Rezeptor-initiierten Signalweg gibt es in der Zellen einen zweiten Rezeptor-unabhängigen, apoptotischen Signalweg, der durch Stimuli wie DNA-Schäden oder den Entzug von Wachstumsfaktoren initiiert wird. Er führt über die Aktivierung der Pro-Caspase9 durch das Adaptermolekül Apaf-1 ebenfalls zur Aktivierung der Effektor-Caspase3, und wird initiiert durch die Inhibition von Apaf-1-Repressoren der Bcl-2-Familie und durch Freisetzung von Cytochrom-C aus der Mitochondrien-Membran, das mit Apaf-1 bei der Aktivierung der Pro-Caspase9 kooperiert. Die Signalwege, die zur Aufhebung der Apaf-1-Repression führen sind nicht gut charakterisiert.

Eine mögliche Verbindung beider Signalwege stellt Caspase8 dar, die Bid, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, aktiviert. Darüber hinaus wird eine Funktion der MAP-Kinase JNK bei der Aktivierung dieses Signalweges diskutiert, was eine weitere potentielle Verbindung zur TNF α -induzierten Apoptose ist. Jedoch induziert TNF α eine schnelle, transiente Aktivierung des JNK-Signalweges, wohingegen die Aktivierung des rezeptorunabhängigen apoptotischen Signalweges mit einer lange anhaltenden Aktivierung des JNK-Signalweges in Verbindung gebracht wird.

Der TNF-RI ist ein prototypisches Mitglied der Familie der Todesrezeptoren, die sich durch eine intrazelluläre Todesdomäne auszeichnen, die - wie oben für den TNF-RI beschrieben - mit Hilfe von Adaptermolekülen für die Stimulus-induzierte Rekrutierung und Aktivierung von Initiator-Caspasen entscheidend ist. Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist der Fas-Rezeptor, der u. a. durch Interaktion mit seinem natürlichen Liganden, dem Fas-Liganden, multimerisiert und ebenfalls die Caspase8 aktiviert. Die Stimulation mit dem Fas-Liganden kann daher als Vergleich und Positivkontrolle für rezeptorvermittelte Apoptose verwendet werden.

Wie erwähnt sind die Chromatin-Kondensation und Caspase-Aktivierung die entscheidenden Kennzeichen der Apoptose. Zunächst wurde untersucht, ob der beobachtete Zelltod mit Veränderungen des Chromatins einhergeht. Dazu wurden die Zellen mit TNF α oder als Positivkontrolle mit Fas-Ligand und Cycloheximid inkubiert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit dem zellpermeablen Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Dieser Farbstoff bindet an die DNA des Chromatins und fluoresziert bei UV-Bestrahlung blau bis weiß. Das Ergebnis des Versuches zeigt Abbildung 28:



Bei beiden Zelllinien ist im unstimulierten Zustand deutlich die diffuse, für Zellen der S-Phase typische Struktur des Chromatins zu erkennen. In der Kontrolllinie ist nach TNFα-Stimulation keine Änderung der Chromatin-Struktur zu beobachten. Die roten Pfeile in der Abbildung markieren beispielhaft Zellen, in denen diese verteilte Chromatin-Struktur gut zu erkennen ist.

In beiden Linien kommt es nach Inkubation mit Fas-Ligand und Cycloheximid deutlich zu kondensiertem und teilweise fragmentiertem Chromatin. In der Abbildung sind Beispiele für solche Zellen mit gelben Pfeilen markiert. Im Gegensatz zu den Zellen der

Kontrolllinie induziert $\text{TNF}\alpha$ in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie sehr stark die Kondensation und Fragmentierung des Chromatins in allen Zellen.

Der Vergleich mit den Positivkontrollen und den unstimulierten Kontrollen zeigt eindeutig, dass der $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Zelltod und der GFP-TAK1_{K63W}-Linie mit Chromatin-Kondensation assoziiert ist und damit sehr wahrscheinlich ein apoptotisches Phänomen ist.

Weiterhin wurde überprüft, ob der Zelltod mit der Aktivierung von Caspasen einhergeht. Dazu wurde in der Kontrolllinie und in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie die Aktivierung der Effektor-Caspase3 in einem Zeitverlaufsexperiment untersucht. Die Kontrolllinie und die GFP-TAK1_{K63W}-Linie wurden für einen Zeitraum von 0 - 6 Stunden mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Als Positivkontrollen wurde die Kontrolllinie für den gleichen Zeitraum mit Fas-Liganden und Cycloheximid inkubiert, was definitiv zur Apoptose durch den Caspase8-Caspase3-Signalweg führt. Der Verlauf der Caspase3-Aktivierung wurde durch Western-Blot Analyse untersucht. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 29.

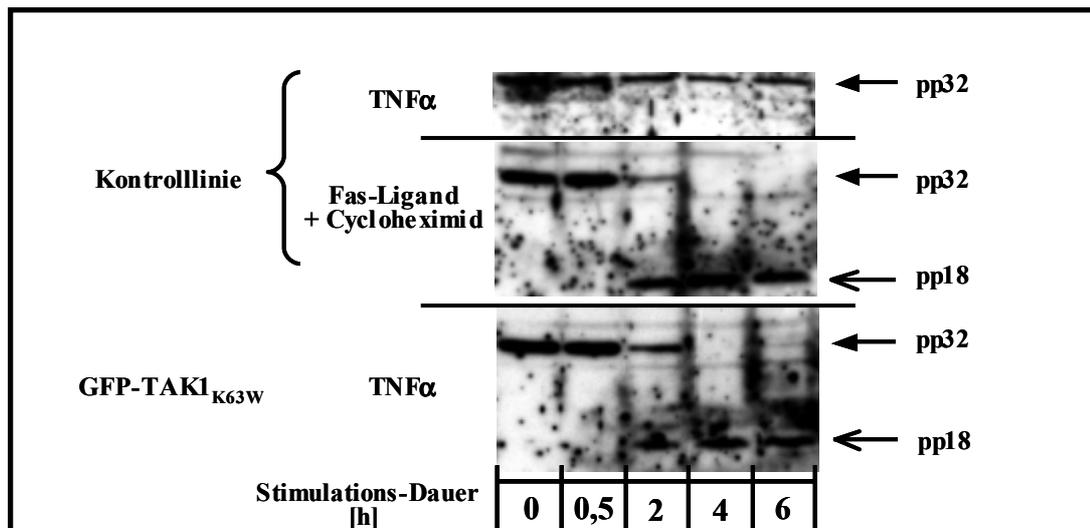


Abb. 29: Nachweis der Caspase3-Aktivierung in der GFP-TAK1_{K63W}-Zelllinie

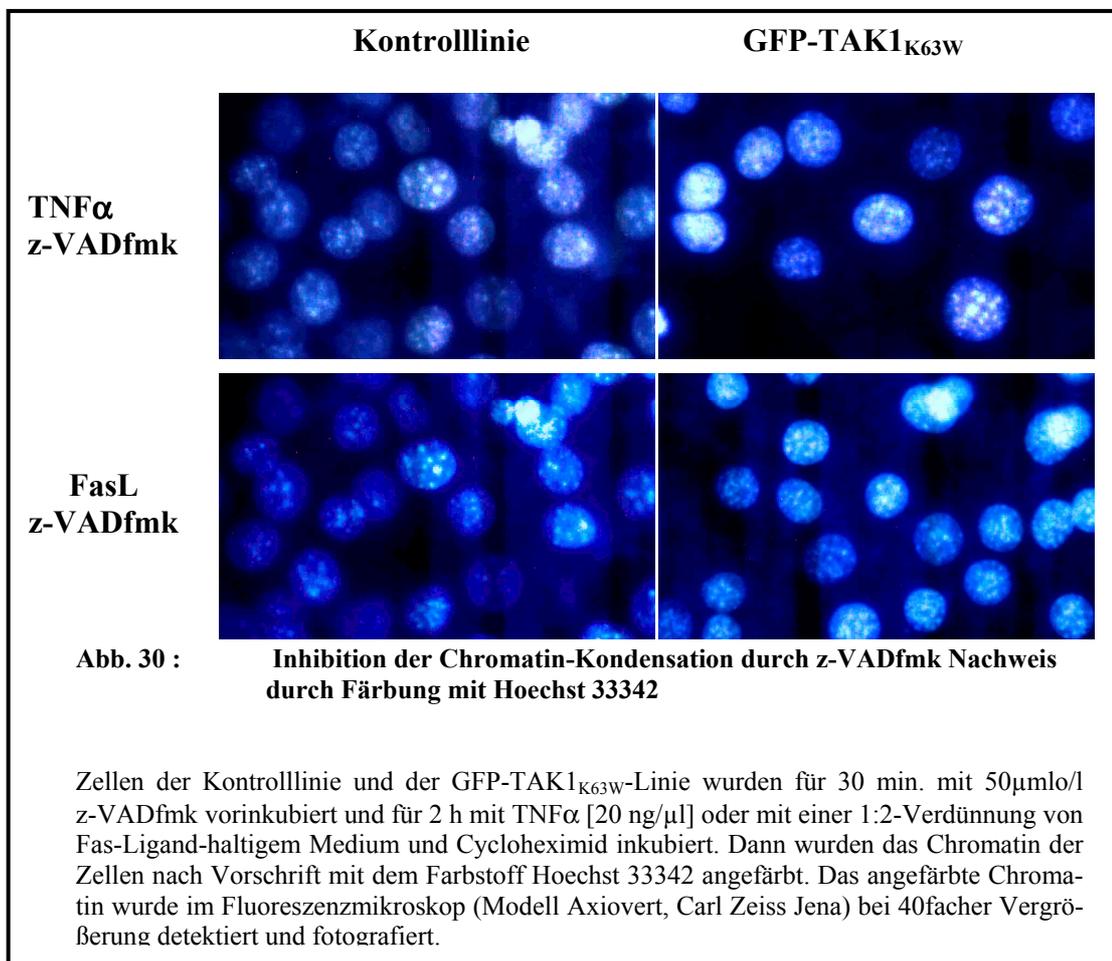
Die Zellen der Kontrolllinie oder der GFP-TAK1_{K63W}-Linie wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen zur Konfluenz wachsen gelassen und für die indizierten Zeiträume mit $\text{TNF}\alpha$ [20 ng/ μ l] stimuliert. Als Positivkontrolle wurden Zellen der Kontrolllinie für die indizierten Zeiträume mit Fas-Ligand und Cycloheximid inkubiert. Die Zellen wurden nach einem Standardprotokoll lysiert und aufgearbeitet. Je 100 μ g Protein von jeder Probe wurden auf einem 12,5 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran hybridisiert. Die inaktive Proform und die aktive gespaltene Form der Caspase3 wurden mit einem Caspase3-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Die Stimulation der Kontrolllinie mit Fas-Ligand und Cycloheximid führt wie erwartet zur Aktivierung der Caspase3. Deutlich ist nach zwei Stunden das Auftreten der 18 kDa großen katalytisch aktiven Form und eine Abnahme der 32 kDa großen Proform zu beobachten. Bei Stimulation der Kontrolllinie mit TNF α dagegen kann weder die aktive Form detektiert werden, noch eine Abnahme der inaktiven Proform.

Bei Stimulation der GFP-TAK1_{K63W}-Linie mit TNF α ist wie bei der Positivkontrolle nach zwei Stunden die katalytisch aktive Form der Caspase3 und eine Abnahme der inaktiven Proform zu beobachten. Nach vierstündiger Stimulation liegt die Caspase3 vollständig in der katalytisch aktiven Form vor.

Die beobachtete Aktivierung der Caspase3 in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie, die mit der gleichen Kinetik wie die Fas-Ligand-induzierte Aktivierung in der Kontrolllinie geschieht, ist ein starkes Indiz auf molekularer Ebene dafür, dass der TNF α -induzierte Zelltod auf TNF-RI-vermittelte Aktivierung apoptotischer Signalwege zurückzuführen ist.

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde untersucht, ob der beobachtete Zelltod durch den Breitspektrum-Caspase-Inhibitor z-VADfmk inhibiert werden kann. Dazu wurden Zellen der Kontrolllinie und der GFP-TAK1_{K63W}-Linie für 30 min. mit 50 μ mol/l z-ZADfmk vorinkubiert und dann für 4 Stunden mit TNF α oder Fas-Ligand stimuliert. Anschließend wurde das Chromatin der Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Das Ergebnis zeigt Abbildung 30.



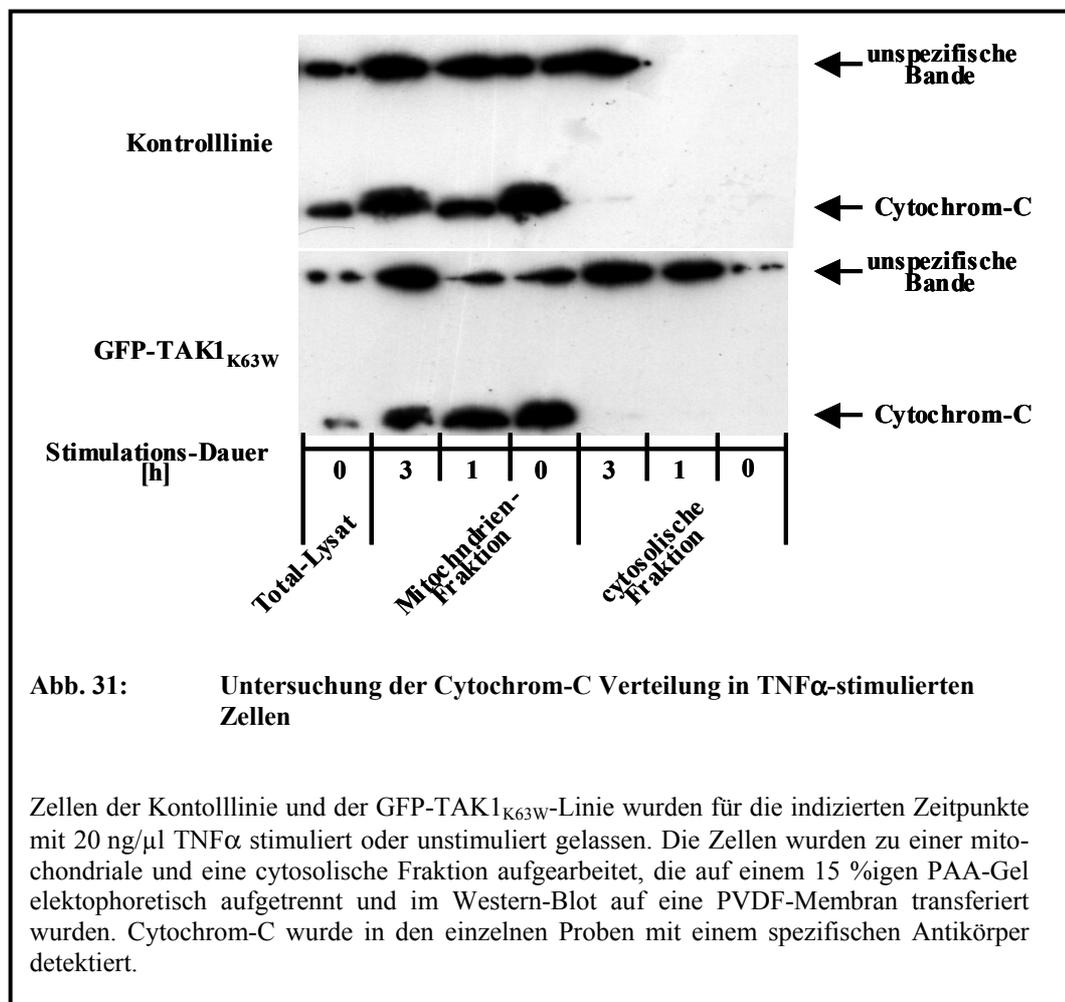
Sowohl die Fas-Ligand- als auch die TNF α -induzierte Apoptose wird durch den Breitpektrum-Caspasen-Inhibitor z-VADfmk komplett inhibiert. In allen vier Versuchsan-sätzen kann keine Zelle mit kondensiertem Chromatin detektiert werden.

Die Versuche zeigen, dass TNF α in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie in der Lage ist, Zelltod zu induzieren. Dieser Zelltod geht einher mit allen Merkmalen der Apoptose: Verlust der Zelladhärenz, eine zerklüftete Morphologie der Plasmamembran, Chromatin-Kondensation und Caspase-Aktivierung. Darüberhinaus ist der Zelltod vollständig durch den Caspase-Inhibitor z-VADfmk inhibierbar. Die Überexpression der GFP-TAK_{K63W}-Mutante sensitiviert also die NIH3T3-Zellen für TNF α -induzierte Apoptose. Eine Erklärung dafür könnte die Inhibition der basalen und stimulierten NF- κ B-Aktivität in dieser Zelllinie sein, da NF- κ B wichtig ist für die Regulation anti-apoptotischer Gene, z. B. Gene der IAP-Familie.

Von dem JNK-MAP-Kinase Signalweg ist bekannt, dass er eine Funktion in der Regulation des rezeptorunabhängigen apoptotischen Signalweges besitzt, wobei eine pro-

oder anti-apoptotische Rolle von JNK kontrovers diskutiert wird. Da die GFP-TAK_{K63W}-Linie eine starke Inhibition der TNF α -induzierten JNK-Aktivierung aufweist, sollte untersucht werden, ob dieser zweite Signalweg bei der beobachteten Apoptose eine Rolle spielt.

Wie oben erwähnt, ist die Aktivierung dieses Signalweges assoziiert mit der Freisetzung von Cytochrom-C aus der mitochondrialen Membran in das Cytosol. Daher wurde untersucht ob bei der TNF α -induzierten Apoptose der GFP-TAK1_{K63W}-Linie eine Freisetzung von Cytochrom-C detektiert werden kann. Dazu wurden sowohl die Kontrolllinie als auch die GFP-TAK1_{K63W}-Linie für eine und drei Stunden mit TNF α stimuliert, und aus diesen Zellen Lysate einer cytosolischen und einer mitochondrialen Fraktion hergestellt, die im Western-Blot auf die Anwesenheit von Cytochrom-C untersucht wurden. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 31 zu sehen.



Wie deutlich zu sehen ist, kann in keiner der beiden Zelllinien Cytochrom-C in den cytosolischen Fraktionen detektiert werden. Dahingegen ist es in der mitochondrialen Fraktion deutlich nachweisbar. Eine Abnahme von Cytochrom-C während der Stimulation in dieser Fraktion kann nicht beobachtet werden. Die Überexpression der

GFP-TAK1_{K63W}-Mutante führt also weder im unstimulierten Zustand noch nach bis zu dreistündiger Stimulation mit TNF α zu einer Freisetzung von Cytochrom-C aus der Mitochondrien-Membran.

Die hier erhobenen Befunde sprechen auf Grund der sehr schnell einsetzenden Apoptose und der Tatsache, dass keine Cytochrom-C-Freisetzung detektiert werden konnte dafür, dass die beobachtete Apoptose auf die direkte, schnelle Aktivierung von Caspase8 am TNF-Rezeptor zurückzuführen ist.

4.11 Modulation der TAK1-Funktion durch den Virulenzfaktor YopP aus *Yersinia Enterocolitica*

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass TAK1 eine wichtige Rolle bei der IL-1 α - und der TNF α -induzierten Signaltransduktion der inflammatorisch wichtigsten Stress-Signalwege spielt und dies auch für die Expression von inflammatorisch relevanten Gene essentiell ist. Eine Inhibition der Stress-Signalwege auf der Ebene von TAK1 führt außerdem – zumindest in bestimmten Zelltypen - zur Sensitivierung der Zellen gegenüber TNF α -induzierter Apoptose.

Dadurch konnte TAK1 als interessantes Ziel für einen therapeutischen Ansatz bei der Therapie entzündlicher Erkrankungen wie Rheuma oder Arthritis definiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll gezeigt werden, dass TAK1 auch ein Zielmolekül ist, dessen vitale Funktion von pathogenen Mikroorganismen moduliert wird.

Die Bakterienstämme *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* besitzen ein ca. 70 kb großes Plasmid, das für *Yersinia outer proteins* (Yops) codiert, die auch als Effektoren oder TypIII-Sekretions System bezeichnet werden. Mit diesem TypIII-Sekretionssystem werden die Effektor-Proteine in das Cytosol der Wirtszelle transportiert, wo sie die Zielzelle lähmen, indem sie u. a. die Wirts-Abwehrsysteme zerstören und Apoptose induzieren.

Eines dieser Virulenzfaktoren ist das Protein YopP aus *Yersinia enterocolitica* (analog *YopJ* aus *Yersinia pestis*). Von diesem Protein wurde gezeigt, dass es bei einer Yersinien-Infektion verantwortlich ist für eine Inhibition der MAPK-Signalwege ERK, p38 und JNK, sowie des NF- κ B Signalweges, und einhergehend damit für eine Reduktion der TNF α -Produktion, der Induktion von Apoptose in Makrophagen und der Etablierung einer systemischen Yersinien-Infektion. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Stress-Signalwege die Inhibition der oberhalb gelegenen Kinasen, d. h. der MAPK-Kinasen und IKK β , einschließt. Der Mechanismus, durch den YopP diese generelle Inhibition der Stress-Signalwege erreicht, ist bislang ungeklärt.

Im folgenden werden Daten gezeigt, die die Vermutung nahe legen, dass ein wichtiges Ziel für YopP die MAPK-Kinase-Kinase-Kinase TAK1 ist.

