

**Charakterisierung der Molekularen Funktionen der WD-Repeat
Proteine RACK1 und FAN und ihr Einfluss auf die TNF-vermittelte
Signalweiterleitung**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Eva Keller
aus Stade

2005

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Blaschek
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam
Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2005
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 13. Juli 2005
Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Grotemeyer (Dekan)

Meiner Familie gewidmet

Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.

Hermann Hesse

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	4
2.1	SIGNALWEITERLEITUNG AM TNF-REZEPTOR 1	4
2.1.1	Tumor Nekrose Faktor α (TNF)	4
2.1.2	TNF-Rezeptor	5
2.2	WD-REPEAT PROTEINE	7
2.2.1	RACK1 (Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1)	10
2.2.2	FAN (Faktor assoziiert mit der nSMase Aktivierung)	12
2.2.3	Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) Protein und <i>beige</i> Protein	13
2.3	PROTEIN-KINASE-C (PKC)	14
2.4	SPHINGOMYELINASEN	15
2.4.1	Neutrale Sphingomyelinase	17
2.4.1.1	Neutrale Sphingomyelinase 1	17
2.4.1.2	Neutrale Sphingomyelinase 2	18
2.4.2	Saure Sphingomyelinase	18
2.5	HEFE „TWO-HYBRID“ SYSTEM	20
2.5.1	Die Elemente des LexA Systems	21
2.5.1.1	Köderprotein im Vektor plex 202	22
2.5.1.2	Beuteprotein im Vektor 4-5 stuffer bzw. Vektor pB42AD	23
2.5.2	Durchführung des „Two-Hybrid“ Screenings	23
2.6	FRAGESTELLUNG	25
3	Material und Methoden	26
3.1	GERÄTE UND MATERIALIEN	26
3.2	CHEMIKALIEN, ENZYME UND REAGENZIEN	28
3.3	ANTIKÖRPER	30
3.4	VEKTOREN	31
3.4.1	plex 202	31
3.4.2	4-5 stuffer	31
3.4.3	pPKC β -EGFP	32

3.4.4	pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His A	32
3.4.5	pCR-Blunt II TOPO	33
3.4.6	pB42AD	33
3.5	DNA TECHNIKEN	34
3.5.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
3.5.2	Plasmidpräparation	36
3.5.2.1	Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> mittels „Boiling Mini-Prep“ (Del Sal et al., 1988)	36
3.5.2.2	Plasmidpräparation mittels Macherey und Nagel Kits	36
3.5.2.3	Aufbereitung der DNA aus der „Boiling Mini Prep“ für Sequenzierung	36
3.5.3	Sequenzierung der Plasmid DNA	37
3.5.4	Sequenzierprimer	38
3.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.6	TRANSFORMATION PROKARYOTISCHER ZELLEN	39
3.6.1	Transformation in chemisch kompetente Zellen	39
3.7	ARBEITEN MIT HEFE	40
3.7.1	Transfektion des Hefestammes JK103	40
3.7.1.1	Plasmidgewinnung aus Hefe	41
3.7.2	Identifikation von Interaktionspartnern der neutralen Sphingomyelinase 2 im Hefe „Two-Hybrid“ System	41
3.7.3	Untersuchung von Proteinlysaten aus Hefe	43
3.8	ZELLINIEN UND ZELLKULTUR	43
3.9	TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN	44
3.9.1	Transiente Transfektion von HEK 293 mittels der Calcium- Phosphat-Methode	44
3.9.2	Transiente Transfektion der murinen Embryonal Fibroblasten mit Lipofectamine 2000	45
3.10	STIMULATION VON ZELLEN	45
3.11	SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT ANALYSE	46
3.11.1	Zellysate	46
3.11.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	46
3.12	IMMUNPRÄZIPITATION	47