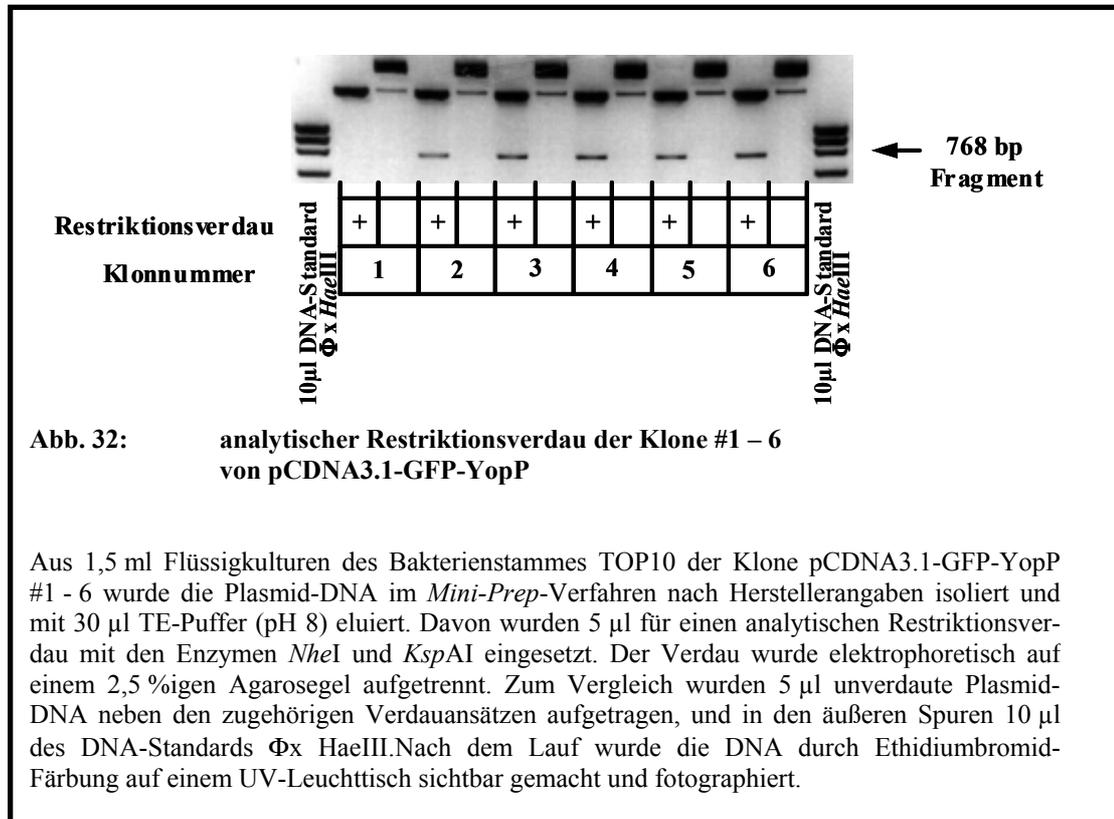
Um die Funktion von YopP in eukaryotischen Zellen untersuchen zu können, wurde die cDNA für YopP aus *Yersinia enterocolitica*, Serotyp 0:8, ausgehend von dem Vektor pGEX-YopP über einen PCR-Ansatz in den Vektor pCDNA3.1-GFP-NT-Topo kloniert, so dass die kodierende Sequenz für die YopP-Mutante im gleichen Leseraster wie die EGFP-kodierende Sequenz des Vektors 3' terminal von der EGFP-Sequenz liegt. Die Expression des Fusionsproteins wird in eukaryotischen Zellen von einem CMV-Promotor angetrieben. Der Einfachheit halber wird im folgenden das Fusionsprotein aus EGFP und der YopP als GFP-YopP bezeichnet.

Bei der PCR wurde die codierende Sequenz der YopP-Mutante ohne das Triplet für das Start-Methionin amplifiziert, ausgehend von dem Plasmid pGEX-YopP mit den *Primern* Yop *sense* und Yop *antisense*. Die PCR erfolgte bei Standardbedingungen in 25 Zyklen mit Taq-Polymerase (100 ng *Template*, 1 µmol/l pro *Primer*, 2,5 u Taq-Polymerase, 3 mmol/l [Mg²⁺]) in zwei 50 µl Ansätzen. Das PCR-Temperaturprogramm ist in Tabelle 3 abgebildet. Zur Klonierung wurde ein 2 µl-Aliquot direkt nach Vorschrift des Herstellers mit dem zur Klonierung fertigen Vektor pCDNA3.1-GFP-NT-Topo für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einem Gesamt-Reaktionsansatz von 6 µl inkubiert. Die Ligation des PCR-Fragmentes erfolgte dabei mit Hilfe der an den linearierten Vektor kovalent gebundenen Topoisomerasen. Von dem Ligationsansatz wurden 2 µl zur Transformation in kompetente Bakterien des *E.coli* Stammes Top10 verwendet. Die Transformation erfolgte ebenfalls nach den Angaben des Herstellers.

	initiale Denaturierung	5min.	95°C
25 Zyklen	Denaturierung	1min.	95°C
	Bindung der <i>Primer</i>	1min.	60°C
	Elongation	2min.	72°C
	finale Elongation	10min.	72°C

Die transformierten Zellen wurden auf ampicilinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Auf einer Platte wurden 25 µl der 1 ml Vorkultur ausgestrichen, auf einer zweiten der Rest der Kultur. Auf der zweiten Platte wuchsen 50 Klone. Mit elf der Klone wurden 1,5 ml LB-Flüssigkulturen beimpft und für ca. sechs Stunden wachsen gelassen. Aus den Bak-

terien dieser Kulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert. Das Vorhandensein und die Orientierung des eingebauten PCR-Fragmentes wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit den Enzymen *NheI* und *KspAI* untersucht. Das Ergebnis für die Klone #1 - 6 zeigt Abbildung 32.

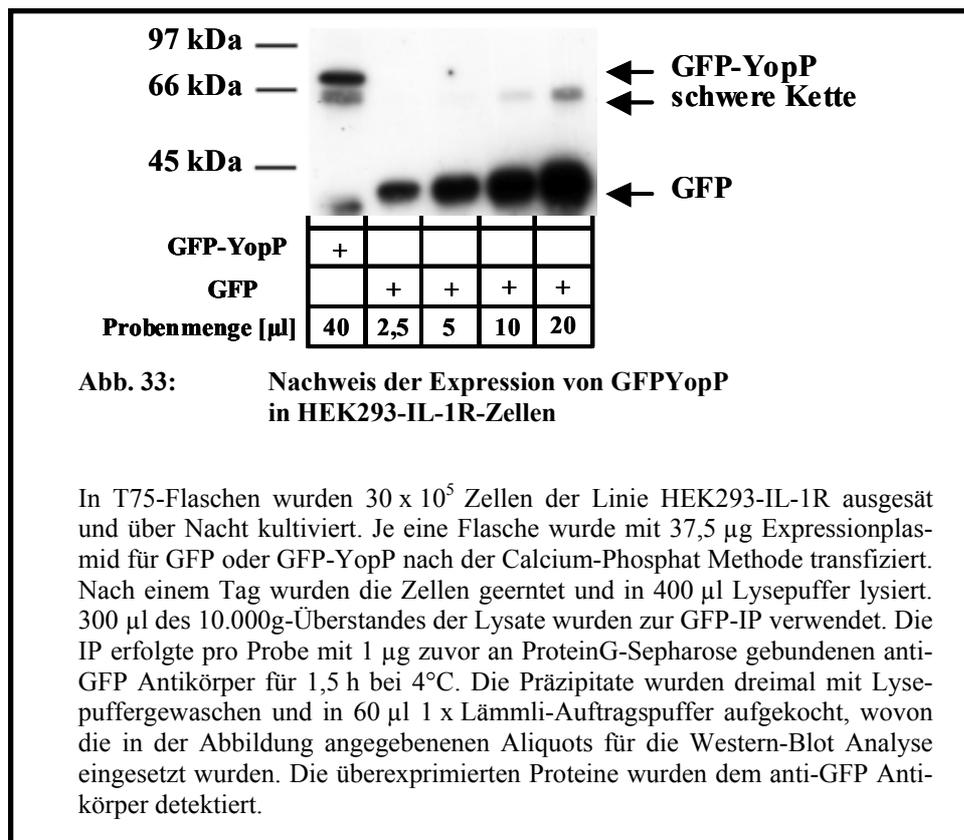


Bei korrekter Orientierung des PCR-Fragmentes ist ein 768 bp großes Fragment zu erwarten, andernfalls ein 176 bp großes Fragment. Die Klone #2 bis #7 zeigen ein Fragment auf der Höhe zwischen dem 872 bp- und dem 603 bp-Fragment des DNA-Standards. Diese Klone haben somit das PCR-Fragment in gewünschter Orientierung. Die weiteren Versuche wurden mit der Plasmid-DNA von Klon #2 gemacht, von dem eine Glycerin-Dauerkultur angelegt wurde.

Die Sequenz des klonierten PCR-Fragmentes von Klon #2 wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer *GFP forward* der in dem neu klonierten Plasmid 5-terminal vom PCR-Fragment bindet. Hierbei wurde eine Mutation gefunden die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins an Position 34 (Gln. zu Arg.) führt.

Die Funktionalität der Expressionsplasmide und des exprimierten Fusionsproteins wurde daher in transienten Transfektionen untersucht. Zunächst wurde untersucht, ob das Fusionsprotein korrekt exprimiert wird. Dazu wurde HEK293-IL-1R-Zellen nach der

Calcium-Phosphat Methode mit dem GFP-YopP Expressionsplasmid transfiziert. Jedoch konnte die Expression weder durch Fluoreszenzmikroskopie anhand des GFP-Fusionsanteils, noch durch Western-Blot Analyse von Lysaten transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung war, dass die Expression des Yop-Anteiles in eukaryotischen Zellen schwierig ist, aufgrund einer unterschiedlichen Codon-Verwendung durch Yersinien und humane Zellen. In der Tat erkennt man bei einem Vergleich, dass das Codon TTA, das von humanen Zellen nur zu 7 % verwendet wird, bei Yop-codierenden Sequenz zu 35 % verwendet wird. Eine Mutagenese dieses Codons zu den Codons CTG, das von humane Zellen zu 40 % verwendet wird, könnte zu einer besseren Exprimierbarkeit in humanen Zellen führen (der Vergleich wurde gemacht mit dem *graphical codon usage analyser*, <http://www.gcu.schoedl.de>.) Um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein überhaupt exprimiert wird, wurden HEK293IL-1R-Zellen mit dem GFP-YopP Expressionsplasmid transfiziert. Aus Lysaten dieser Zellen wurde zur Anreicherung GFP-YopP anhand seines GFP-Fusionsanteiles immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden dann im Western-Blot mit anti-GFP-Antikörpern analysiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 33.



Durch die Immunpräzipitation konnte GFP-YopP so stark angereichert werden, dass es im nachfolgenden Western-Blot nachweisbar ist. In der mit dem Expressionsplasmid für GFP-YopP transfizierten Probe wird eine spezifische Bande auf der erwarteten Höhe

knapp oberhalb des 66 kDa-Markers detektiert. Die kurz darunter zu erkennende Bande ist die schwere Kette des in der IP verwendeten Antikörpers. Das GFP-YopP Fusionsprotein ist also in Säuger-Zellen exprimierbar. Die Expression ist allerdings relativ schwach, wie der Vergleich mit der Verdünnungsreihe der GFP-Proben zeigt.

Als nächstes wurden mit dem Plasmid transiente Transfektions-Experimente in HEK293-IL-1R-Zellen und HeLa-Zellen durchgeführt, um die Auswirkung einer YopP-Expression auf die Aktivierung eines kotransfizierten IL-8-Promotor-Luziferase Plasmides zu untersuchen. Als Stimuli wurden IL-1 α und kotransfiziertes GFP-TAK1/-TAB1 oder MEKK1-BFP miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 zu sehen.

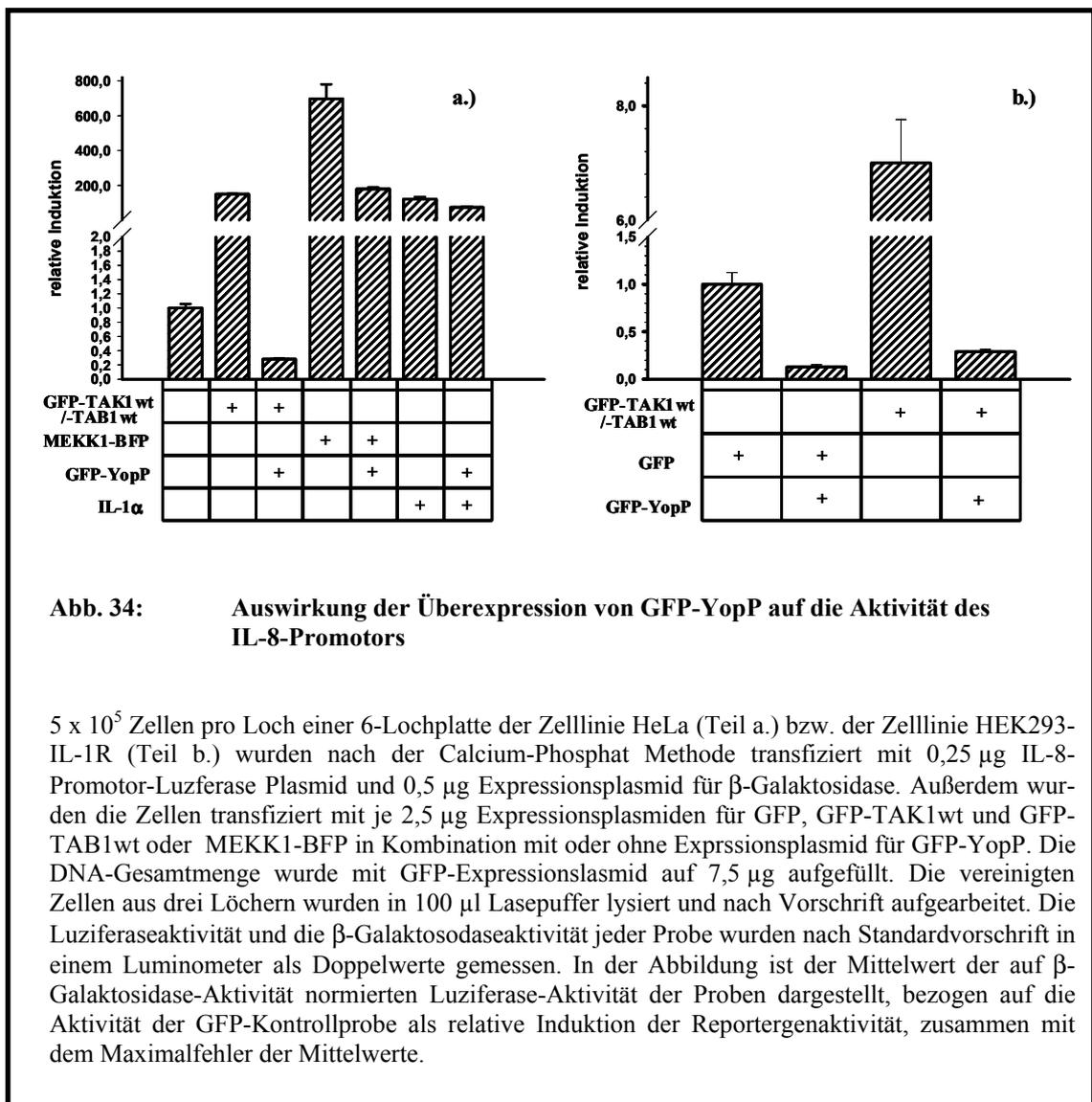


Abbildung 34 zeigt die relative Induktion der IL-8 Reportergenaktivität, bezogen auf die Aktivität der mit einem GFP-Kontrollplasmid transfizierten Probe.

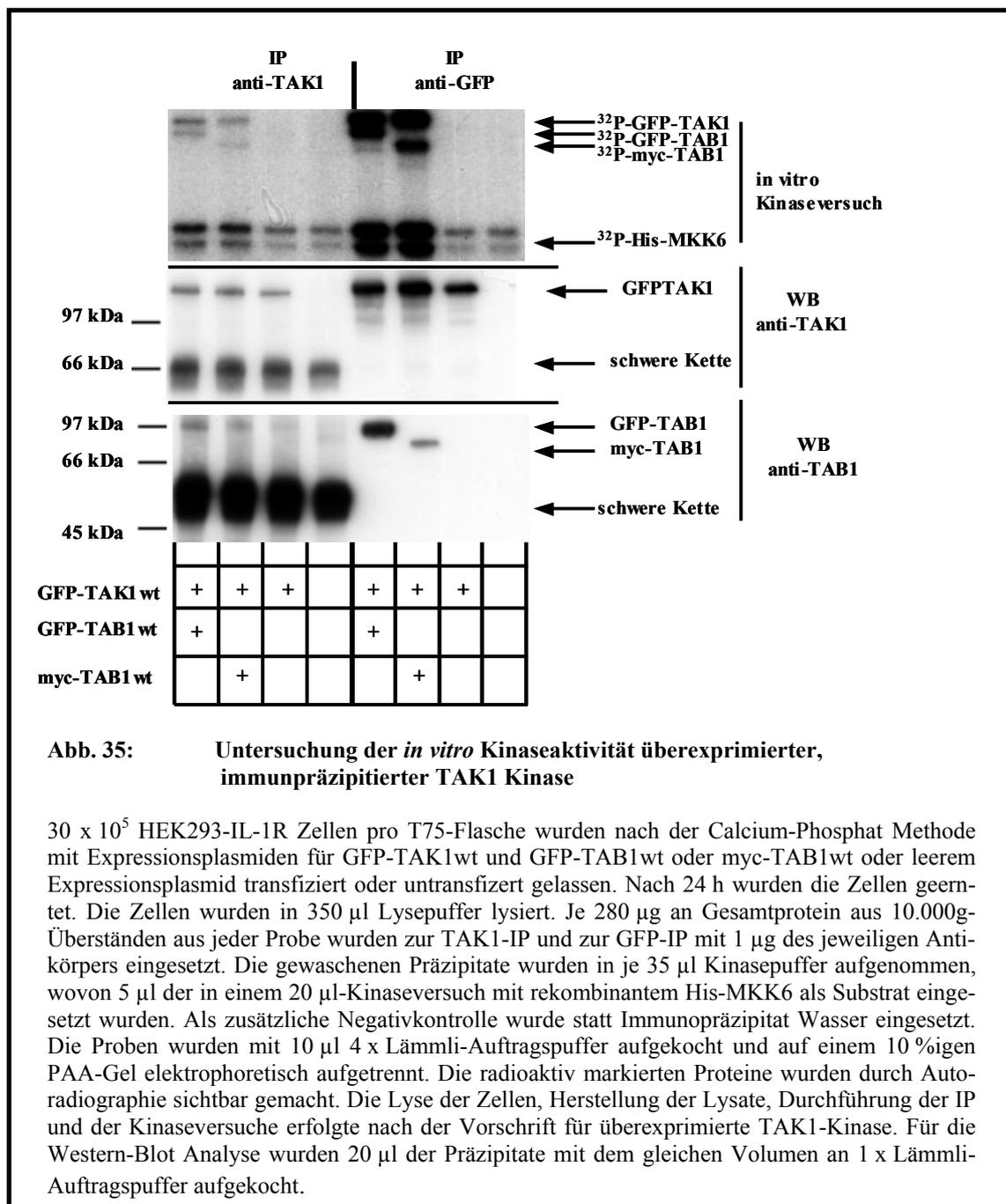
In Teil a.) der Abbildung ist zu erkennen, dass alle drei Stimuli den IL-8 Reporter in HeLa-Zellen deutlich aktivieren. Bei Kotransfektion des GFP-YopP Plasmides wird die Aktivierung durch alle drei Stimuli drastisch vermindert. Jedoch wird die IL-1 α -stimulierte und die MEKK1-BFP-stimulierte Reporteraktivität nicht vollständig gehemmt. Sie liegt für IL-1 α bei 80-fachen und für MEKK1-BFP bei dem 180-fachen der unstimulierten Kontrolle. Die durch GFP-TAK1/-TAB1 induzierte Reporteraktivität, die ohne GFP-YopP ungefähr das 120-fache der unstimulierten Kontrolle beträgt, wird dagegen auf das basale Niveau der Kontrolle abgesenkt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sowohl der physiologische Stimulus, als auch die Überexpression von MEKK1-BFP den IL-8 Promoter über Signalwege aktivieren, die z. T. nicht YopP-sensitiv sind. Die Tatsache, dass die Aktivierung des Promotors durch TAK1/TAB1-Überexpression vollständig durch YopP inhibiert wird, lässt die Vermutung zu, dass die Funktion von TAK1 selbst durch YopP inhibiert werden könnte. Die Kernaussage dieses Ergebnisses konnte in einem zweiten unabhängigen Transfektionsexperiment bestätigt werden.

In Teil b.) der Abbildung sind Ergebnisse aus IL-8-Promoter-Transfektionsexperimenten in HEK293-IL-1R-Zellen dargestellt. Die Koexpression von GFP-TAK1/-TAB1 stimuliert den Reporter deutlich. Durch Koexpression von GFP-YopP wird die Aktivität unter das basale Niveau der Kontrolltransfektion mit einem GFP-Expressionsplasmid gesenkt. Außerdem fällt auf, dass diese basale Aktivität durch GFP-YopP alleine erniedrigt wird.

Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die in HeLa-Zellen beobachtete vollständige Inhibition TAK1/TAB1-induzierter IL-8-Promotor-Aktivität, zum anderen, dass GFP-YopP die basale Reporteraktivität des IL-8 Reporterkonstruktes senkt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung aus Teil 4.6 dieser Arbeit, dass die Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1 Mutante die basale NF- κ B-Aktivität erniedrigt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Überexpression von GFP-YopP über die Inaktivierung von endogenem TAK1 zu einer Erniedrigung der basalen NF- κ B-Aktivität führt, und so zu einer Verringerung des transaktivierenden Potentials der NF- κ B-Bindungsstelle des IL-8-Promotors.

Um die Frage untersuchen zu können, ob die Funktion von TAK1 selbst von YopP betroffen ist, war es nötig, einen direkten Nachweis der TAK1 Funktion zu verwenden. Hierzu wurde ein *in vitro* Kinaseversuch für TAK1 etabliert. Zunächst wurden geeignete Bedingungen gesucht, bei denen die Kinaseaktivität von überexprimiertem TAK1

detektiert werden kann. Aus transienten Transfektionsexperimenten und aus der Literatur war bekannt, dass überexprimiertes TAK1 nur aktiv ist, wenn es zusammen mit TAB1 überexprimiert wird. Weiterhin ist die MAP-Kinase-Kinase MKK6 ein spezifisches Substrat für TAK1. Daher wurden TAK1 und TAB1 als Fusionsproteine mit verschiedenen gut immunpräzipitierbaren Epitopen in HEK293-IL-1R-Zellen überexprimiert, immunpräzipitiert und in einem *in vitro* Kinaseversuch mit rekombinanten His-MKK6 inkubiert. Auf diese Weise war es möglich, geeignete Versuchsbedingungen zu finden, um die Kinaseaktivität von überexprimierten TAK1 reproduzierbar *in vitro* messen zu können. Ein Ergebnis dazu zeigt Abbildung 35.



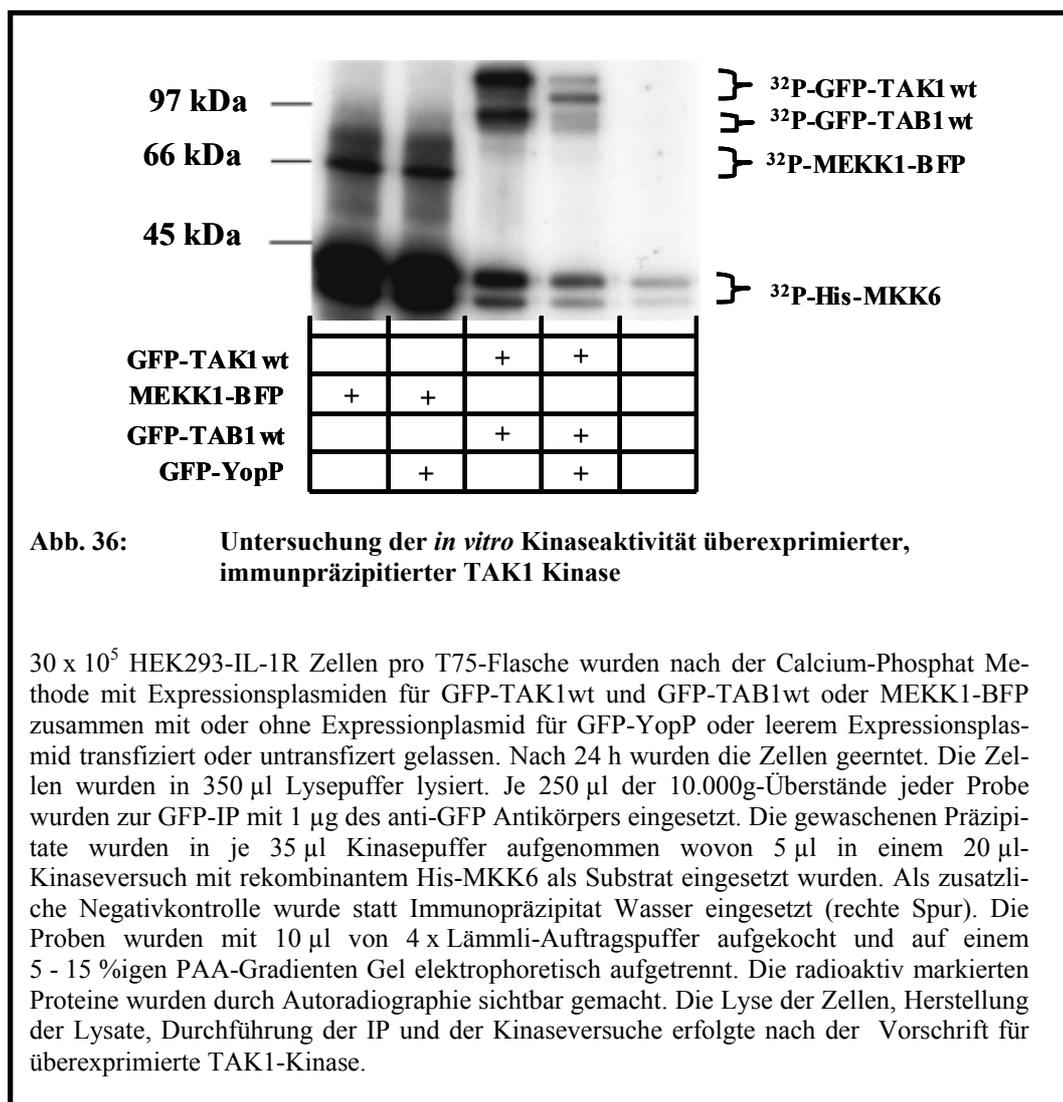
Das Ergebnis zeigt, dass Versuchsbedingungen gefunden wurden, unter denen überexprimierte TAK1 immunopräzipitiert werden, und ihre katalytische Aktivität *in vitro* untersucht kann. Katalytisch aktive TAK1 wird sehr gut durch den anti-GFP Antikörper präzipitiert. TAB1 copräzipitiert unter diesen Bedingungen mit TAK1, wie der Ansatz mit kotransfiziertem myc-TAB1 zeigt. Die Aktivierung von TAK1 führt zur Phosphorylierung von TAK1 und TAB1, und zu einer deutlich gesteigerten Phosphorylierung des Substrates His-MKK6. Bei Überexpression von TAK1 allein dagegen kann keine katalytisch aktive Form von TAK1 detektiert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Erkenntnissen der eigenen Arbeitsgruppe aus transienten Transfektionsexperimenten sowie mit Literaturdaten, nach denen nur bei gemeinsamer Überexpression von TAK1 und TAB1, TAK1 sich selbst autokatalytisch sowie TAB1 phosphoryliert und diese phosphorylierte Form dann das Substrat MKK6 *in vitro* phosphorylieren kann.

Interessant ist auch der Vergleich der katalytischen Aktivitäten, die in parallelen Ansätzen aus den gleichen Lysaten mit dem anti-GFP- bzw. mit dem anti-TAK1-Antikörper präzipitiert werden. Die katalytische Aktivität der durch den anti-TAK1-Antikörper präzipitierten TAK1 beträgt nur einen Bruchteil der anti-GFP-präzipitierten TAK1. Eine Erklärung bietet die Western-Blot-Untersuchung der für den Kinaseversuch verwendeten Lysate und Immunopräzipitate.

GFP-TAK1 wird durch beide Antikörper in vergleichbarer Größenordnung präzipitiert. Die Präzipitation durch den anti-TAK1 Antikörper ist jedoch deutlich schwächer, als durch den anti-GFP Antikörper. Außerdem wird TAB1 aufgrund seiner Interaktion mit TAK1 durch den anti-GFP Antikörper copräzipitiert, wie die Probe mit cotransfiziertem myc-TAB1 zeigt. Bei Immunpräzipitation mit dem anti-TAK1 Antikörper hingegen ist weder cotransfiziertes GFP-TAB1 noch myc-TAB1 spezifisch detektierbar. Bei Immunpräzipitation mit dem anti-TAK1 Antikörper wird also TAB1 nicht oder nur sehr schwach kopräzipitiert. Eine Erklärung hierfür ist, dass es sich bei diesem kommerziell erhältlichen Antikörper (St. Cruz, M579) um einen polyklonalen Antikörper handelt, der auch gegen ein Epitop gerichtet sein könnte, das für die TAK1-TAB1 Interaktion wichtig ist, da bei der Herstellung des Antikörpers mit dem gesamten Protein immunisiert wurde. Weil aber diese Interaktion eine Voraussetzung für die katalytische Aktivität von TAK1 ist, wie auch der vergleichende Kinaseversuch in Abbildung 35 zeigt, ist dieser anti-TAK1 Antikörper ungeeignet zur Untersuchung der TAK1-Aktivität in Immunkomplexen.

Diese Tatsache hat auch wichtige Implikationen für die Untersuchung endogener TAK1-Aktivität, die mit diesem Antikörper nicht möglich sein dürfte. Ein anderer kommerziell erhältlicher TAK1 Antikörper, der im Rahmen der Arbeit ausgetestet wurde, war nicht in der Lage, TAK1 zu präzipitieren. In der Tat ist es so, dass alle bisher veröffentlichten Daten zur katalytischen Aktivität endogener TAK1 mit einem nicht kommerziell erhältlichen Antikörper erzielt wurden.

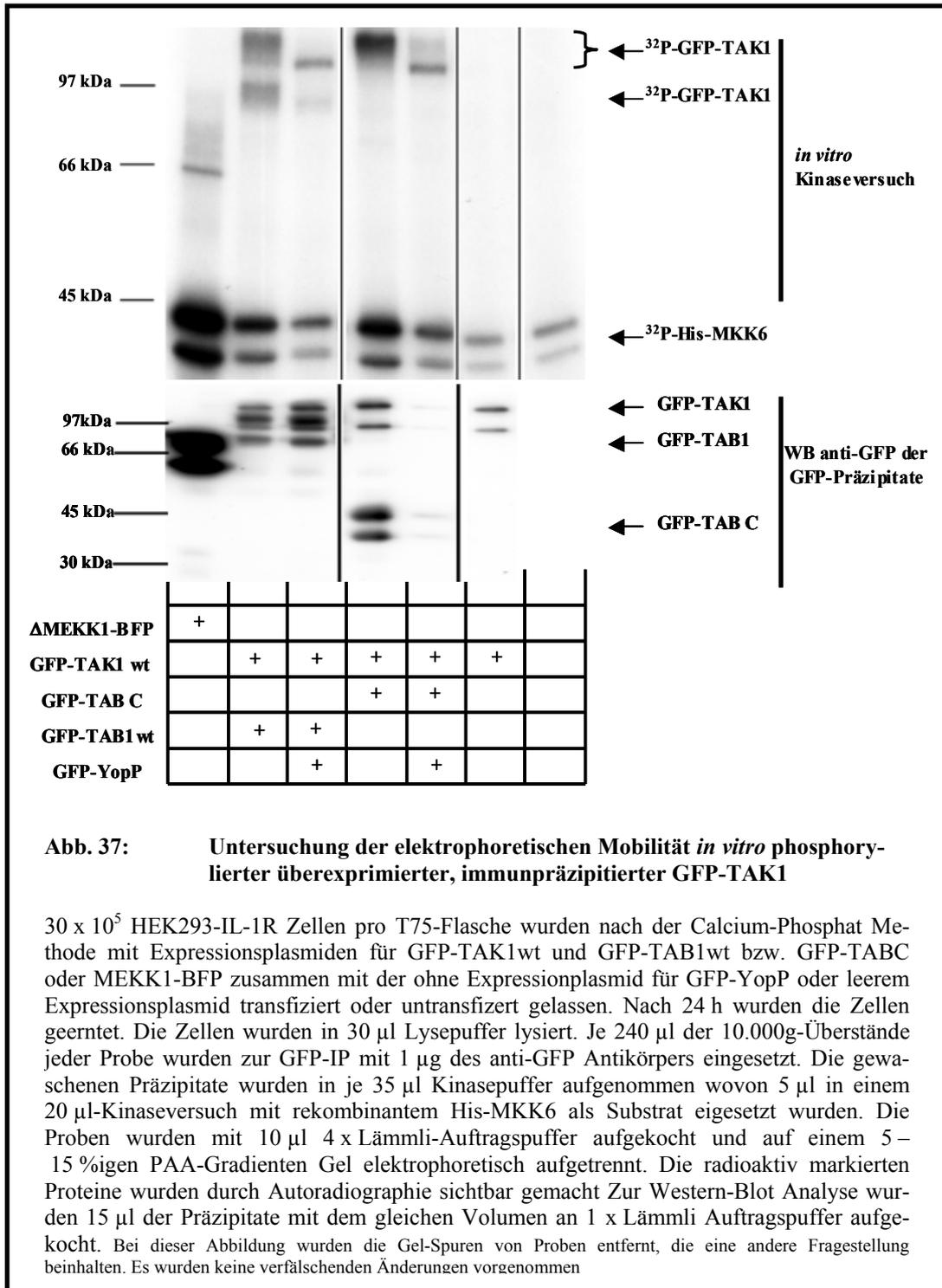
Nach Etablierung eines Kinaseversuches für überexprimiertes TAK1 wurde untersucht, ob seine katalytische Aktivität durch YopP beeinflusst wird. Dazu wurden TAK1 und TAB1 als GFP-Fusionsproteine mit oder ohne GFP-YopP in HEK293-IL-1R Zellen überexprimiert, und die katalytische Aktivität von immunpräzipitiertem TAK1 *in vitro* untersucht. Als Vergleich diente überexprimiertes MEKK1-BFP, von dem aus den transienten Transfektionsexperimenten bekannt war, dass seine induzierende Wirkung auf den IL-8-Promotor nicht komplett durch YopP inhibiert wird (siehe Abb 34). Das Ergebnis ist in Abbildung 36 gezeigt.



MEKK1-BFP und koexprimiertes GFP-TAK1/-TAB1 sind in diesem *in vitro* Kinaseversuch deutlich katalytisch aktive Kinasen bzw. Kinasekomplexe, die His-MKK6 phosphorylieren. Die Kinaseaktivität von MEKK1-BFP ist stärker als die von GFP-TAK1/-TAB1. Deutlich zu erkennen ist auch die autokatalytische Aktivität von GFP-TAK1/-TAB1 und MEKK1-BFP. Bei Koexpression von GFP-YopP bleibt sowohl die Kinaseaktivität von MEKK1-BFP in Bezug auf das Substrat His-MKK6, als auch auf die autokatalytische Kinaseaktivität unverändert. MEKK1-BFP wird also nicht durch YopP beeinflusst. GFP-TAK1/-TAB1 dagegen wird deutlich durch GFP-YopP inhibiert. Die Phosphorylierung von His-MKK6 ist eindeutig reduziert und die autokatalytische Aktivität des Komplexes ist stark vermindert. Darüber hinaus ist bei Coexpression mit GFP-YopP eine Veränderung in der elektrophoretischen Mobilität der phosphorylierten GFP-TAK1 Formen zu erkennen. Die phosphorylierte Hauptbande von GFP-TAK1 läuft bei Coexpression mit GFP-YopP in dem Gel unterhalb der phosphorylierten Hauptbande von GFP-TAK1 ohne GFP-YopP-Koexpression. Phosphoryliertes GFP-TAB1 dagegen wird in seiner elektrophoretischen Mobilität nicht verändert, ist aber wie auch GFP-TAK1 insgesamt deutlich schwächer phosphoryliert als in dem Ansatz ohne GFP-YopP. Insgesamt erscheinen die GFP-TAK1/-TAB1 Phosphobanden verbreitert. Bei Koexpression mit GFP-YopP wird Phospho-GFP-TAK1 auf zwei Banden reduziert.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass YopP die Phosphorylierung von TAK1 oder eine andere Modifikation von überexprimierten TAK1 und damit die katalytische Aktivität von TAK1 beeinflusst.

Um die TAK1- und die TAB1-Phosphobanden besser unterscheiden zu können, und um die verbreiterte TAK1-Phosphobande besser auflösen zu können, wurde der gleiche Transfektionsansatz um die Kombination mit kotransfiziertem GFP-TAB1C erweitert. Dieses Fusionsprotein beinhaltet das C-terminalen TAB1-Fragment von Aminosäure 437 – 504 und damit die Interaktionsdomäne mit TAK1. Es ist in der Lage, die katalytische Aktivität von TAK1 zu stimulieren. Das Ergebnis ist in Abbildung 37 zu sehen.



Wiederum zeigt sich die durch Kotransfektion mit GFP-TAB1 aktivierte katalytische Aktivität von GFP-TAK1, die zu einer deutlich gesteigerten Phosphorylierung des Substrates His-MKK6 und zur Autophosphorylierung des überexprimierten GFP-TAK1/-TAB1 Komplexes führt. Die katalytische Aktivität des Komplexes in Bezug auf His-MKK6 wird durch Koexpression von GFP-YopP deutlich reduziert, ebenso wie die autokatalytische Aktivität. Bei Expression von GFP-TAK1wt und GFP-TAB1wt sind zwei stark verbreiterte Phosphobanden im Bereich von 97 kDa er-

kennbar. Die obere von beiden ist eindeutig GFP-TAK1, die untere GFP-TAB1 zuzuordnen, wie der Vergleich mit der Kombination GFP-TAK1wt/ GFP-TAB1C zeigt. Bei dieser Kombination ist die untere Bande bei 97 kDa nicht vorhanden. Das wesentlich kleinere GFP-TAB1C (ca. 40 kDa) wird auf der Autoradiographie nicht als zusätzliche Phosphobande detektiert.

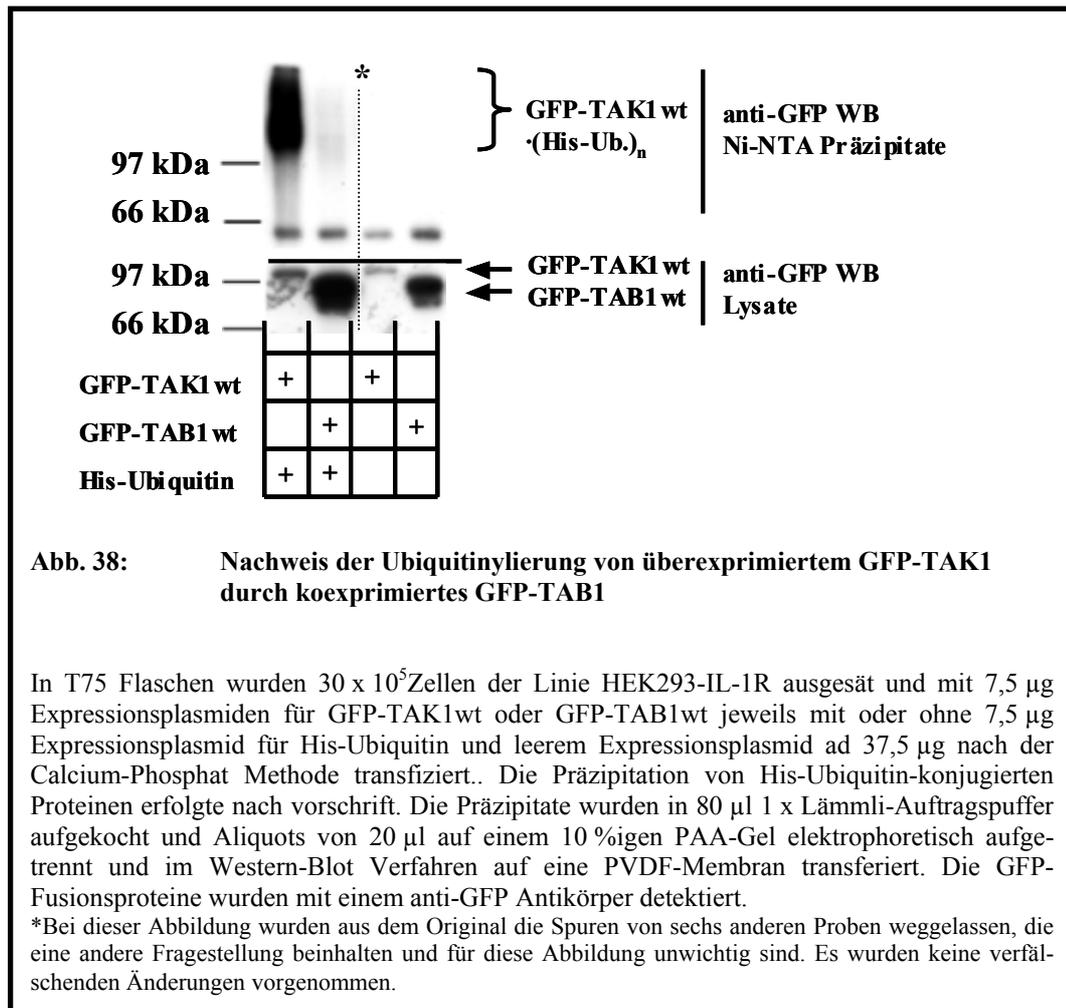
Auffällig ist die Reduktion der stark verbreiterten GFP-TAK1 Phosphobande auf eine kleinere distinkte Phosphobande. Diese Reduktion könnte durch eine verminderte Phosphorylierung oder durch eine Veränderung einer anderen, bislang unbeschriebenen Modifikation von TAK1 hervorgerufen werden.