3.13	HERSTELLUNG VON KERNEXTRAKTEN	48
3.14	UNTERSUCHUNG DER SENESZENZ-ASSOZIIERTEN β-GALAKTOSIDASE AKTIVITÄT	49
3.15	IMMUNFLUORESCENZEN	49
3.15.1	Untersuchung von Fibroblasten	49
3.15.2	Untersuchung von NK-Zellen	50
3.15.3	Aufnahmen am LSM	51
3.16	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	51
4	Ergebnisse	52
4.1	EINFLUSS VON TNF AUF DIE TRANSLOKATION DER KLASSISCHEN PKCs UND RACK1 IN MURINEN EMBRYONALEN FIBROBLASTEN	52
4.1.1	Endogene PKC- β -II und endogenes RACK1 transloziert in EF FAN WT nach PMA Stimulation nicht an die Plasmamembran	52
4.1.2	Endogene PKC- β -I transloziert in EF FAN WT nach PMA Stimulation nicht in die Kernperipherie	54
4.1.3	Endogene PKC- α transloziert in EF FAN WT oder EF FAN KO nach PMA Stimulation nicht an die Plasmamembran	56
4.1.4	Endogene PKC transloziert in EF FAN WT und EF FAN KO nach Stimulation mit PMA bzw. TNF nicht	57
4.1.5	Überexprimierte PKC- β -II-EGFP transloziert in EF nach PMA Stimulation an die Plasmamembran, nicht jedoch nach TNF Stimulation	61
4.1.6	Überexprimierte PKC- β -II-EGFP transloziert in MCHS Zellen nach PMA Stimulation an die Plasmamembran, RACK1 jedoch nicht	64
4.1.7	Untersuchung von murinen NK Zellen in der Immunfluoreszenz	67
4.1.7.1	Kontrolle der Reinheit der murinen NK-Zellen nach Isolierung mit dem NK Cell Isolation Kit	67

4.1.7.2	In murinen NK-Zellen ist nach Stimulation mit PMA oder TNF keine Translokation der endogenen PKC- β -II zu erkennen	69
4.1.8	Inkubation der EF mit zwei verschiedenen Antikörpern für myc-RACK1	70
4.2	KOLOKALISATION VON AKTIN UND RACK1	72
4.3	TRANSLOKATION VON RACK1 IN DEN ZELLKERN	76
4.3.1	RACK1 transloziert nach TNF Stimulation in den Zellkern	76
4.3.2	Nach Fraktionierung ist im Western-Blot keine Translokation von RACK1 in den Zellkern zu erkennen	76
4.4	PHOSPHORYLIERUNG VON RACK1 DURCH TNF	77
4.4.1	Nach Stimulation mit TNF ist keine vermehrte Phosphorylierung von RACK1 zu erkennen	77
4.5	INTERAKTION VON FAN UND RACK1	80
4.5.1	RACK1 und die WD-Domäne von FAN interagieren	81
4.5.2	RACK1 und die PH und BEACH Domäne von FAN interagieren	82
4.5.3	Interaktionen verschiedener Deletionsmutanten von RACK1 mit FAN	84
4.5.3.1	Herstellung von Deletionsmutanten von RACK1	84
4.5.4	Untersuchung der Interaktionen der RACK1-Deletionsmutanten im Hefe „Two-Hybrid“ System	85
4.5.4.1	FAN und RACK1 WD1 interagieren nicht	87
4.5.4.2	FAN und RACK1 WD 1-2 interagieren nicht	88
4.5.4.3	FAN und RACK1 WD 1-6 interagieren nicht	89
4.6	ÜBEREXPRESSION DER NEUTRALEN SPHINGOMYELINASE 2	91
4.6.1	Umklonierung der nSMase2 in verschiedene Vektoren	91
4.6.2	Überexpression der nSMase 2 in EF FAN WT und EF FAN KO	92
4.7	SENESZENZ-ASSOZIIERTE BETA-GALAKTOSIDASE-AKTIVITÄT	93
4.7.1	EF FAN WT und EF FAN KO zeigen nach Transfektion mit der nSMase 2 keine Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität	93