Vor kurzer Zeit wurde in der Literatur beschrieben, dass YopP eine begrenzte Sequenzähnlichkeit zu einer Cysteinprotease aus Adenovirus, AVP (*adenovirus protease*) aufweist, die wiederum Ähnlichkeit mit Ulp1 (*ubiquitin like protein protease*) aus der Hefe hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in einer vorhergesagten katalytischen Triade von YopP und Proteinen aus der Yop-Familie zu deren Inaktivierung führt und dass die Überexpression von YopP zu einer Abnahme von ubiquitinylierten Proteinen führt.

Desweiteren wurde fast zeitgleich beschrieben, dass die Aktivierung des IKK-Komplexes durch TRAF6 den dimeren Ubiquitin-konjugierenden Komplex TRIKA1 erfordert, und später, dass TAK1 im Komplex mit TAB1 und TAB2 die Kinase ist, die Ubiquitin-abhängig den IKK-Komplex und MAP-Kinase-Signalweges aktiviert. Eine direkte Ubiquitinylierung von TAK1 oder TAB1 wurde bislang jedoch nicht beobachtet.

Aufgrund dieser Fakten und der eigenen Beobachtungen sollte untersucht werden, ob TAK1 durch Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine modifiziert wird und ob diese Modifikation für die katalytische Aktivität von TAK1 bedeutsam ist.

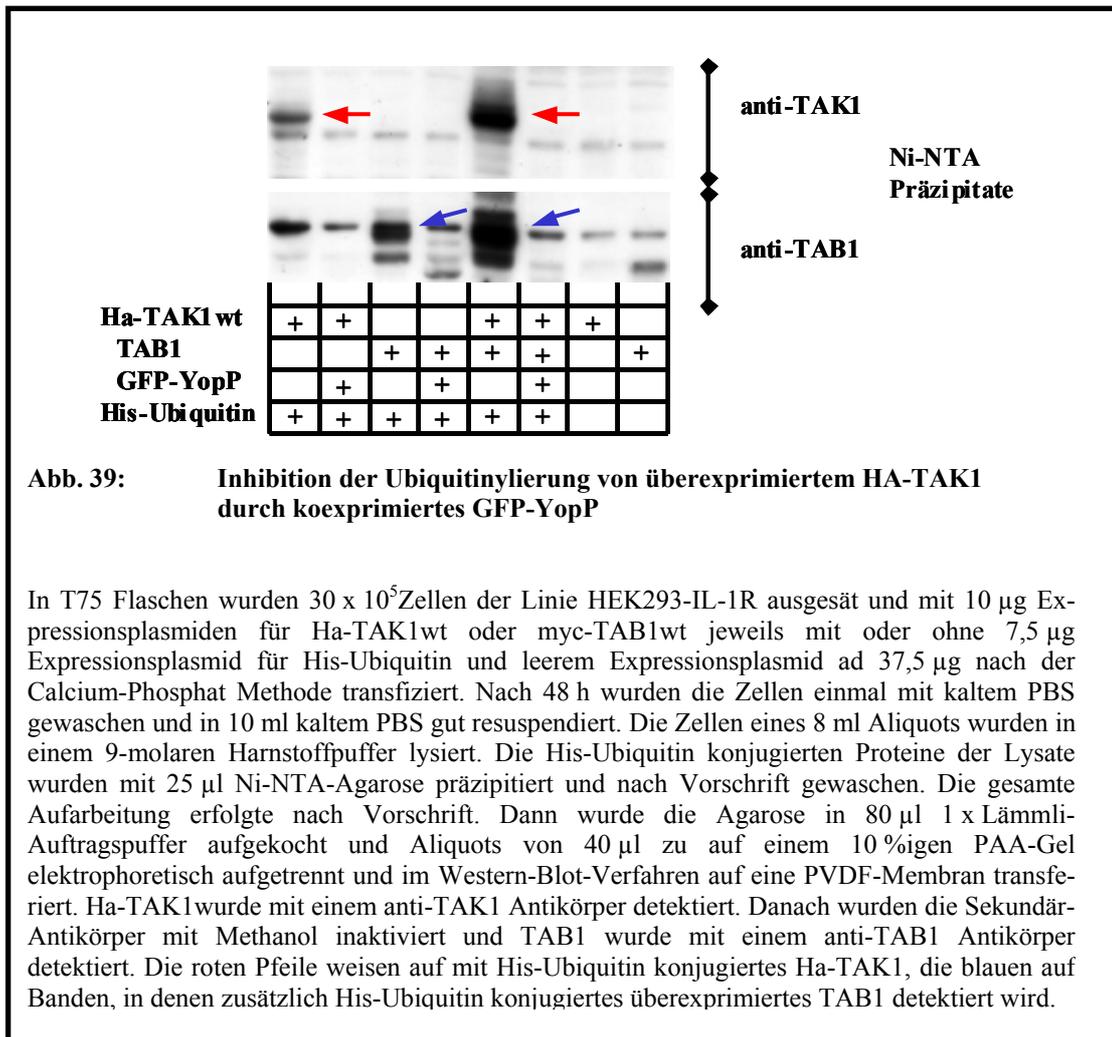
Dazu wurde zunächst untersucht, ob sich Modifikationen von TAK1 in einem Überexpressionssystem nachweisen lassen. In HEK293-IL-1R Zellen wurde GFP-TAK1 zusammen mit His-Ubiquitin überexprimiert. Die transfizierten Zellen wurden stark denaturierend lysiert und alle durch His-Ubiquitin modifizierten Proteine wurden affinitäts-chromatographisch über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Anwesenheit von GFP-TAK1 in der aufgereinigten Fraktion wurde im Western-Blot mit anti-GFP-Antikörpern überprüft. Als Negativkontrolle wurde das His-Expressionsplasmid durch ein leeres Expressionsplasmid ersetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 38 zu sehen



Überexprimiertes GFP-TAK1 wird deutlich in der aufgereinigten und His-Ubiquitin konjugierten Fraktion detektiert, GFP-TAB1 dagegen so gut wie nicht, obwohl die Expression von GFP-TAB1 stärker ist als die von GFP-TAK1, wie der Vergleich der Lysate im Western-Blot zeigt. Die starke Ubiquitinylierung muß spezifisch für den TAK1-Anteil des Fusionsproteins sein, da GFP-TAB1 nur sehr schwach ubiquitinyliert wird. Das Signal ist auch nicht auf unspezifische Bindung des GFP-TAK1 Fusionsproteins an die Agarose zurückzuführen, wie die Kontrolle ohne koexprimiertes His-Ubiquitin zeigt. Überexprimiertes TAK1 wird also eindeutig und spezifisch durch überexprimiertes Ubiquitin modifiziert.

Die nächste Frage war, ob die beobachtete Ubiquitinylierung von überexprimiertem TAK1 (und evtl. TAB1) durch Koexpression von GFP-YopP inhibierbar ist. Dazu wurden analog zum vorher gezeigten Experiment transiente Transfektionen in HEK293-IL-R Zellen durchgeführt, und Ha-TAK1wt- und TAB1wt-Proteine in Kombination mit und ohne GFP-YopP exprimiert. Das Vorhandensein der überexprimierten Protein in

der His-Ubiquitin konjugierten Fraktion wurde im Western-Blot mit Antikörpern gegen TAK1 und TAB1 untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 39.



Man erkennt, dass überexprimiertes HA-TAK1 in der His-Ubiquitin konjugierten Fraktion wiedergefunden wird, sowohl bei alleiniger als auch bei Koexpression mit TAB1 (rote Pfeile). Bei Koexpression beider Kombinationen dagegen ist TAK1 nicht nachweisbar, was zeigt, dass GFP-YopP die Ubiquitinylierung von TAK1 in diesem Überexpressions-System entweder verhindert oder sie entfernt.

Die Inkubation derselben Membran mit anti-TAB1 Antikörper zeigt diesmal eine deutliche Ubiquitinylierung von TAB1 (blaue Pfeile), wobei bei dieser Detektion auch noch Restsignale des anti-TAK1 Antikörpers detektiert werden, so dass bei Koexpression von HA-TAK1 und TAB1 ein gemischtes Signal detektiert wird (fünfte Spur von links). Jedoch sind auch hier deutlich zusätzliche Banden zu erkennen, die TAB1 zugeordnet werden können.

Signale von His-Ubiquitin konjugierten TAB1-Proteinen können ebenfalls nicht detektiert werden, wenn sie zusammen mit GFP-YopP überexprimiert werden, d. h. auch ihre Ubiquitinylierung wird durch YopP verhindert.

Der Vergleich mit den Negativkontrollen zeigt, dass die beobachteten Ubiquitinylierungen spezifisch für die überexprimierten Proteine sind. Bei diesem Versuch wurde TAK1 mit einem zweifachen Ha-Epitop überexprimiert, welches keinen zur Ubiquitin-Konjugation benötigten Lysin-Rest besitzt, und TAB1 wurde ohne zusätzlichen Fusionsanteil überexprimiert. Die Modifikation durch Ubiquitin muß daher an den eigentlichen Proteinen stattfinden.

Die bisher gezeigten Daten wurden aus Überexpressions-Systemen gewonnen. Dabei konnte gezeigt werden, dass TAK1 (und wahrscheinlich auch TAB1) alleine oder bei gemeinsamer Überexpression ubiquitinyliert werden, und dass diese Ubiquitinylierung durch Koexpression mit GFP-YopP inhibiert wird. Mit diesem Verlust an Ubiquitinylierung geht ein Verlust der (auto-)katalytischen Aktivität von TAK1 einher.

Endogenes TAK1 und TAB1 liegen in der Zelle als inaktiver Komplex vor und werden erst auf exogene Stimulation hin aktiviert, wohingegen ektopisch exprimiertes TAK1 + TAB1 aktiv ist. Außerdem ist in der Literatur beschrieben, dass der TAB1-TAK1-TAB2 Komplex ein Ubiquitin-abhängiger Aktivator des NF- κ B- und von MAPK-Signalwegen ist, wobei eine Ubiquitinylierung von TAK1 selbst in der Publikation nicht festgestellt werden konnte.

Daher stellt sich die Frage, ob die beobachtete Ubiquitinylierung auch bei endogenem TAK1 stattfindet und ob die katalytische Aktivität des TAK1-Komplexes mit dieser Ubiquitinylierung assoziiert ist.

Um die Frage zu beantworten, ob eine endogene Ubiquitinylierung von TAK1 ein Mechanismus der Zelle ist, der von YopP attackiert wird, wurde zunächst untersucht, ob überexprimiertes GFP-TAK1 + GFP-TAB1 durch endogenes Ubiquitin modifiziert wird. Dazu wurden GFP-TAK1wt und GFP-TAB1wt mit oder ohne GFP-YopP koexprimiert. Die GFP-Fusionsproteine wurden immunpräzipitiert und im Western-Blot auf Ubiquitinylierung hin untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 40a.).

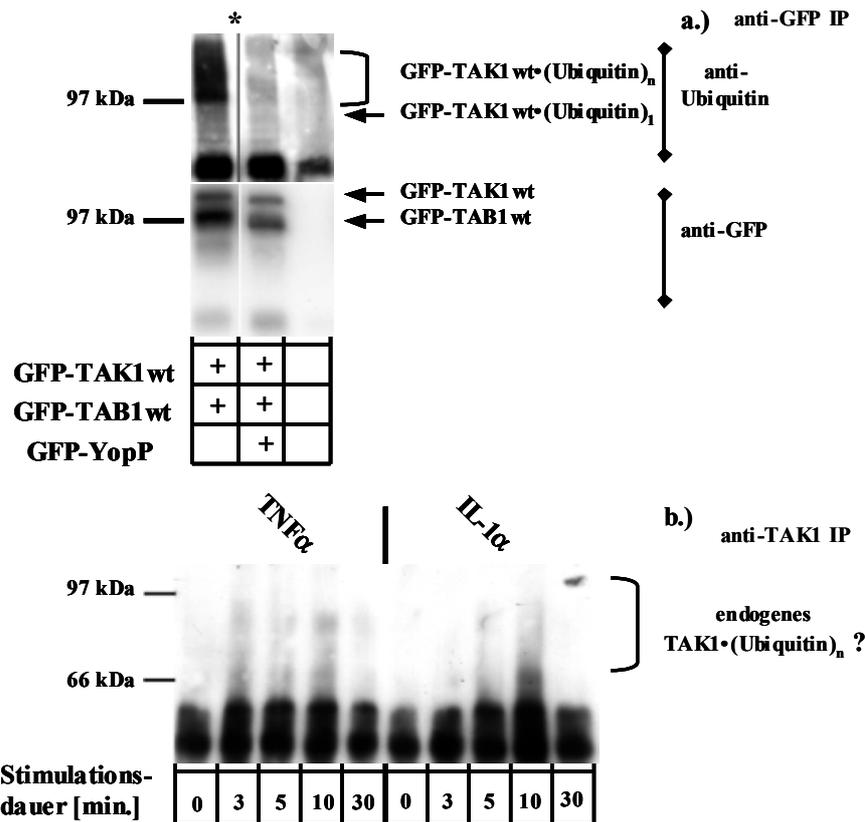


Abb. 40: Untersuchung der Modifikation von GFP-TAK1wt/-TAB1wt und endogenem TAK1 durch endogenes Ubiquitin

a.) 30 x 10⁵ Zellen pro T75-Flasche der Linie HEK293-IL-1R wurden nach der Calcium-Phosphat Methode mit je 12,5 µg Expressionsplasmid für GFP-TAK1wt und GFP-TAB1wt mit oder ohne Expressionsplasmid für GFP-YopP transfiziert oder untransfiziert gelassen. Die Gesamtmenge von 37,5 µg DNA wurde mit leerem Expressionsplasmid aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden in 300 µl Lysepuffer lysiert und aus den Lysaten entsprechend 1730 µg Gesamtprotein wurden die GFP-Fusionsproteine mit 1 µg anti-iGFP Antikörper immunpräzipitiert und aufgereinigt. Die Präzipitate wurden in 30 µl Kinasepuffer aufgenommen. Für die Western-Blot Analyse wurden 30 µl der Präzipitate mit 30 µl 2 x Lämmli-Auftragungspuffer versetzt und aufgekocht, und davon je 20 µl eingesetzt. Die Präzipitate wurden auf zwei 10 %ige PAA-Gelen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem anti-Ubiquitin- bzw. anti-GFP-Antikörper. Die Lyse und die Durchführung der IP erfolgten nach dem Protokoll zur Immunpräzipitation überexprimierter TAK1-Kinaseversuche.

b.) Konfluente HeLa Zellen in T75-Flaschen wurden für die angegebenen Zeiträume mit TNFα oder IL-1α (jeweils 20 ng/ml) stimuliert und geerntet. Die Zellen wurden lysiert in 800 µl Standard-Lysepuffer zur Präzipitation von endogener TAK1. Endogenes TAK1 wurde mit je 1 µg anti-TAK1 Antikörper und 20 µl ProteinG-Sepharose immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden dreimal mit Lysepuffer ohne Inhibitoren gewaschen und in 100 µl 1xLämmli-Auftragungspuffer aufgekocht. Aliquots von 40 µl wurden auf einem 10 %igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Ubiquitinylierte Proteine wurden mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper detektiert.

*Bei dieser Abbildung wurden aus dem Original die Spuren von zwei anderen Proben weggelassen, die eine andere Fragestellung beinhalten und für diese Abbildung unwichtig sind. Es wurden keine verfälschenden Änderungen vorgenommen.

GFP-TAK1 und GFP-TAB1 haben im Western-Blot ein apparentes Molekulargewicht von 97 kDa bzw. knapp über 97 kDa. Der anti-Ubiquitin Antikörper erkennt ab diesem Molekulargewichtsbereich bei Expression von GFP-TAK1 und GFP-TAB1 einen hoch-

hochmolekularen Schmier, bei dem es sich um durch endogenes Ubiquitin modifizierte Formen von GFP-TAK1 und/ oder GFP-TAB1 handelt. Bei Koexpression der beiden Proteine mit GFP-YopP wird diese Bande nicht erkannt, was zeigt, dass auch die Ubiquitinylierung der überexprimierten Fusionsproteine durch endogenes Ubiquitin bei Überexpression von GFP-YopP inhibiert wird. Der Versuch zeigt auch, dass eine ektopische Expression von Ubiquitin nicht notwendig ist und damit überexprimiertes GFP-TAK1/-TAB1 endogen ubiquitinyliert wird.

Um definitiv zu zeigen, dass eine Ubiquitinylierung von TAK1 ein Mechanismus ist, der in der Zelle auch an dem endogenen TAK1 Protein eine Rolle spielt, war es notwendig, diese am endogenen Protein nachzuweisen. Da - wie oben dargestellt - vermutet wurde, dass die Ubiquitinylierung bei der Aktivierung des TAK1/TAB1-Komplexes wichtig ist, wurden Zellen mit verschiedenen proinflammatorischen Stimuli zu verschiedenen Zeitpunkten stimuliert. Es wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen versucht, eine Ubiquitinylierung von endogenem TAK1 nachzuweisen.

Zum einen wurden Zellen mit großen Mengen an His-Ubiquitin Expressionsplasmid oder Ha-Ubiquitin als Negativkontrolle in HEK293-IL-1R Zellen und in HeLa Zellen transfiziert und mit IL-1 α oder TNF α in einem Zeitbereich von 0 - 30 Minuten stimuliert. Anschließend wurde die His-Ubiquitin konjugierte Fraktion analog zum Verfahren für überexprimierte Proteine aufgereinigt. Endogenes TAK1 sollte in dieser Fraktion im Western-Blot nachgewiesen werden. Leider war es nicht möglich, mit dieser Herangehensweise reproduzierbar und spezifisch Banden, die TAK1 zugeordnet werden konnten, zu detektieren. Scheinbar durch TNF α oder IL-1 α regulierte Banden wurden auch in der Negativkontrolle detektiert oder ließen sich nicht reproduzierbar nachweisen. Diese Daten werden hier nicht gezeigt. Die Untersuchungen wurden in HEK293-IL-1R Zellen und in HeLa Zellen durchgeführt.

Im zweiten Ansatz wurden Zellen mit TNF α , IL-1 α oder LPS stimuliert, endogene TAK1 immunpräzipitiert und die Ubiquitinylierung im Western-Blot mit einem anti-Ubiquitin Antikörper untersucht. Die Versuche wurden mit HEK293IL-1R Zellen, THP1 Zellen und HeLa Zellen durchgeführt. Im Zuge der Untersuchungen war es aufgrund von starken Hintergrundsignalen notwendig, die Handhabung des anti-Ubiquitin Antikörpers für die Western-Blot Analysen zu optimieren. Eine 1:20.000 Verdünnung in 5 %iger Milch erwies sich dabei als am besten geeignet. Außerdem wurden verschiedene Kombinationen von Detergenz-Konzentrationen Triton-X 100 und Inhibitoren des Proteasoms und von Ubiquitin-Isopeptidasen ausgetestet. Bei einem Versuch in HeLa-

Zellen zeigte sich scheinbar eine regulierte Ubiquitylierung von Proteinen, die dem anti-TAK1 Antikörper präzipitiert wurden. Das Ergebnis zeigt Abbildung 40 b.).

In dem Zeitverlauf-Experiment detektiert der anti-Ubiquitin Antikörper nach dreiminütiger TNF α -Stimulation bzw. nach fünfminütiger IL-1 α -Stimulation Proteine ab dem Molekulargewichtsbereich knapp unterhalb des 66 kDa-Markers. Die Signale liegen damit im Bereich von TAK1 oder copräzipitiertem TAB1. Das stärkste Signal wird bei beiden Stimuli nach zehnminütiger Stimulation detektiert. In beiden Probenreihen ist kein entsprechendes Signal in den unstimulierten Proben oder in den für 30 Minuten stimulierten Proben festzustellen. Der Zeitverlauf der beobachteten Ubiquitylierung entspricht damit genau dem aus der Literatur bekannten Zeitverlauf der IL-1 α induzierten Aktivierung von endogener TAK1. Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis darauf, dass bei Überexpression beobachtete Ubiquitylierung von TAK1 und TAB1 auch bei den endogenen Proteinen stattfindet, und zeitlich mit deren Stimulus-induzierten Aktivierung korreliert. Ein zweiter Western-Blot mit den gleichen Proben brachte allerdings aufgrund technischer Mängel keine Bestätigung dieses Ergebnisses. Die Bestätigung durch ein biologisch unabhängiges Experiment steht noch aus.

Ein weiterer Ansatz, um die Ergebnisse aus den Überexpressions-Experimenten für den endogenen TAK1/TAB1-Komplex zu bestätigen, war, die Aktivierung von endogenem TAK1/TAB1 nach Stimulation zu untersuchen, sowie den Effekt von GFP-YopP auf die Aktivierung. Wie weiter oben erwähnt, ist mit kommerziell erhältlichen anti-TAK1 Antikörpern keine Kinaseaktivität präzipitierbar, was wahrscheinlich auf eine Zerstörung der TAK1-TAB1 Interaktion durch den Antikörper zurückzuführen ist.

Die Aktivierung des endogenen TAK1/TAB1-Komplexes beinhaltet Phosphorylierungen beider Proteine, und kann durch Änderung der elektrophoretischen Mobilität bei SDS-PAGE detektiert werden. Daher wurden Bedingungen gesucht, bei denen diese Änderung der elektrophoretischen Mobilität detektiert werden konnte, um diese als Maß für den Aktivierungszustand des TAK1/TAB1-Komplexes zu verwenden. Um einen Effekt von GFP-YopP auf die Aktivierung messen zu können, wurden die Zellen zuvor mit dem Transfektionsreagenz Rotifect (Roth) transfiziert, um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erzielen. Es zeigte sich, dass eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität am besten bei einer denaturierenden SDS-vermittelten Direktlyse der Zellen und anschließender SDS-PAGE mit einem niedrigprozentigen Gel detektiert werden konnte.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 41.

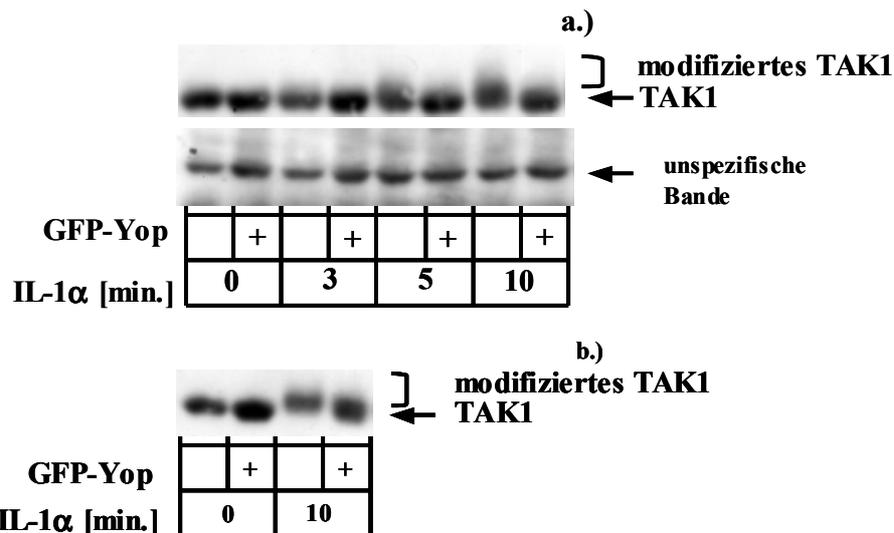


Abb. 41: Inhibition der IL-1 α induzierten Modifikationen von endogenem TAK1 durch GFP-YopP

In 24-Lochplatten wurden 1×10^5 Zellen pro Loch der Linie HEK293IL-1R in 0,5 ml DMEM ohne Antibiotika ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Rotifect nach Herstellerprotokoll transfiziert. Dazu wurden 1,5 μ l Rotifect mit 0,8 μ g leerem pCDNA3.1 Expressionsvektor und 0,2 μ g pEGFPc1 oder mit 0,8 μ g pCDNA3.1-GFP-YopP und 0,2 μ g pEGFPc1 in 30 μ l DMEM ohne Zusätze gemischt und auf die Zellen zusammen mit gegeben 190 μ l DMEM (ohne Antibiotika) gegeben. Nach 6-stündiger Inkubation wurden pro Loch 300 μ l DMEM-Komplettmedium zugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 20 ng/ml IL-1 α stimuliert und direkt in 50 μ l Direktlysepuffer lysiert. Die Lysate wurden vollständig auf einem 7,5 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Endogenes TAK1 wurde mit einem anti-TAK1 Antikörper detektiert.

Teil a.) der Abbildung zeigt ein Zeitverlauf-Experiment, bei dem mit GFP-YopP oder mit Kontrollvektor transfizierte HEK293-IL-1R Zellen für drei, fünf und zehn Minuten mit IL-1 α stimuliert wurden. Die Western-Blot Untersuchung zeigt, dass in den Kontrollen nach fünfminütiger Stimulation eine Verbreiterung und eine geringere elektrophoretische Mobilität der TAK1-Bande zu erkennen ist, und diese nach zehnminütiger Stimulation stärker wird. Im Vergleich dazu ist die Mobilität bei den GFP-YopP-transfizierten Zellen nahezu unverändert.

In Teil b.) der Abbildung wurde das Experiment unter identischen Bedingungen wiederholt. Die unstimulierten und die für zehn Minuten stimulierten Proben wurden nebeneinander aufgetragen, um den Unterschied zu verdeutlichen. Wieder ist die IL-1 α -induzierte Änderung der elektrophoretischen Mobilität von TAK1 zu erkennen, sowie deren Inhibition durch exprimiertes GFP-YopP.

Der Versuch zeigt, dass die in der Literatur beschriebene Kinetik der TAK1-Aktivierung anhand der Änderung der elektrophoretischen Mobilität nachvollziehbar ist, und dass diese YopP-sensitiv ist.

Die gezeigten Experimente verdeutlichen, dass Aktivierung und die katalytische Aktivität des TAK1/TAB1-Komplexes ein Ziel für die Ubiquitin-Protease YopP sind. Es konnte in Überexpressions-Systemen gezeigt werden, dass die Ubiquitylierung von TAK1/TAB1 durch YopP verhindert wird. Für endogenes TAK1/TAB1 gibt es ein bisher nicht reproduziertes Experiment, das eine TNF α - und IL-1 α -induzierte Ubiquitylierung von endogenem TAK1 (oder einem anderen kopräzipitiertem Protein z. B. TAB1) mit einem Zeitverlauf, der der Kinetik der Aktivierung des endogenen TAK1/TAB1-Komplexes entspricht, und die YopP-sensitiv ist.

5 Diskussion

Einleitung

Ziel der Untersuchungen war es, herauszufinden, ob sich TAK1 als therapeutisch interessante Zielstruktur für die Behandlung entzündlicher Krankheiten definieren lässt. Eine solche Anwendung könnte die gezielte Überexpression von TAK1-Mutanten sein, um TAK1-abhängige Signaltransduktion und Genexpression *in vivo* Krankheitssituationen zu inhibieren. Zunächst wurde in Zellkultur-Experimenten die Rolle von TAK1 bei der Signaltransduktion proinflammatorischer Cytokine untersucht und im Anschluss daran die Rolle von TAK1 bei Genregulation durch diese Stimuli. Der Ansatz für die Untersuchungen war die stabile Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante, die - wie sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte – einen starken, dominant negativen Effekt auf Cytokin-induzierte Stress-Signalwege und die Expression entzündungsrelevanter Gene ausübte.

Die in Zellkultur-Experimente gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion von TAK1 sollten auf ein *in vivo*-Modell übertragbar sein. Aus diesem Grund wurden die stabil überexprimierenden Zelllinien durch retroviralen Gentransfer hergestellt. Der Gentransfer mit Hilfe von Retroviren ist ein effizientes und etabliertes Mittel um Funktionen des Immunsystems und Stress-Signaltransduktion zu untersuchen (Übersicht Lois, C. et al., 2001). Die Verwendung von Retroviren sollten also prinzipiell den Transfer in ein *in vivo*-Modell ermöglichen.

Retrovirale Expression von TAK1-Proteinen

Zunächst wurden Zelllinien hergestellt, die durch retroviralen Gentransfer ausgehend von der chromosomal integrierten retroviralen Kasette die Fusionsproteine GFP-TAK1^{wt} oder GFP-TAK1_{K63W} – eine katalytisch inaktive Mutante – exprimieren. Außerdem wurde eine Zelllinie zum Vergleich mit leerem Virus infiziert. Die Linien wurden ausgehend von murinen Fibroblasten der NIH3T3-Linie hergestellt, also einer transformierten Zelllinie, die ein relevantes System für primäre Fibroblasten darstellt.

Die Expressionsstärke des retroviralen Promotors und die Funktionalität der exprimierten Proteine wurden schon in dem Verpackungslinien untersucht. Hier, wie auch später bei den infizierten Zelllinien, erwies sich die Expressionsstärke der rekombinanten TAK1-Fusionsproteine als extrem hoch. Eine starke Überexpression ist eine notwendige Voraussetzung für einen dominant negativen Effekt einer katalytisch inaktiven Mutante

auf TAK1-abhängige Signaltransduktion. Desweiteren konnte bereits in den Verpackungslinien gezeigt werden, dass die katalytisch inaktive Mutante dominant negativ auf die IL-1 α induzierte Aktivierung der endogenen JNK-MAP-Kinase wirkt. Damit sind die von der retroviralen Kasette exprimierte Proteine prinzipiell funktionell aktiv.

Zu Beginn der Arbeit war unklar, ob das rekombinante, retrovirale Genom aufgrund der Größe von 2,5 kB der inserierten GFP-TAK1-Fragmente effizient in infektiöse Viruspartikel verpackt werden könnte. Darüber hinaus bestand die Möglichkeit, dass die Proteinkinase oder ihre Mutante selber die Produktion infektiöser Viruspartikel unmöglich machen würde. So konnte z. B. Meike Brömer in ihrer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Infektion mit rekombinanten Retroviren mit einem katalytisch konstitutiv aktiven Fragment der MAPKKK MEKK1 toxisch für NIH3T3-Zellen ist.

Die Bestimmungen der Virus-Titer zeigte jedoch, dass alle drei Linien infektiöse Viruspartikel herstellen konnten. Der geschätzte Virus-Titer der Produzentenlinie bei den angewandten Infektionsbedingungen lag in einem Bereich von $3 - 11 \times 10^4$ cfu/ml und damit nach Angaben von Dr. Wirth (GBF, Braunschweig) im Rahmen des Normalen. Der deutliche Unterschied im Titer zwischen der Kontrolllinie und den beiden anderen Linien ist vermutlich auf eine schlechtere Verpackbarkeit des viralen Genoms dieser beiden Linien zurückzuführen und erklärbar durch schlecht verpackbare Sekundärstrukturen der zusätzlichen 2,5 kB Insertion.

Bei der Herstellung der stabil infizierten NIH3T3 Linien wurde die Kontrolllinie mit einer deutlich höheren m.o.i. infiziert, als die beiden anderen Linien, wie aus Tabelle 1 hervorgeht. So liegt der Anteil der mehr als dreifach infizierten Zellen bei dieser Linie bei fast 80 %, während er bei der GFP-TAK1wt-Linie nur bei ca. 25 % und bei der GFP-TAK1_{K63W}-Linie bei ca. 7 % liegt. Die Wahrscheinlichkeit ist also relativ gering, dass beobachtete biologische Effekte in den beiden Linien, die die GFP-TAK1-Fusionsproteine exprimieren, auf etwaige Sekundäreffekte durch Veränderungen von Genabschnitten durch retrovirale Integration zurückzuführen sind.

Die sehr gute Infektiosität des Zellkulturüberstandes der virusproduzierenden Zellen zeigt sich in der Folge auch bei der eigentlichen Herstellung der stabil infizierten Zelllinien, die ohne große Verluste selektiert werden konnten.

Die Untersuchung dieser stabil infizierten Linien ergab wie in den Produzentlinien eine sehr starke Expression der Fusionsproteine, wobei die Expression in der Linie mit der katalytisch inaktiven Mutante im Vergleich mit der Wildtyp-Linie deutlich stärker

ist. Auffällig ist, dass in beiden Linien außer den erwarteten kompletten Fusionsproteinen auch verkürzte Fragmente der Proteine im Western-Blot detektiert werden (Abb. 7). Die Ursache für deren Auftreten konnte nicht geklärt werden, jedoch ist ein Artefakt bei Herstellung der Lysate unwahrscheinlich. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass durch einen polyklonalen anti-TAK1 Antikörper im Western-Blot mehrere endogene niedermolekulare Proteine erkannt werden, von denen mindestens eine IL-1 α -abhängig eine Veränderung ihrer elektrophoretischen Mobilität zeigt und somit wahrscheinlich ein endogenes TAK1-Fragment ist (pers. Beobachtung, Daten hier nicht gezeigt). Dies könnte darauf hindeuten, dass TAK1 natürlicherweise in der Zelle prozessiert wird, und die TAK1-Fragmente eine biologische Funktion übernehmen. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Überexpression eines C-terminal trun-kierten TAK1-Fragmentes dominant negativ auf die IL-1 α -induzierte Aktivität des IL-8 Promotors wirkt (Holtmann, H. et al., 2001). In Kapitel 4.6 wird gezeigt, dass in der GFP-TAK1wt-Linie die IL-1 α - und TNF α - induzierte Aktivierung des JNK- und des p38-Signalweges gegenüber der Kontrolllinie reduziert ist. Das Auftreten der Fragmen-te in der GFP-TAK1wt-Linie könnte daher eine Erklärung für die reduzierte Aktivie-rung sein. Allerdings traf dies nicht für die IL-1 α - und die TNF α -induzierte NF- κ B-Aktivierung zu (Abb. 14).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Expression anhand des GFP-Fusionsanteiles bestätigte die Ergebnisse aus den Western-Blot Untersuchungen. Die Expression in der Wildtyp-Linie war schwächer als die in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie. In beiden Linien ist das Fusionsprotein cytosolisch lokalisiert, wenn auch durch die Auf-nahmen eine Lokalisation im Zellkern nicht ausgeschlossen werden konnte. Auffällig ist, dass die Expression innerhalb der Linien sehr gleichmäßig ist.

Die durch retrovirale Infektion hergestellten Linien sind in zweierlei Hinsicht ein sehr gutes Modell, um die Auswirkungen der Überexpression der TAK1-Mutante zu unter-suchen. Zum einen hat man eine homogene, starke Überexpression in der jeweiligen Zellpopulation, wie sie sonst nur durch aufwendige Einzelzell-Klonierung zu erreichen ist. Zum anderen sind sie genetisch heterogen, d. h., dass beobachtete Effekte nicht auf klonale Ursachen zurückgeführt werden können.

Die Verwendung von retroviralen Vektoren für die Herstellung von stabil überexpri-mierenden Zelllinien eröffnete auch prinzipiell die Möglichkeit, Untersuchungen in primä-ren Zellen oder in einem *in vivo* Modell durchzuführen. In Zusammenarbeit mit Prof. J. Sklatvala vom Kennedy Institute of Rheumatology, London, wurde versucht,

Makrophagen mit den GFP-TAK1 Retroviren zu infizieren und in einem Gelenk-Entzündungsmodell einzusetzen. Das Projekt wurde jedoch nicht weiterverfolgt, da eine Infektion der Makrophagen nicht möglich war.

Mittlerweile sind in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. D. Wirth (GBF, Braunschweig) Adenoviren hergestellt worden, bei denen die komplette retrovirale Kasette des hier verwendeten Vektors pM5XNEO-GFP-TAK1_{K63W} in das adenovirale Genom integriert ist. Erste Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten die Infektiösität der Viren, die Expression des GFP-TAK1-Fusionsproteins und eine Hemmung von Cytokin-induzierter Expression des Chemokins mcp-1 nach Infektion mit diesen Viren nachweisen.

Diese Vektoren stellen aufgrund ihrer sehr hohen Infektiösität und ihres breiten Wirtsspektrums hervorragende Werkzeuge für Untersuchungen in primären Zellen oder in Tiermodellen der Entzündung dar.

Die Aktivierung der Stress-Signalwege durch IL-1 α und TNF α ist abhängig von TAK1

In den drei Zelllinien wurde zunächst die Auswirkung der Überexpression der Fusionsproteine auf die IL-1 α - und die TNF α -induzierte Aktivierung der drei wichtigsten bekannten Stress-Signalwege untersucht. Zu diesem Zeitpunkt war aus der Literatur bekannt, dass die Coexpression von TAK1 und TAB1 zu einer Aktivierung der drei MAPKK MKK3, MKK6 und MKK4 führt, und damit auch zur Phosphorylierung und Aktivierung des p38- und des JNK-MAPK-Signalweges (Moriguchi, T. et al., 1996, Shirakabe, K. et al., 1997, Wang, W. et al. 1997). Durch Überexpressionsexperimente war bekannt, dass TAK1 weiterhin durch Interaktion und Aktivierung des IKK-Komplexes zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges beiträgt (Sakurai, H. et al., 1999), und es konnte gezeigt werden, dass TAK1 diese Funktionen auch bei der IL-1 α -induzierten Aktivierung der Stress-Signalwege einnimmt. Außerdem war bekannt, dass die Stimulation mit TNF α zur Aktivierung der katalytischen Aktivität endogener TAK1 führt (Nishida 1997).

Retroviral exprimiertes TAK1_{K63W} hemmt den JNK und den p38 Signalweg

In der Arbeit konnte in den Zelllinien, die stabil die katalytisch inaktive Mutante GFP-TAK1_{K63W} überexprimieren, die bekannte Rolle von TAK1 bei der IL-1 α -induzierten Aktivierung des p38-, des JNK-MAPK und des NF- κ B Signalweges bestä-

tigt werden. Darüber hinaus wurden zu diesem Zeitpunkt neue Daten über die Rolle von TAK1 bei TNF α -induzierter Signaltransduktion gewonnen.

Zur Untersuchung des JNK- und des p38-Signalweges wurden spezifische Immunkomplex-Kinaseversuche eingesetzt, und die Aktivität der Kinasen über die Zeit verfolgt. Die Überexpression der TAK1-Mutante führt zu einer kompletten Inhibition der IL-1 α induzierten Aktivierung und JNK (Abb. 10) ebenso zur Inhibition der TNF α -induzierten JNK-Aktivierung (Abb.11). Interessanterweise ist zu beobachten, dass auch in der Zelllinie, die GFP-TAK1wt überexprimiert, die Aktivierung von JNK im Vergleich zur Kontrolllinie durch beide Stimuli reduziert ist im Vergleich zur Kontrolllinie. Dies könnte durch die oben erwähnten C-terminal trunkierten Fragmente zu erklären sein, die in diesen Zellen vorhanden sind, und von denen gezeigt wurde, dass sie dominant negativ in der IL-1 α -Signaltransduktion wirken können.

Die Untersuchung des p38-Signalweges in diesen Zelllinien ergab ebenfalls eine signifikante Inhibition durch die TAK1-Mutante bei Stimulation mit IL-1 α und TNF α , wobei auch die basale p38-Aktivität in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie erniedrigt zu sein scheint. Es zeigte sich allerdings, dass beide Stimuli die p38-Aktivität schwächer stimulieren als die JNK-Aktivität. Aufgrund der relativ schwachen p38-Aktivierbarkeit in den untersuchten Zelllinien war auch das Ausmaß der Hemmung durch die TAK1-Mutante nur schwer zu detektieren, konnte jedoch in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Darüber hinaus scheint die basale p38-Aktivität durch die Überexpression des GFP-TAK1-wt Fusionsproteines erhöht zu werden, wie der Vergleich mit der Kontroll- und der GFP-TAK_{K63W}-Linie zeigt.

Inwieweit die TNF α -abhängige Aktivierung von p38 von TAK1 abhängt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einem ähnlichen retroviralen Überexpressions-System in humanen THP-1 Zellen beobachteten Lee et al. (Lee, J. et al., 2000) zwar die TAK1-abhängige IL-1 α - und LPS-Aktivierung von p38, JNK und IKK β , jedoch wird bei ihren Experimenten die Aktivierung von p38 (und wie später diskutiert auch von IKK β) durch TNF α nicht durch die Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante gehemmt. Auf der anderen Seite konnten Sakurai et al. (Sakurai, H. et al., 1999) zeigen, dass die katalytische Aktivität von endogener TAK1 durch TNF α stimuliert wird und dass immunpräzipitierte endogene TAK1 aus TNF α -stimulierten Zellen *in vitro* den p38-Aktivator MKK6 phosphorylieren kann. Eine Funktion von TAK1 bei der TNF α -induzierten Aktivierung des JNK-Signalweges ist explizit bis heute nicht gezeigt wor-

den. Insgesamt gibt es also nur wenig direkte Evidenz für eine Rolle von TAK1 in der TNF α -induzierten JNK- und p38-Aktivierung.

Hemmung des NF- κ B Signalweges durch Überexpression von GFP-TAK1_{K63W}

Die Untersuchungen, die zur Funktion von TAK1 bei der IL-1 α - und TNF α -induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durchgeführt wurden, ergaben, dass TAK1 eine sehr wichtige Funktion bei der Weiterleitung zu diesem Signalweg einnimmt.

Die Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante bewirkt eine komplette Hemmung der cytosolischen Aktivierung von NF- κ B, wie durch EMSA-Experimente gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen damit aus der Literatur bekannte Daten, die zeigen, dass die Koexpression von TAB1 und TAK1 zur Kerntranslokation von NF- κ B führt (Sakurai, H. et al., 1998, Holtmann, H. et al., 2001) und dass dominant negativ wirkende Mutanten von TAK1 die NF- κ B Aktivierung nach IL-1 α Stimulation (Ninomiya-Tsuji, J. et al., 1999) und TNF α Stimulation (Sakurai, H. et al., 1999) inhibieren.

Kürzlich wurden diese Befunde untermauert, in dem in einem genetischen Ansatz mit Hilfe von siRNA ebenfalls gezeigt wurde, dass TAK1 wichtig für die IKK-Aktivierung bei IL-1 α - und TNF α - Stimulation ist (Takaesu, G. et al., 2003). In der gleichen Veröffentlichung konnte zum erstenmal gezeigt werden, dass TAK1 TNF α -abhängig mit dem TNF-R1-Adaptermolekül TRAF2 und den beiden IKK-Komplex Komponenten IKK α und IKK β interagiert. Diese Befunde stimmen mit den hier getroffenen eigenen Befunden zur Rolle von TAK1 bei NF- κ B Aktivierung überein.