4.7.2	Sowohl mit nSMase 2 transfizierte als auch untransfizierte EF FAN WT und EF FAN KO zeigen eine lysosomale β -Galaktosidase-Aktivität	95
4.8	INTERAKTIONEN VON FAN UND DER NSMASE 2	97
4.8.1	Überexprimierte nSMase 2 und überexprimiertes FAN interagieren nicht	97
4.8.2	Der α -FAN Antikörper von Santa Cruz erkennt nur überexprimiertes FAN	98
4.8.3	nSMase 2 lässt sich nach Immunpräzipitation vom volle-Länge-FAN nicht darstellen	99
4.8.4	Interaktionen von FAN und nSMase 2 im Hefe „Two-Hybrid“ System	100
4.8.4.1	Darstellung der Negativ- und Positivkontrollen für die Interaktionskontrolle von FAN und nSMase 2	100
4.8.4.2	Im Hefe „Two-Hybrid“ System interagieren die nSMase2 und FAN nicht	101
4.9	SUCHE NACH INTERAKTIONSPARTNERN DER NSMASE 2 IM HEFE „TWO-HYBRID“ SYSTEM	103
4.9.1	Genbibliothekscreen	103
4.9.2	Cyclophilin als möglicher Interaktionspartner	104
5	Diskussion	106
5.1	UNTERSUCHUNG DER TNF ABHÄNGIGEN TRANSLOKATION DER PKC UND DER DAMIT VERBUNDENEN KOLOKALISATION VON RACK1	106
5.1.1	Untersuchung der Translokation von PKC	106
5.1.2	Translokation der PKC nach TNF Stimulation	107
5.1.3	Untersuchung der Kolokalisation von PKC und RACK1	108
5.2	INTERAKTIONEN VON FAN UND RACK1	109
5.3	PHOSPHORYLIERUNG VON RACK1	111
5.4	KOLOKALISATION VON AKTIN UND RACK1	112
5.5	TRANSLOKATION VON RACK1 IN DEN ZELLKERN	113
5.6	DIREKTE INTERAKTION DER NSMASE 2 MIT FAN	114
5.7	SENESZENZ	115

5.8	AUSBLICK	116
6	Zusammenfassung	117
7	Summary	119
8	Literatur	120
9	Danksagung	129
10	Lebenslauf	131
11	Erklärung	132

1 Abkürzungsverzeichnis

aSMase (ASM)	saure Sphingomyelinase (<u>a</u> cid <u>S</u> phingom <u>y</u> elin <u>a</u> se)
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
C/RPMI	Medium (entwickelt am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute)
CAPK	<u>C</u> eramid <u>a</u> ktiviert <u>e</u> <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
cDNA	komplementäre DNA
CHS	<u>C</u> hediak- <u>H</u> igashi- <u>S</u> yndrom
DAG	<u>D</u> iacylglycerin
DAPI	4'-6 <u>D</u> iamino-2- <u>P</u> henylindol
DD	Todesdomäne (<u>D</u> eath <u>D</u> omain)
DMEM	Medium (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>m</u> edium)
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Nukleotid
DO	<u>D</u> rop <u>o</u> ut
ECL	Verstärktes Chemilumineszenz Licht (<u>e</u> nhan <u>c</u> ed <u>c</u> hemilumines <u>c</u> en <u>c</u> e <u>l</u> ight)
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraessigsäure
EF	<u>e</u> mbryonale <u>F</u> ibroblasten
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<u>e</u> nhan <u>c</u> ed <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
ERK	<u>e</u> xtrazellulär <u>r</u> egulierte <u>K</u> inase
FADD	<u>F</u> as <u>a</u> ssoziiertes <u>D</u> D-Protein
FAN	<u>F</u> aktor assoziiert mit der <u>n</u> SMase
FCS	Fötale Kälber Serum (<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum)
FITC	<u>F</u> luoresze <u>i</u> n <u>i</u> s <u>o</u> thi <u>c</u> yanat
Gal	Galaktose
Glc	Glukose
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)- <u>p</u> iperazin- 1- <u>e</u> than- <u>s</u> ulfonsäure