Die in den EMSA-Experimenten beobachtete extrem starke Inhibition des NF- κ B-Signalweges durch die TAK1-Mutante konnte mit Reporter-genversuchen bestätigt werden. Die Aktivität eines Reporterkonstruktes mit einer dreifachen NF- κ B-Konsensus-Erkennungssequenz als Promotor war sowohl basal als auch bei Stimulation mit IL-1 α oder TNF α gegenüber der Kontrolllinie und der GFP-TAK1wt-Linie sehr stark gehemmt. Jedoch war die relative Induktion dieses Reportergens bezogen auf das basale Niveau der einzelnen Zelllinien durch IL-1 α oder durch TNF α in allen drei Linien noch vergleichbar stark. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass es in den Zellen Signalwege gibt, die TAK1-unabhängig zur Regulation des NF- κ B-Signalweges beitragen. Um zu untersuchen, ob diese putativen Signalwege an der cytosolischen Aktivierung von NF- κ B angreifen oder das transaktivierende Potential von kernständigen NF- κ B-Komponenten regulieren, wurde das transaktivierende Potential von p65 mit einem

GAL4-Reportergensystem untersucht (Schmitz, ML. and Baeuerle, PA., 1991). Bei diesem System wird das transaktivierende Potential von p65 unabhängig von seiner Kerntranslokation und seiner DNA-bindenden Eigenschaften untersucht. Es zeigte sich, dass dieses in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie ebenfalls signifikant in basalem Zustand gehemmt ist. Dies deutet darauf hin, dass nukleäre Funktionen von NF- κ B, die unabhängig vom IKK Komplex sind, durch TAK1 beeinflusst werden könnten und dass von TAK1 weitere, komplexe genregulatorische Vorgänge abhängen.

Der PI3-Kinase-PKB/Akt Signalwege wird TAK1-unabhängig Aktiviert

Das transaktivierende Potential von p65 wird durch eine ganze Reihe von Signalwegen und posttranslationalen Modifikationen moduliert (Übersichten Schmitz, ML. et al., 2001, Vermeulen, L. et al., 2002). Einer dieser Signalwege, der auch von IL-1 α und TNF α aktiviert wird, ist der PI3-Kinase-PKB/Akt-Signalweg, wobei die Phosphorylierung von Akt an Ser-473 ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung dieser Kinase ist. Die Aktivierung wurde im Western-Blot anhand der Phosphorylierung mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl IL-1 α als auch TNF α in allen drei Zelllinien die Phosphorylierung von Akt/PKB an Ser-473 induzierten. Damit ist der PI3-Kinase Signalweg ein Beispiel für einen Cytokin induzierten Signalweg, der nicht abhängig von TAK1 ist. Gleichzeitig wird hier gezeigt, dass die beobachtete Hemmung der MAPK- und des NF- κ B-Signalweges nicht auf ein generelles Unvermögen der GFP-TAK1_{K63W}-Linie zurückzuführen ist, auf diese Stimuli zu reagieren.

Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Beobachtung, dass die Aktivierung dieses Signalweges durch IL-1 α durch direkte Rekrutierung der PI3-Kinase an den IL-1 Rezeptor-Komplex geschieht, unabhängig von dem MyD88-IRAK-TRAF6 Signalmodul (Reddy, SA. et al., 1997).

Die Wege, die zur Kopplung des PI3-Kinase-PKB/Akt-Signalweges an den TNF-Rezeptor Komplex führen, sind nicht gut verstanden, und es ist umstritten, ob der Beitrag des PI3-Kinase-PKB/Akt-Signalweges bei der TNF α -induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalweges vom IKK-Komplex abhängig ist oder nicht (Delhase, M. et al.,

2000). Daher ist die beobachtete Nicht-Hemmung TNF α -induzierter Akt-Phosphorylierung durch die Überexpression der inaktiven TAK1-Mutante schwer zu bewerten. Eine mögliche Antwort darauf ist eine zelltypspezifische Aktivierung des PI3-PKB/Akt-Signalweges durch proinflammatorische Cytokine, wie sie in einer publizierten Stellungnahme zu der eben erwähnten Veröffentlichung (Delhase, M. et al., 2000) postuliert wird.

Da in den hier verwendeten Zelllinien das transaktivierende Potential von p65 in der GFPTAK1_{K63W}-Linie gehemmt ist, obwohl der PI3-Kinase-PKB/Akt-Signalweg unbeeinflusst ist, liefern unsere Ergebnisse Evidenz dafür, dass es auch PI3-PKB/Akt-unabhängige Effekte auf die NF- κ B-Aktivität geben muss.

Bislang wurde unter anderem von der MAPKKK NIK gezeigt, dass sie bei der Aktivierung des p65-Signalweges durch TNF α zusammen mit PKB/Akt eine Rolle spielt (Oozes, ON. et al., 1999). Für die Rolle von TAK1 zur Aktivierung des PI3-Kinase-PKB/Akt-Signalweges gibt es bislang ebenfalls eine Veröffentlichung, die den eigenen Ergebnissen widerspricht. Lee, J. et al. finden in der murinen prä-B-Zelllinie 70Z/3, dass die Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante die Phosphorylierung an Ser-473 von PKB/Akt bei Stimulation mit LPS vollständig inhibiert (Lee, J. et al., 2000). Interessanterweise finden die Autoren in ihrem System zwar eine Inhibition der IKK β -Aktivierung durch die TAK1-Mutante, jedoch nicht der NF- κ B Translokation bei Stimulation mit LPS. Außerdem hemmte in ihrem System die Überexpression der TAK1-Mutante in humanen THP1-CD14 Zellen nicht die IKK β -Aktivierung durch TNF α . Damit widersprechen ihre Ergebnisse unseren eigenen und anderen aus der Literatur bekannten Befunden zur Rolle von TAK1 bei der Cytokin-induzierten NF- κ B-Aktivierung (Takaesu, G. et al., 2003).

Abschließend lässt sich sagen, dass TAK1 eine wichtige Funktion bei der cytokin-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalweges hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante die IKK-abhängige Aktivierung von NF- κ B nahezu komplett inhibiert. Außerdem ist das transaktivierende Potential von kernständigem NF- κ B in diesen Linien signifikant verringert. Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in Reporterassays mit einem NF- κ B-abhängigen Promotor in einer drastischen Verringerung der basalen und cytokin-induzierten Promotoraktivität. Die dort beobachtete verbliebene relative Aktivierbarkeit innerhalb der einzelnen Zelllinien durch IL1 α und TNF α , bezogen auf die Aktivität der jeweiligen unstimulierten Proben, ist aber ein Hinweis darauf, dass diese Stimuli den NF- κ B-Signalweg noch über

andere Signalwege, z. B. durch andere MAPKKK, zumindest modulieren können. Beispiele für MAPKKK, bei denen die Zerstörung ihrer funktionellen Gen-Loci eine adäquate Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch proinflammatorische Stimuli beeinträchtigen, sind die MAPKKK NIK (Yin, L. et al., 2001), MEKK3 (Yang, J. et al., 2001) oder MEKK1 (Xia, Y. et al., 2000).

Die Rolle von TAK1 bei der Cytokin-induzierten Genexpression

Die zur Signaltransduktion gewonnenen Daten belegen, dass die Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante zu einer drastischen Inhibition der drei wichtigsten Stress-Signalwege bei Stimulation mit IL-1 α und TNF α führt. Dabei erwiesen sich die durch Infektion mit Retroviren hergestellten Zelllinien aufgrund der homogenen, starken Überexpression und der genetischen Heterogenität als gutes Untersuchungsmodell. Seit Beginn der eigenen Untersuchungen sind von hauptsächlich zwei anderen Arbeitsgruppen sehr detaillierte Untersuchungen zur molekularen Kopplung und Aktivierung von TAK1 an den IL-1-Rezeptor veröffentlicht worden und auf die rezeptornahe Signaltransduktion anderer Entzündungs-Stimuli übertragen worden. Im starken Kontrast dazu ist sehr wenig über die Relevanz von TAK1 für die biologischen Effekte von IL-1 α oder anderen proinflammatorischen Stimuli bekannt. Bis heute sind keine Daten über Untersuchungen in TAK1-defizienten Mäusen publiziert worden.

IL-1 α und TNF α erzielen ihre biologische Wirkung dadurch, dass sie über die Aktivierung der Stress-Signalwege die Neusynthese von Proteinen induzieren, die für die Ausbildung einer Entzündung wichtig sind (Dinarello, CA., 2000). Die Auswirkung der Überexpression von der katalytisch inaktiven Mutante von TAK1 auf die Expression von solchen Genen wurde daher auf der Ebene der mRNA untersucht.

Zunächst wurde beispielhaft die Expression von Genen analysiert, die bekanntermaßen durch IL-1 α und/oder TNF α reguliert werden. Dabei wurden Gene identifiziert, die durch beide Cytokine induziert werden und deren Expression durch die katalytisch inaktive TAK1-Mutante inhibiert wird und solche, deren Expression unabhängig von TAK1 ist.

Untersucht wurde zunächst die Regulation der c-fos, c-jun und c-myc Gene, die für Transkriptionsfaktoren codieren. Die zweite Gruppe von untersuchten Genen beinhaltete mit mcp-1 und cox-2, solche Gene, die für wichtige Entzündungsmediatoren codieren. Wie weiter unten beschrieben, ist von allen Genen außer von c-myc bekannt, dass sie eine wichtige Funktion bei der Induktion einer Entzündung haben. Die Transkriptions-

faktoren c-Fos und c-Jun sind zwei von vielen möglichen Komponenten des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1, der bei der Regulation sehr vieler inflammatorischer Gene beteiligt ist, aber auch andere biologischer Phänomene wie Zellproliferation oder Zelltod kontrolliert (Shaulian, E. and Karin, M., 2002). Die AP-1 Komponenten sind selbst Ziel posttranslationaler Modifikationen durch die MAPK-Signalwege, durch die beispielsweise auch ihre Stabilität und ihre transkriptionelle Aktivität reguliert wird. Darüber hinaus wird ihre Expression durch externe Stimuli über die Aktivierung der MAPK-Signalwege kontrolliert und AP-1 selber ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Regulation sehr vielen entzündungsrelevanten Genen. Insgesamt lässt sich die Kontrolle von Entzündungsgenen durch AP-1 Transkriptionsfaktoren ein komplexes Netzwerk, das nicht gut verstanden ist. Es ist aber allgemein akzeptiert, dass c-Jun eine zentrale Rolle bei den AP-1 Komponenten einnimmt (Übersicht Karin, M. et al., 1997).

Die Induktion von AP-1 Transkriptionsfaktoren durch proinflammatorische Stimuli erfolgt durch die Aktivierung schon vorhandener Transkriptionsfaktoren im Nukleus über die MAPK-Signalwege. So wurde z. B. gezeigt, dass die Expression von c-Jun und c-fos nach IL-1-Stimulation induziert wird, und dass diese Aktivierung einhergeht mit einer Aktivierung von AP-1 (Muegge, K. et al., 1993). Wichtige Promotorelemente für die Cytokin-induzierte Expression von c-fos ist ein *serum response element* (SRE), das durch ternäre Komplex-Faktoren aktiviert wird (Whitmarsh, AJ. et al., 1997). Im Promotor von c-jun wurden zwei AP-1 Bindungsstellen gefunden, aufgrund derer eine autokrine, selbstverstärkende Schleife postuliert wird (Muegge, K. et al., 1993)

Das Chemokin MCP-1 wird von cytokin-stimulierten Zellen zur chemotaktischen Rekrutierung von Leukocyten, insbesondere Monocyten bei einer Entzündung sezerniert (Cross, AK. et al., 1997). Es gehört zur Gruppe der CC-Chemokine. Die Induktion seiner Expression durch Cytokine erfolgt durch Aktivierung der MAPK- und des NF- κ B-Signalweges. Der mcp-1 Promotor besitzt mehrere AP-1 und NF- κ B Bindungsstellen (Martin, T. et al., 1997).

Das vierte untersuchte Gen ist cox-2. Die Regulation der Expression von cox-2 erfolgt sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene. Dabei ist die cytokin-induzierte Aktivierung des p38- und des JNK-MAPK-Signalweges und des NF- κ B Signalweges wichtig (Guan, Z. et al., 1998, Hwang, D. et al., 1997). Neben NF- κ B haben auch die Transkriptionsfaktoren der CEBP (*CAAT/enhancer binding protein*)-Familie eine wichtige Rolle bei der cox-2-Expression (Caivano, M. et al., 2001).

Der Transkriptionsfaktor c-myc ist wichtig für die Zellzyklus-Regulation und wird durch mitogene Stimuli reguliert. Obwohl gezeigt wurde, dass die Expression von c-myc in Fibroblasten auch durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\alpha$ beeinflusst werden kann (Lin, JX. and Vilcek, J., 1987), ist bislang nicht bekannt, dass c-myc eine wichtige Rolle bei der akuten Antwort von Zellen auf proinflammatorische Stimuli spielt. Die Regulation von c-myc durch $\text{IL-1}\alpha$ involviert zwei NF- κ B-Bindungsstellen im c-myc Promotor (Kessler, DJ. et al., 1992). Aufgrund dieser Tatsachen und der Beobachtung, dass die Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante zu einem beschleunigtem Zellzyklus und erhöhter c-myc Expression führt, war ungewiss, ob in den untersuchten Zelllinien eine Beeinflussung der c-myc Expression zu beobachten sein würde.

Die Regulation dieser Gene wurde im Northern-Blot untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 bis 23 zusammengefasst. Bei der Untersuchung dieser Gene ergab sich, dass c-fos und cox-2 unabhängig von TAK1 induziert werden, c-jun und mcp-1 hingegen nicht. Das Gen Cox-2 ist das einzige der untersuchten Gene, dass in diesen Zellen nur durch einen der beiden Stimuli induziert wird ($\text{IL-1}\alpha$). Die Gene c-fos, c-jun und mcp-1 werden in diesen Zellen auf jeweils beiden Stimuli - $\text{IL-1}\alpha$ und $\text{TNF}\alpha$ - mit vergleichbarer Stärke und Kinetik gebildet. Auffällig ist dabei, dass die Hemmung von c-jun und mcp-1 durch die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante sehr stark ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die MAPKKK TAK1 essentiell ist für die Expression einer distinkten Gruppe von Cytokin-induzierbaren Genen, wohingegen andere induzierte Gene, wie z. B. c-fos oder cox-2 gar nicht von TAK1 abhängen.

Von c-myc ist in der Literatur beschrieben, dass die Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante die Expression von c-myc in primären Rattenleber-Zellen verstärkt (Bradham, CA. et al., 2001). In den untersuchten Linien konnte keiner dieser Effekte beobachtet werden. Die Expression von c-myc wurde weder durch die Stimulation mit $\text{IL-1}\alpha$ oder $\text{TNF}\alpha$, noch durch die stabile und starke Überexpression von GFP-TAK1wt bzw. GFP-TAK1_{K63W} beeinflusst. Diese Daten passen auch zu der Beobachtung, dass sich die Zelllinien in ihrer Proliferationsrate nicht merklich unterscheiden. Wahrscheinlich handelt es sich bei den Beobachtungen zu c-myc daher um ein zelltypspezifisches Phänomen.

Um die anhand von einzelnen Genen gewonnenen Befunde systematisch zu erweitern, wurden die Auswirkungen der Expression der katalytisch inaktiven TAK1-Mutante auf die cytokin-induzierte Genexpression mit Hilfe von hochdichten *Arrays* untersucht, auf denen die cDNA von 10.000 verschiedenen Maus-Genen vorliegen. Dabei erfolgte eine

Fokussierung auf TNF α als Stimulus, da sich dieses bei vielen unserer Befunde als stärkerer Stimulus erwies. Darüber hinaus lagen zu diesem Zeitpunkt für dieses Cytokin – wie erwähnt – weniger Erkenntnisse zur Rolle von TAK1 vor als für IL-1 α . Außerdem war es zur Beschränkung der aufwendigen Experimente notwendig, sich ausschließlich auf die „Leervirus“-infizierte Zelllinie als Referenz zu beziehen.

In initialen Experimenten wurde mit Fluoreszenzfarbstoff markierte cDNA aus unstimulierten Zellen zusammen mit cDNA der jeweils gleichen, für 4 Stunden mit TNF α stimulierten Zelllinien hybridisiert. Aus den Daten aller Genen wurden diejenigen gefiltert, die bestimmte Qualitätsmerkmale erfüllten und in den jeweiligen Zelllinien in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mindestens um den Faktor 2 induziert oder reprimiert wurden. Ein Vergleich beider Gengruppen ergab, dass eine relativ geringe Anzahl (518) aller regulierten Gene in beiden Linien gleich reguliert wird (Abb. 24). In der Kontrolllinie hingegen werden 1067 Gene durch TNF α anders reguliert als in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie. Durch diese Beobachtung wird untermauert, dass TAK1 sehr wahrscheinlich in genregulatorisch komplexe Vorgänge involviert ist, die viel mehr beinhalten, als nur die Aktivierung der MAPK- und des NF- κ B-Signalweges.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden TNF α -stimulierte Proben aus beiden Zelllinien gegeneinander hybridisiert. Auf diese Weise wurde ein Bild darüber gewonnen, inwieweit die TAK1-Mutante die absolute Menge an exprimierten Genen bei TNF α -Stimulation beeinflusst. Dies ist sehr wichtig, weil für viele Proteine, die an der Ausbildung einer Entzündung beteiligt sind, dies die entscheidende Größe ist, beispielsweise für sezernierte Proteine wie das Chemokin MCP-1.

Außerdem werden bei diesem experimentellen Vorgehen all jene Gene erfasst, deren Expression sowohl basal als auch bei Stimulation durch die inaktive TAK1-Mutante gehemmt ist.

Zu diesem Zweck wurden in einem zweiten Ansatz die für 4 Stunden mit TNF α -stimulierten Proben der Kontroll- und der GFP-TAK1_{K63W}-Linie gegeneinander hybridisiert. Es wurden alle Gene ausgewählt, die in allen drei so durchgeführten Experimenten mindestens um den Faktor 2 reguliert wurden. Dabei kristallisierte sich erstaunlicherweise heraus, dass eine sehr kleine Gruppe von Genen durch die Expression der inaktiven TAK1-Mutante beeinflusst wurde. Es wurden 26 Gene runter- und 37 Gene hochreguliert. Dieses Ergebnis war aufgrund der drastischen Hemmung der Stress-Signalwege durch die inaktive TAK1-Mutante unerwartet, ebenso wie die Tatsache, dass mehr Gene induziert als reprimiert werden. Viele der Gene in beiden Gruppen haben eine Funktion bei Entzündung oder Apoptose.

Die Regulation von vier Genen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit Entzündung stehen, aus der Gruppe der reprimierten Gene wurden im Northern-Blot nachuntersucht. Dabei konnten die Ergebnisse bestätigt werden. Außerdem zeigte sich hier ganz deutlich, dass die TNF α -induzierte Expression dieser Gene in der GFP-TAK_{K63W}-Linie vollständig gehemmt ist.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die TNF α -induzierte und TAK1-abhängige Aktivierung der Stress-Signalwege für die strikte Kontrolle einer ganz distinkten Gruppe von inflammatorisch relevanten Gene verantwortlich ist. Angesichts der Tatsache, dass eine Inhibition weiter unten in der Signalkaskade auf der Ebene der MAP-Kinasen durch z. B. niedermolekulare Inhibitoren die gleichzeitige Inhibition mehrerer Signalwege erfordert, um eine komplette Expressions-Inhibition von inflammatorischen Gene zu erzielen und diese Kombination mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist (Kracht, M. and Saklatvala, J., 2002, Vincenti, MP and Brinckerhoff, CE., 2001), lässt TAK1 sich als interessantes Ziel für einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung entzündlicher Krankheiten definieren.

Gleichzeitig implizieren die Ergebnisse aber auch, dass es andere TNF α -induzierte Signalwege geben muss als die MAPK- und den NF- κ B-Signalweg, die zur Induktion von Genexpression ausreichend sind. Es scheint offensichtlich so zu sein, dass einige dieser Signalwege TAK1-abhängig sind, wohingegen andere völlig unabhängig von TAK1 sind.

Eine interessante aber schwierige Aufgabe ist es herauszufinden, ob es ein gemeinsames Prinzip gibt, über das TAK1 genau diese Gene reguliert. Der Aufbau der bisher bekannten Promotor-Elemente der nachuntersuchten Gene ist im Wesentlichen sehr unterschiedlich. Es ist denkbar, dass alle Gene eine Bindungsstelle für eine bisher unbekanntes Transkriptionsfaktor haben. Außerdem sind Gemeinsamkeiten unter anderem bei der Regulation der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen bei induzierter Genexpression denkbar. Hierzu werden zur Zeit Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. In ersten Experimenten konnten Sabine Wolter und Elke Hoffman mit der Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitation zeigen, dass die Rekrutierung der RNA-Polymerase 2 an die Promotoren der nachuntersuchten Gene in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie inhibiert ist.

Aufgrund des Umfangs der DNA-*Array*-Experimente erfolgte eine Beschränkung auf den Zeitpunkt von vierstündiger TNF α -Stimulation. Es ist denkbar, dass die Expression von Genen durch die TAK1-Mutante derart verändert wird, dass eine Regulation durch TNF α immer noch stattfindet, jedoch mit einer veränderte Kinetik. Solche Effekte las-

sen sich genomweit nur mit sehr aufwendigen und kostspieligen Serien von DNA-Array-Experimenten erfassen. Für die Gruppe der von uns im Northern-Blot nachuntersuchten Gene konnte jedoch ein solcher Effekt mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Expression aller drei Gene konnte auch nach vierstündiger Stimulation mit TNF α , also zu einem Zeitpunkt, der deutlich später liegt als der der ersten Detektion ihrer mRNA in der Kontrolllinie.

Sensitivierung der NIH3T3 Zellen durch die Überexpression der katalytisch inaktiven TAK1 Mutante gegenüber TNF-induzierter Apoptose

Bei den Versuchen zur TNF α -stimulierten Genexpression zeigten die GFP-TAK1_{K63W} Zellen unerwartet eine starke Sensitivierung für TNF α -induzierten Zelltod. Es konnte gezeigt werden, dass der Zelltod durch TNF α mit gleicher Kinetik und mit gleicher Qualität wie durch Fas-Liganden induziert wurde. Durch weitergehende Untersuchungen konnte die Art des Zelltodes als Apoptose charakterisiert werden. Es wurde im einzelnen nachgewiesen, dass der beobachtete Zelltod mit typischen Zeichen der Apoptose einherging, nämlich Caspase-Aktivierung, Chromatin-Kondensation und Fragmentierung.

Genau wie der Fas-Rezeptor und andere sogenannte Todesrezeptoren ist TNF α in der Lage, neben der Aktivierung des MAPK- und des NF- κ B-Signalweges, über das Adaptermolekül FADD auch die Initiator-Caspase8 zu rekrutieren. In der Folge werden Caspase-Kaskaden aktiviert, die den Zelltod auslösen, da sie essentielle Proteine zerstören (Gupta, S. 2003). Aufgrund technischer Schwierigkeiten konnte die Aktivierung der rezeptornahen Caspase8 nicht gezeigt werden, sondern nur die Aktivierung der Effektor-Caspase3. Diese kann auch über einen alternativen den sogenannten intrinsischen Signalweg aktiviert werden, der notwendigerweise die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrien-Membran beinhaltet. Dieser Weg läuft aber im allgemeinen deutlich langsamer ab als der Caspase8-induzierte Weg. Mit einem etablierten Protokoll konnte bei den untersuchten Zellen keine Freisetzung von Cytochrom C in das Cytosol detektiert werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass dieser intrinsische Weg für die beobachtete Apoptose verantwortlich ist.

Die Rezeptor-vermittelte Apoptose, die durch Todesrezeptoren ausgelöst wird, lässt sich in TypI- und TypII-Apoptose unterteilen. Bei der TypI-Apoptose reicht die Caspase8 Aktivierung am Rezeptor aus, um die gesamte apoptotische Signalkaskade auszulösen. Bei der TypII-Apoptose wird die Caspase8 am Rezeptor quantitativ zu schwach akti-

viert, um nachfolgende apoptotische Signal-Kaskaden direkt auszulösen. Zur korrekten Aktivierung von Effektor-Caspasen ist in diesem Fall Amplifikationsschleife notwendig, die über die Spaltung des pro-apoptotischen Bcl-2 Protein Bid zur Freisetzung von weiteren pro-apoptotischen mitochondrialen Faktoren (z. B. Cytochrom C oder SMAC (*second mitochondria derived activator of caspases*)) führt. Diese Faktoren wiederum aktivieren Caspase9 und dadurch nachfolgend Caspase3, die einerseits apoptotische Zielmoleküle prozessiert, andererseits aber auch wiederum Caspase8-Moleküle aktiviert, welche nicht bereits am Rezeptorkomplex aktiviert wurden und so die Amplifikationsschleife schließt. Eine sehr wichtige Funktion haben dabei die Flip-Moleküle, die die Rekrutierung von Caspase8 an den Rezeptor inhibieren. Jeder dieser Schritte ist ein potentieller Regulationsmechanismus für den zeitlichen und quantitativen Verlauf der Apoptose (Wajant, H., 2002).

Die zuvor geschilderten Mechanismen der TypI und TypII Apoptose treffen prinzipiell für alle Todesrezeptoren zu. Die Besonderheit des TNF-R1 ist, dass er - wie erwähnt - neben den apoptotischen Signalwegen auch anti-apoptotische Signale transduzieren kann.

Die Sensitivierung der NIH3T3 Zellen für TNF α induzierte Apoptose durch die Überexpression der GFP-TAK1_{K63W}-Mutante kann mehrere mögliche Ursachen haben. Zum einen haben die eigenen Untersuchungen ergeben, dass in dieser Zelllinie die basale und die induzierte NF- κ B Aktivität stark vermindert ist. Es ist bekannt, dass NF- κ B generell eine anti-apoptotische Funktion besitzt, in dem es zur transkriptionellen Induktion anti-apoptotischer Gene beiträgt. Beispiele dafür sind die c-Flip-Moleküle und Moleküle der IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familie, die direkt die enzymatische Aktivität von Caspasen inhibiert (Karin, M. and Lin, A., 2002). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die verminderte NF- κ B-Aktivität in der GFP-TAK1_{K63W}-Linie die normale zelluläre Menge dieser anti-apoptotischen Moleküle senkt und so zu der sehr starken Sensitivierung führt. Unterstützt wird diese Vermutung durch Befunde über die Interaktion von TAK1 mit der MAPKKK ASK1 (Mochida, Y. et al., 2000). Die MAPKKK ASK1 aktiviert bei Überexpression den JNK- und den p38-Signalweg und es war bekannt, dass eine konstitutiv aktive Form von ASK1 Apoptose in verschiedenen Zelltypen auslöst, während eine dominant negative ASK1-Mutante TNF α -induzierte Apoptose verhindert (Ichijo, H. et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass ASK1 mit TAK1 interagiert, wodurch die TAK1-TRAF6-Interaktion und nachfolgend die TAK1-abhängige NF- κ B-Aktivierung verhindert wird. Es ist sehr gut vorstellbar, dass diese Ergebnisse auch auf die TRAF2-TAK1-Wechselwirkung bei der TNF α -induzierten Signaltransduktion über-

tragbar sind. Diese Ergebnisse suggerieren, dass in analoger Weise zu den hier erhobene Befunden, die Inhibition des NF- κ B-Signalweges auf der Ebene von TAK1 Zellen für TNF α -induzierte Apoptose sensitivieren kann.

Eine andere mögliche Ursache für die beobachtete Sensitivierung gegenüber TNF α -induzierter Apoptose ist die Inhibition des JNK-Signalweges durch die inaktive TAK1-Mutante. Die Rolle dieses Signalweges bei der Apoptose hängt ganz offensichtlich von dem Stimulus und dem Zelltyp ab. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die Inhibition, als auch die Aktivierung des JNK-Signalweges zur Apoptose beitragen kann, die durch Todesrezeptoren initiiert wird (Gupta, S., 2001). Kürzlich fand man, dass Mitglieder der IAP-Familie nicht nur durch Inhibition der katalytischen Aktivität von Caspasen anti-apoptotisch wirken, sondern auch durch Aktivierung des JNK-Signalweges. Von zwei Mitgliedern der IAP-Familie (XIAP und NIAP) wurde gezeigt, dass sie an TAK1 und JNK binden, und dass diese Interaktion, notwendig zur IAP-vermittelten JNK-Aktivierung und anti-apoptotischen Funktion der beiden IAP-Proteine ist, nicht aber die katalytische Aktivität von TAK1 (Sanna, MG. et al., 2002).

Generell ist es vorstellbar, dass die sehr starke Überexpression der TAK1-Mutante die korrekte Ausbildung von Signalkomplexen mit anti-apoptotischer Wirkung am Rezeptor oder weiter distal gelegener Komplexe, wie zum Beispiel der TAK1-IAP-JNK-Komplexe, beeinträchtigt. Zusätzlich erfordert dieser Mechanismus auch noch die katalytische Aktivität von TAK1, da in der GFP-TAK1wt-Linie, in der die Überexpression gegenüber dem endogenen Protein auch sehr stark ist, keine TNF α -induzierte Apoptose stattfindet.

Die Sensitivierung für Apoptose durch Überexpression einer katalytisch inaktiven TAK1-Mutante wurde durch eine Veröffentlichung einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, die dieses Phänomen in der murinen prä-B-Zelllinie 70Z/3, nicht aber in humanen THP-1 Zellen bei Stimulation mit LPS beobachteten (Lee, J. et al., 2000). Der Effekt wurde einer beobachteten Inhibition des PI3-Kinase-PKB/Akt-Signalweges zugeschrieben, was den Befunden unserer Arbeitsgruppe widerspricht. Die Zelltyp-Spezifität dieses Phänomens konnte jedoch durch eigene Befunde bestätigt werden. Bei Mausfibroblasten der Linie L929, die auf gleiche Weise hergestellt wurden und eine ähnlich hohe Überexpression der TAK1-Fusionsproteine zeigten, konnte keine TNF α -induzierte Apoptose detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Unsere Befunde verdeutlichen sehr gut, dass die Aktivierbarkeit des JNK- und des NF- κ B-Signalweges in zeitlicher und quantitativer Hinsicht in vitalen Zellen ausgewogen sein muss. Eine Störung dieses Gleichgewichtes in normalerweise vitalen Zellen

kann diese – je nach Zelltyp und äußeren Bedingungen – stark gegenüber TNF α -induzierter Apoptose sensitivieren.

Aktivierende Ubiquitylierung von TAK1 als Angriffspunkt pathogener Mechanismen

Bis heute ist der genaue Aktivierungsmechanismus des IKK-Komplexes nicht aufgeklärt. Vermutlich existieren eine Reihe von Möglichkeiten, wie dieser Multienzymkomplex durch extrazelluläre Stimuli aktiviert wird. Die Arbeitsgruppe von Chen et al. konnte zeigen, dass die Aktivierung des IKK-Komplexes durch IL-1 α und TRAF6 oder TNF α und TRAF2 die katalytische Aktivität von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen benötigt. Diese führen zur Konjugation von „atypischen“ an Lysin 63 (von Ubiquitin) verknüpften Poly-Ubiquitinketten an TRAF6 oder TRAF2. Dieses Ereignis ist essentiell zur Aktivierung des IKK-Komplexes durch Phosphorylierung. Kurz darauf wurde entdeckt, dass ein Komplex aus TAB1, TAK1 und TAB2 diejenige katalytische Aktivität besitzt, die durch die Ubiquitylierung induziert wird. Allerdings konnte dabei aber eine direkte Ubiquitylierung von TAK1, TAB1 oder TAB2 nicht nachgewiesen werden (Deng, L. et al., 2000, Wang, C. et al., 2001).

Es ist wichtig anzumerken, dass die durch atypische Konjugation von Ubiquitin vermittelte Aktivierung keine proteasomale Aktivität involviert. Vielmehr scheint es so zu sein, dass die Konjugation von Effektormolekülen mit Ubiquitin ein konserviertes Signal ist, das bei Ereignissen wie DNA-Reparatur, Stress-Antwort und Endocytose eine Rolle spielt (Pickart, CM., 2000).

In der vorliegenden Arbeit werden Daten präsentiert, die zeigen, dass eine direkte Ubiquitylierung von TAK1 bei Überexpression und wahrscheinlich auch cytokin-induziert bei endogenem TAK1 stattfindet. und dass diese Ubiquitylierung von TAK1 einhergeht mit der katalytischen Aktivierung von TAK1.

Außerdem wird Evidenz dafür gezeigt, dass dieser Aktivierungsschritt ein Angriffspunkt für pathogene Yersinien-Stämme ist. Yersinien führen zu Durchfällen bis hin zur Pest-Erkrankung und sind damit für humane Erkrankungen sehr wichtig. Von einem Virulenzfaktor dieser Stämme (YopP) war bekannt, dass er für Yersinien essentiell ist, um die durch die Yersinien-Infektion ausgelöste Aktivierung der MAPK-Signalwege und des NF- κ B-Signalweges auf der Ebene von MAPKK und von IKK zu inhibieren. Die simultane Inhibition beider Signalwege legt die Vermutung nahe, dass eine MAPKKK, die beide Signalwege aktivieren kann, durch YopP inhibiert wird. Des Weiteren konnte kürzlich demonstriert werden, dass YopP Proteaseaktivität besitzt, die spe-

zifisch für Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine, wie z. B. Sumo (*small ubiquitin-like modifier*) ist. YopP ist dabei nur einer von vielen auf einem extrachromosomalen Plasmid codierten Virulenzfaktoren von Yersinien. Seine Notwendigkeit zur Etablierung einer Yersinien-Infektion und zur Inhibition der Stress-Signalwege konnte u.a. durch Deletion des YopP-Locus demonstriert werden (Übersicht: Orth, K., 2002).

Für die Untersuchungen war es notwendig, ein in unserem Labor nicht vorhandenes *in vitro* Messsystem für die katalytische Aktivität von TAK1 aufzubauen. Es konnte im Einklang mit Literaturdaten eine Vorschrift entwickelt werden, mit der die katalytische Aktivität von überexprimiertem TAK1 bei Coexpression mit TAB1 detektiert werden kann, anhand der Autophosphorylierung beider Proteine und der Phosphorylierung des exogenen, spezifischen Substrates MKK6.

Es war auffällig, dass die Phosphorylierung von TAK1 auf einem Gradientengel als relativ stark verbreiterte Bande detektiert wird, was vermuten lässt, dass an TAK1 noch andere Modifikationen stattfinden. Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von YopP in HeLa und in HEK293-Zellen die Induktion eines Il-8-Reportergens durch TAK1/TAB1-Überexpression vollständig blockiert, während die Induktion durch andere Stimuli nur partiell inhibiert wird. Dies führte zu der Vermutung, könnte TAK1 ein spezifisches Ziel von YopP sein, und die im Kinaseversuch beobachtete Mobilitätsänderung im SDS-Gel von TAK1 könnte z. T. auf Ubiquitinylierung zurückzuführen sein, die durch die Proteaseaktivität von YopP entfernt oder verhindert wird.

Ubiquitinylierungen sind transiente Modifikationen, die oft nur schwer nachweisbar sind. Um die Hypothese zu testen, wurde die Ubiquitinylierung von TAK1 zunächst in einem Überexpressions-System untersucht und konnte auch erfolgreich nachgewiesen werden (wie auch eine Ubiquitinylierung von TAB1). Außerdem wurde gezeigt, dass die Coexpression von TAK1 und TAB1 mit YopP zu einem kompletten Verlust der TAK1-Kinaseaktivität *in vitro* führt, und gleichzeitig die Ubiquitinylierung von TAK1 nicht mehr vorhanden ist. Um nachzuweisen, dass diese Mechanismen auch bei endogenen Proteinen wichtig sind, wurde untersucht, ob die katalytische Aktivität von TAK1 durch YopP beeinflusst wird, und ob in der Zelle endogene TAK1 ubiquitinyliert wird. Der Nachweis der katalytischen Aktivität von endogener TAK1 ist bisher nur von einer Arbeitsgruppe veröffentlicht worden, die einen nicht kommerziell erhältlichen anti-TAK1 Antikörper zur Verfügung hatte, der in unserer Arbeitsgruppe leider nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Daher bestand nicht die Möglichkeit die kataly-

tische Aktivität endogener TAK1 zu untersuchen. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die katalytische Aktivität endogener TAK1 bis auf wenige Ausnahmen von den meisten Arbeitsgruppen nicht als Messparameter verwendet wird oder werden kann. Allerdings ist der durch die Aktivierung von TAK1 ausgelöste Änderung des Laufverhaltens im SDS-Gel mittlerweile gut untersucht und kann daher als Kriterium für eine Aktivierung von TAK1 herangezogen werden. (Kishimoto, K. et al., 2000). Durch Verwendung eines Lipid-Transfektions-Reagenzes konnten YopP-Expressionsplasmide mit großer Effizienz in HEK293-Zellen transfiziert werden. Es konnte mit dem *Shift* als Kriterium deutlich gezeigt werden, dass YopP in diesen Zellen die Aktivierung von endogener TAK1 nach IL-1 α Stimulation inhibierte.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass überexprimierte TAK1 durch endogenes Ubiquitin modifiziert wird. Außerdem konnte in bislang einem Experiment in HeLa-Zellen demonstriert werden, dass bei Stimulation mit IL-1 α oder TNF α stimulusabhängig ubiquitinylierte Proteine mit einem anti-TAK1 Antikörper präzipitiert werden können.

Zusammengenommen geben die gezeigten Ergebnisse eine starke Evidenz dafür, dass TAK1 ubiquitinyliert wird, dass diese Ubiquitinylierung bei der Aktivierung von TAK1 involviert ist und dass dieser Mechanismus durch den Yersinien-Virulenzfaktor YopP inhibiert wird.

Um diese Befunde zu untermauern, bedarf es noch einiger bestätigender Untersuchungen. So muss der Nachweis der stimulusabhängigen Ubiquitinylierung von endogener TAK1 in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden. Außerdem konnte eine Interaktion von YopP mit TAK1 oder TAB1 nicht einwandfrei nachgewiesen werden. Co-Immunpräzipitationen lieferten wahrscheinlich aufgrund der schwachen Expression von YopP kein Ergebnis über mögliche Interaktionen. Co-Präzipitationsversuche mit rekombinatem GST-YopP Fusionsprotein lieferten zwar Hinweise auf eine Interaktion jedoch war das Ergebnis nicht eindeutig, da überexprimiertes TAK1 eine starke unspezifische Affinität zu der verwendeten GSH-Sepharose Matrix zeigt. Die Versuche zur Interaktion von TAK1 und YopP sind zur Zeit noch nicht abgeschlossen. Prinzipiell ist es daher möglich, dass nicht ubiquitinylierte TAK1 das Ziel von YopP ist, sondern ein molekulares Ereignis oberhalb von TAK1, das zur Ubiquitinylierung von TAK1 notwendig ist, wie es z. B. der Aufbau von Poly-Ubiquitinketten an TRAF6 sein könnte. Zusätzlich zu Experimenten in intakten Zellen wäre es hilfreich, mit *in vitro* Experimenten nachzuweisen, dass die katalytische Aktivität von TAK1 durch Ubiquitinylierung

beeinflusst wird. Ein kürzlich veröffentlichtes konstitutiv aktives Fusionsprotein aus TAK1 und TAB1 könnte eine gute Ausgangsbasis für solche Versuche sein (Takaesu, G. et al., 2003). Alternativ könnten durch Struktur-Funktions-Analysen die zur Ubiquitinierung von TAK1 nötigen Lysine bei TAK1 definiert werden und deren Beitrag zur Regulation von TAK1 durch Mutagenese untersucht werden.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Mit Hilfe der in dieser Arbeit präsentierten Befunde war es möglich, der MAPKKK TAK1 eine zentrale Rolle bei der Regulation von Entzündungsvorgängen zuzuweisen. Die bereits bekannte Funktion von TAK1 bei der Signaltransduktion von IL-1 α konnte bestätigt und näher definiert werden. Hinzu kommen neue, bisher in dieser Form nicht bekannte Befunde über die Funktion von TAK1 bei der TNF α -induzierten Signaltransduktion. Damit stellt TAK1 einen sehr rezeptornah gelegenen Verknüpfungspunkt beider Cytokine dar. Die Inhibition auf der Ebene von TAK1 durch die Überexpression einer katalytisch inaktiven Mutante führt zu einer starken Inhibition von mindestens drei wichtigen Stress-Signalwegen, dem JNK-, dem p38- und dem NF- κ B-Signalweg bei Stimulation mit IL-1 α und TNF α .

Konsequenterweise spiegelt sich diese Inhibition auch in der cytokin-induzierten Genexpression wieder. Die Untersuchungen dazu ergaben überraschenderweise, dass nur die Expression einer relativ kleinen Gruppe von Genen in ihrer absoluten Menge wirklich betroffen ist, diese dafür aber sehr stark. Dies deutet darauf hin, dass es eine Gruppe von entzündungsrelevanten Genen gibt, deren Expression komplett von TAK1 abhängt. Die zentrale Funktion von TAK1 bei der unspezifischen Immunabwehr wird offenbar auch von pathogenen Mikroorganismen ausgenutzt, um diese Abwehr zu inhibieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Yersinien-Virulenzfaktors YopP zu einer kompletten Inhibition der katalytischen Aktivität von TAK1 führt. Dies ist das erste Mal, dass eine MAPKKK definiert werden konnte, deren Aktivität von diesem Virulenzfaktor getroffen wird. Im Zuge dessen wurde ebenfalls Evidenz dafür erhoben, dass die Aktivierung von TAK1 seine direkte Ubiquitynylierung involviert, und dass genau dieser Mechanismus durch YopP attackiert wird. Diese Befunde würden eine offene Lücke bei der Frage nach der genauen Kopplung von Cytokin-Rezeptoren an die Stress-Signalwege schließen.

Aufgrund der erhobenen Befunde könnte sich TAK1 als eine ideale molekulare Zielstruktur erweisen, um eine Inhibition von inflammatorisch wichtigen Genen über die gleichzeitige Inhibition von mehreren Stress-Signalwegen zu erreichen, und diese Signalwege dennoch prinzipiell für andere Stimuli offen zu halten. Eine therapeutische Anwendung dieser Erkenntnisse bei der Behandlung von chronischen, entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis könnte in einem Einsatz von dominant negativ wirkenden TAK1-Proteinen durch adenoviralen Gentransfer oder von TAK1

abgeleiteten membrangängigen Peptiden bestehen. Zur Zeit arbeitet unsere Gruppe an der Herstellung von transgenen Mäusen, die eine katalytisch inaktive Mutante gewebespezifisch überexprimieren soll. An Entzündungsmodellen mit solchen Mäusen ließe sich die Funktion von TAK1 gut demonstrieren. Außerdem stehen mittlerweile Adenoviren zur Expression einer inaktiven TAK1-Mutante in einem Tiermodell zur Verfügung. Die Funktionalität dieser Adenoviren konnte bereits in primären Zellen demonstriert werden.

Die Befunde dieser Arbeit sind in Abbildung 42 als einfaches Schema zusammengefasst.

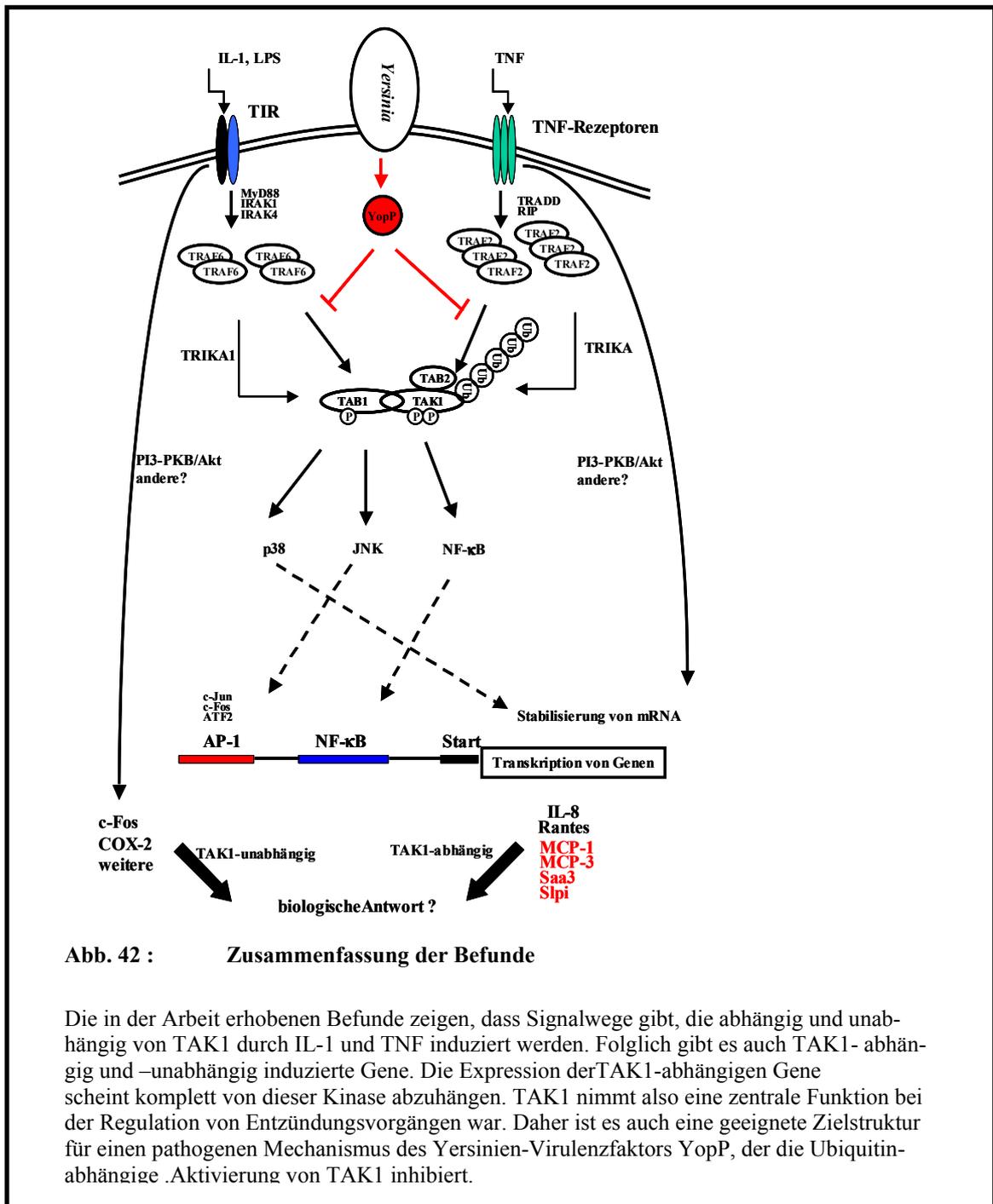


Abb. 42 : Zusammenfassung der Befunde

Die in der Arbeit erhobenen Befunde zeigen, dass Signalwege gibt, die abhängig und unabhängig von TAK1 durch IL-1 und TNF induziert werden. Folglich gibt es auch TAK1-abhängig und -unabhängig induzierte Gene. Die Expression der TAK1-abhängigen Gene scheint komplett von dieser Kinase abzuhängen. TAK1 nimmt also eine zentrale Funktion bei der Regulation von Entzündungsvorgängen wahr. Daher ist es auch eine geeignete Zielstruktur für einen pathogenen Mechanismus des Yersinien-Virulenzfaktors YopP, der die Ubiquitin-abhängige Aktivierung von TAK1 inhibiert.

7 Literaturverzeichnis

- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W.
Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation.
Cell. 1993 May 7;73(3):431-45.
- Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M.
Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain.
Genes Dev. 1999 May 15;13(10):1297-308.
- Bradham CA, Hatano E, Brenner DA.
Dominant-negative TAK1 induces c-Myc and G(0) exit in liver.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Nov;281(5):G1279-89.
- Caivano M, Gorgoni B, Cohen P, Poli V.
The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors.
J Biol Chem. 2001 Dec 28;276(52):48693-701.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV.
TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1.
Nature. 1996 Oct 3;383(6599):443-6.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995 May 19;81(4):505-12.
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci*. 2002 Feb 15;115(Pt 4):679-88. Review.
- Cornelis GR.
Yersinia type III secretion: send in the effectors.
J Cell Biol. 2002 Aug 5;158(3):401-8. Review.
- Cross AK, Richardson V, Ali SA, Palmer I, Taub DD, Rees RC.
Migration responses of human monocytic cell lines to alpha- and beta-chemokines.
Cytokine. 1997 Jul;9(7):521-8.
- Delhase M, Li N, Karin M.
Kinase regulation in inflammatory response.
Nature. 2000 Jul 27;406(6794):367-8.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ.
Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.
Cell. 2000 Oct 13;103(2):351-61.
- Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z. 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*. 2000 Apr;12(4):419-29.
- Devin A, Lin Y, Yamaoka S, Li Z, Karin M, Liu Zg.
The alpha and beta subunits of I kappa B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF.
Mol Cell Biol. 2001 Jun;21(12):3986-94.
- Dinareello CA.
Proinflammatory cytokines.
Chest. 2000 Aug;118(2):503-8. Review.

- Duan H, Dixit VM.
RAIDD is a new 'death' adaptor molecule.
Nature. 1997 Jan 2;385(6611):86-9.
- Goswami M, Uzgare AR, Sater AK.
Regulation of MAP kinase by the BMP-4/TAK1 pathway in Xenopus ectoderm.
Dev Biol. 2001 Aug 15;236(2):259-70.
- Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR.
Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells.
J Biol Chem. 1998 Oct 30;273(44):28670-6.
- Gupta S.
Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis
Int J Oncol. 2003 Jan;22(1):15-20.
- Gupta S.
Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis.
Curr Mol Med. 2001 Jul;1(3):317-24. Review.
- Hanada M, Ninomiya-Tsuji J, Komaki K, Ohnishi M, Katsura K, Kanamaru R, Matsumoto K, Tamura S.
Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C.
J Biol Chem. 2001 Feb 23;276(8):5753-9.
- Holtmann H, Enninga J, Kalble S, Thiefes A, Dorrie A, Broemer M, Winzen R, Wilhelm A, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Resch K, Kracht M.
The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation.
J Biol Chem. 2001 Feb 2;276(5):3508-16.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV.
TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex.
Immunity. 1996(A) Apr;4(4):387-96.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV.
TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.
Cell. 1996 Jan 26;84(2):299-308.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.
The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.
Cell. 1995 May 19;81(4):495-504.
- Hwang D, Jang BC, Yu G, Boudreau M.
Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages.
Biochem Pharmacol. 1997 Jul 1;54(1):87-96.
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y.
Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways.
Science. 1997 Jan 3;275(5296):90-4.
- Irie T, Muta T, Takeshige K.
TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages.
FEBS Lett. 2000 Feb 11;467(2-3):160-4.
- Jadrich JL, O'Connor MB, Coucouvanis E.
Expression of TAK1, a mediator of TGF-beta and BMP signaling, during mouse embryonic development.
Gene Expr Patterns. 2003 May;3(2):131-4.
- Jang SB, Won J, Kim H, Kim J, Lee KH, Han H, Rha HK, Choi CR.
TAK1 mediates lipopolysaccharide-induced RANTES promoter activation in BV-2 microglial cells.
Mol Cells. 2002 Aug 31;14(1):35-42.
- Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, Li X.
Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol.
Mol Cell Biol. 2002 Oct;22(20):7158-67.

- Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X.
Poly(dI x dC)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NF-kappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase(IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR.
J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):16713-9.
- Karin M, Lin A.
NF-kappaB at the crossroads of life and death.
Nat Immunol. 2002 Mar;3(3):221-7. Review.
- Karin M, Liu Z, Zandi E.
AP-1 function and regulation.
Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr;9(2):240-6. Review.
- Kessler DJ, Duyao MP, Spicer DB, Sonenshein GE.
NF-kappa B-like factors mediate interleukin 1 induction of c-myc gene transcription in fibroblasts.
J Exp Med. 1992 Sep 1;176(3):787-92.
- Kishimoto K, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J.
TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop.
J Biol Chem. 2000 Mar 10;275(10):7359-64.
- Komatsu Y, Shibuya H, Takeda N, Ninomiya-Tsuji J, Yasui T, Miyado K, Sekimoto T, Ueno N, Matsumoto K, Yamada G.
Targeted disruption of the Tab1 gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis.
Mech Dev. 2002 Dec;119(2):239-49.
- Kracht M, Saklatvala J.
Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation.
Cytokine. 2002 Nov;20(3):91-106.
- Kyriakis JM, Avruch J.
Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.
Physiol Rev. 2001 Apr;81(2):807-69. Review.
- Lee J, Mira-Arbibe L, Ulevitch RJ. TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. J Leukoc Biol. 2000 Dec;68(6):909-15.
- Li MG, Katsura K, Nomiyama H, Komaki K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Kobayashi T, Tamura S.
Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Cepsilon).
J Biol Chem. 2003 Apr 4;278(14):12013-21.
- Lin JX, Vilcek J.
Tumor necrosis factor and interleukin-1 cause a rapid and transient stimulation of c-fos and c-myc mRNA levels in human fibroblasts.
J Biol Chem. 1987 Sep 5;262(25):11908-11.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M.
Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death.
Cell. 1996 Nov 1;87(3):565-76.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.
The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.
Cell. 2001 Feb 23;104(4):487-501. Review..
- Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW.
TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling.
Genes Dev. 1999 Apr 15;13(8):1015-24.
- Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR.
Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1.
Eur J Immunol. 1997 May;27(5):1091-7.
- Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, Sakurai H, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Sakurai N.
Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6.
Mol Cell Biol. 2002 Feb;22(4):992-1000.

- Mochida Y, Takeda K, Saitoh M, Nishitoh H, Amagasa T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Ichijo H. ASK1 inhibits interleukin-1-induced NF-kappa B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):32747-52.
- Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, Gotoh Y, Irie K, Kano T, Shirakabe K, Muro Y, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E, Hagiwara M. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem.* 1996 Jun 7;271(23):13675-9.
- Muegge K, Vila M, Gusella GL, Musso T, Herrlich P, Stein B, Durum SK. Interleukin 1 induction of the c-jun promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 1;90(15):7054-8.
- Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med.* 1998 Jun 15;187(12):2097-101.
- Natoli G, Costanzo A, Ianni A, Templeton DJ, Woodgett JR, Balsano C, Levrero M. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science.* 1997 Jan 10;275(5297):200-3.
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature.* 1999 Mar 18;398(6724):252-6.
- Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, Stewart S, Rudolph AE, Bliska JB, Dixon JE. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science.* 1999 Sep 17;285(5435):1920-3.
- Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE. Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science.* 2000 Nov 24;290(5496):1594-7.
- Orth K. Function of the Yersinia effector YopJ. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Feb;5(1):38-43. Review.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999 Sep 2;401(6748):82-5.
- Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB. YopJ of Yersinia pseudotuberculosis is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol.* 1998 Mar;27(5):953-65.
- Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, Wu H. Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature.* 1999 Apr 8;398(6727):533-8.
- Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci.* 2000 Nov;25(11):544-8. Review.
- Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH, McWhirter SM, Everdeen DS, Alber T, Crute JJ, Kehry MR. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry.* 1999 Aug 3;38(31):10168-77.
- Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem.* 2001 Nov 9;276(45):41661-7.
- Reddy SA, Huang JH, Liao WS. Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation. *J Biol Chem.* 1997 Nov 14;272(46):29167-73.

- Reinhard C, Shamon B, Shyamala V, Williams LT.
Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2.
EMBO J. 1997 Mar 3;16(5):1080-92.
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV.
TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40.
Science. 1995 Sep 8;269(5229):1424-7.
- Rothwarf DM, Karin M.
The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus.
Sci STKE. 1999 Oct 26;1999(5):RE1. Review.
- Ruckdeschel K, Machold J, Roggenkamp A, Schubert S, Pierre J, Zumbihl R, Liautard JP, Heesemann J, Rouot B.
Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production.
J Biol Chem. 1997 Jun 20;272(25):15920-7.
- Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T.
Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1.
FEBS Lett. 2000 Jun 2;474(2-3):141-5.
- Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, Sugita T.
Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation.
J Biol Chem. 1999 Apr 9;274(15):10641-8.
- Sakurai H, Shigemori N, Hasegawa K, Sugita T.
TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappa B-inducing kinase-independent mechanism.
Biochem Biophys Res Commun. 1998 Feb 13;243(2):545-9.
- Sanjo H, Takeda K, Tsujimura T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Akira S. TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling. Mol Cell Biol. 2003 Feb;23(4):1231-8.
- Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N, Deveraux QL, Ulevitch RJ. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. Mol Cell Biol. 2002 Mar;22(6):1754-66.
- Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, Neurath MF, Pettersson S, Wolf-Watz H.
The yopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity.
Mol Microbiol. 1998 Jun;28(6):1067-79.
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M.
I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations.
Trends Biochem Sci. 2001 Mar;26(3):186-90. Review.
- Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. EMBO J. 1991 Dec;10(12):3805-17.
- Shaulian E, Karin M.
AP-1 as a regulator of cell life and death.
Nat Cell Biol. 2002 May;4(5):E131-6. Review.
- Shibuya H, Iwata H, Masuyama N, Gotoh Y, Yamaguchi K, Irie K, Matsumoto K, Nishida E, Ueno N.
Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early Xenopus development.
EMBO J. 1998 Feb 16;17(4):1019-28.
- Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K.
TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction.
Science. 1996 May 24;272(5265):1179-82.

Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E. TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1997 Mar 28;272(13):8141-4.

Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD. Activation of NF-kappa B by nontypeable *Hemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 17;98(15):8774-9.

Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 1995 May 19;81(4):513-23.

Tada K, Okazaki T, Sakon S, Kobarai T, Kurosawa K, Yamaoka S, Hashimoto H, Mak TW, Yagita H, Okumura K, Yeh WC, Nakano H. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem.* 2001 Sep 28;276(39):36530-4.

Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell.* 2000 Apr;5(4):649-58.

Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, Li X, Stark GR, Matsumoto K. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2001 Apr;21(7):2475-84.

Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol.* 2003 Feb 7;326(1):105-15.

Terada Y, Nakashima O, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. TGF-beta-activating kinase-1 inhibits cell cycle and expression of cyclin D1 and A in LLC-PK1 cells. *Kidney Int.* 1999 Oct;56(4):1378-90.

Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, Vanden Berghe W, Haegeman G. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol.* 2002 Sep;64(5-6):963-70. Review.

Vincenti MP, Brinckerhoff CE. The potential of signal transduction inhibitors for the treatment of arthritis: Is it all just JNK? *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(2):181-3.

Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1635-6. Review.

Wald D, Commane M, Stark GR, Li X. IRAK and TAK1 are required for IL-18-mediated signaling. *Eur J Immunol.* 2001 Dec;31(12):3747-54.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001 Jul 19;412(6844):346-51.

Wang W, Zhou G, Hu MC, Yao Z, Tan TH. Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J Biol Chem.* 1997 Sep 5;272(36):22771-5.

Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol.* 1997 May;17(5):2360-71.

Xia Y, Makris C, Su B, Li E, Yang J, Nemerow GR, Karin M. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5243-8.

Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*. 1995 Dec 22;270(5244):2008-11.

Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, Deng L, Liao W, Chen Z, Liu Z, Su B. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol*. 2001 Jul;2(7):620-4.

Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV, Mak TW. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*. 1997 Nov;7(5):715-25.

Yin L, Wu L, Wesche H, Arthur CD, White JM, Goeddel DV, Schreiber RD. Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science*. 2001 Mar 16;291(5511):2162-5.

Zhang Y, Bliska JB. Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to *Yersinia* infection. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1513-9.

Zhou G, Lee SC, Yao Z, Tan TH. Hematopoietic progenitor kinase 1 is a component of transforming growth factor beta-induced c-Jun N-terminal kinase signaling cascade. *J Biol Chem*. 1999 May 7;274(19):13133-8.

Lebenslauf

Name: Axel Thiefes

Geburtsdatum: 09. Juli 1973
Geburtsort: Aachen

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: September 1980 – Juni 1984
Kath. Grundschule Fröbelstraße, Langenfeld/Rhld.

August 1984 – Juni 1993
Marienschule Opladen, staatl. anerkanntes
privates Gymnasium

Schulabschluß: Abitur am 1993-06-14

Wehrersatzdienst 1993-07-01 – 1994-09-30
Diakonie Langenfeld, Ev. Kirchengemeinde Langenfeld-Reusrath

Studium: 1994-10-01 – 2000-01-24
Biochemie (Diplom) an der Universität Hannover

Titel der Diplomarbeit Konstruktion und funktionelle Charakterisierung von eukaryotischen Expressionsvektoren für TGF β *activated protein kinase* (TAK)

Studienabschluß: Diplom-Biochemiker

Promotionstudium: seit Februar 2000 in der Abteilung Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der AG von Dr. Michael Kracht unter Anleitung von Prof. Dr. W. Müller (Zentrum Biochemie)

Liste publizierter Abstrakta

1. M.Kracht, J.Enninga, S.Kälble, **A.Thiefes**, A.Dörrie, M.Broemer, R.Winzen, A.Wilhelm, J.Ninomiya-Tsuji, K.Matsumoto, K.Resch, H.Holtmann. The MAPKK TAK1 plays a central and non-redundant role in coupling the IL-1 receptor to both, transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. A20005
3rd Joint Meeting of the International Cytokine Society (ICS) and International society for interferon and cytokine research (ISICR), Amsterdam, The Netherlands/Israel, 5.-9.11.2000
Eur.Cytokine Netw. 11: 50, 130, 2000
2. M.Kracht, J.Enninga, S.Kälble, **A.Thiefes**, A.Dörrie, M.Broemer, R.Winzen, A.Wilhelm, J.Ninomiya-Tsuji, K.Matsumoto, K.Resch, H.Holtmann. The MAPKKK TAK1 plays a central and non-redundant role in coupling the IL-1 receptor to both, transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation.F.20
Joint annual meeting 2000 of German and Dutch societies of Immunology, Düsseldorf, 29.11.2000-2.12.2000 **Immunbiol. 203(1-3): 117, 133, 2000**
3. **Tiefes, A.**, Dörrie, A., Graue, N., Holtmann, H., Resch, K., and Kracht, M. Suppression of gene expression induced by double-stranded RNA, tumor necrosis factor and interleukin-1 by a retrovirally expressed mutant of the protein kinase TAK1. **A 246**
Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 363 No.4: R65, R81, 2001
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 42.Frühjahrstagung, Mainz, 13.03.-15.03.2001
4. **Thiefes, A.**, Wolter, S., Hoffmann, E., Holtmann, H., Resch, K., and Kracht, M. A kinase-negative mutant of the MAPK kinase kinase TAK1 inhibits stress signalling and sensitizes NIH3T3 cells to TNF- α -induced apoptosis. Page 120
5th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 8.11.-10.11.2001
Signal Transduction 1-2: 120, 139, 2001
5. **A.Thiefes**, S.Wolter, F.Mushinsky, E.Hoffmann, A.Dörrie, N.Graue, H.Holtmann, K.Resch, and M.Kracht. A kinase-negative mutant of the MAPK kinase kinase TAK1 inhibits stress signalling and sensitizes NIH3T3 cells to TNF- α -induced apoptosis.213
Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. supplement to vol. 365: R56, R57, R73, 2002
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 43.Frühjahrstagung, Mainz, 12.03.-14.03.2002
6. Holtmann, H., Enninga, J., Kälble, S., **Thiefes, A.**, Dörrie, A., Broemer, M., Winzen, R., Wilhelm, A., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Resch, K., and Kracht, M. The MAPKKK TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. ***J.Biol.Chem., published, JBC papers in press, Oktober 24, (2000)***
and 276:3508-3516, **(2001) 7.258**
7. **Thiefes, A.**, Wolter, S., Dittrich-Breiholz, O., Mushinski, J.F., Hoffmann, E., Dörrie, A., Graue, N., Resch, K., Kracht, M. The MAPK kinase kinase TAK1 controls a selective set of IL-1 and TNF- induced inflammatory genes
6th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 7.11.-9.11.2001

Hannover, 2003-06-05

(Axel Thiefes)