HLA	<u>h</u> umanes <u>L</u> eukozyten <u>a</u> ntigen
IGF1	Insulin Wachstumsfaktor 1 (Insulin <u>G</u> rowth <u>F</u> actor 1)
IP	<u>I</u> mmunpräzipitation
Isc1p	<u>I</u> nositol- <u>P</u> hospho <u>s</u> phingolipid <u>P</u> hospholipase <u>C</u>
JNK	c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminale <u>K</u> inase
kDa	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LSM	<u>L</u> aser- <u>S</u> can- <u>M</u> ikroskop
MCS	Klonierungsstelle (<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite)
MEK	<u>M</u> itogen aktivierte <u>E</u> rk <u>K</u> inase
MCHS	<u>m</u> urines <u>C</u> HS
NF-κB	<u>N</u> ukleärer <u>F</u> aktor- <u>κ</u> B
NK-Zelle	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzelle
NLS	<u>N</u> ukleäres <u>L</u> okalisationssignal
NSD	<u>N</u> eutrale <u>S</u> phingomyelinase aktivierende <u>D</u> omäne
nSMase (NSM)	<u>n</u> eutrale <u>S</u> phingomyelinase
OD ₆₀₀	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte einer Lösung/Suspension, gemessen bei einer Wellenlänge von <u>600</u> nm
PAGE	<u>P</u> olyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalz Lösung (<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>S</u> aline)
PBST	Phosphatgepufferte Kochsalz Lösung mit 0,1% Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PE	<u>P</u> hycoerythrin
Pfx	DNA-Polymerase aus Pyrococcus sp.
PH-Domäne	<u>P</u> leckstrin <u>H</u> omologie-Domäne
PKC-β	<u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>C</u> β
PLA ₂	<u>P</u> hospholipase <u>A</u> ₂
PMA	<u>P</u> horbol- <u>M</u> yristat- <u>A</u> acetat
POD	<u>P</u> eroxidase des Meerrettichs
RACK1	<u>R</u> ezeptor assoziiert mit der <u>A</u> ktivierung der <u>C</u> Proteinkinase
RIP	<u>R</u> ezeptor <u>i</u> nteragierendes <u>P</u> rotein
SAPK	<u>S</u> tress <u>a</u> ktiviert Protein <u>K</u> inase

SA- β -Gal	<u>S</u> eneszenz- <u>a</u> ssoziierte <u>β</u> - <u>G</u> alaktosidase Aktivität
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Th. aquaticus</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalz Lösung (<u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>S</u> aline)
TBST	Tris gepufferte Kochsalz Lösung mit 1% Tween
TEMED	N,N, N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
TNF	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor
TNF-R55	55 kDa TNF-Rezeptor (TNF-R1)
TNF-R75	75 kDa TNF-Rezeptor (TNF-R2)
TRADD	<u>T</u> NF- <u>R</u> ezeptor <u>a</u> ssoziiertes <u>D</u> D-Protein
TRAF2	<u>T</u> NF- <u>R</u> ezeptor <u>a</u> ssoziierter <u>F</u> aktor <u>2</u>
Tris	<u>T</u> rihydroxymethylaminomethan
TRITC	<u>T</u> etramethyl- <u>R</u> hodamin- <u>I</u> sothiocyanat
WT	<u>W</u> ildtyp
X-Gal	3-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YAC	künstliche Hefechromosomen (<u>Y</u> east <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome)
YNB	Hefemedium (<u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase)

2 Einleitung

2.1 SIGNALWEITERLEITUNG AM TNF-REZEPTOR 1

2.1.1 Tumor Nekrose Faktor α (TNF)

Tumor Nekrose Faktor α ist ein Zytokin, das bei der Entzündung eine wichtige Rolle spielt. Nach einer lokalen Infektion setzen Makrophagen am Ort der Verletzung TNF frei. Diese stimuliert die Endothelzellen dazu, Proteine zu exprimieren, die die Blutgerinnung auslösen. Die dadurch gebildeten Gerinnsel verschließen kleine Blutgefäße und unterbinden somit den Blutfluss im betreffenden Gewebe. Hiermit wird verhindert, dass der Erreger in den Blutstrom gelangt und sich im gesamten Körper ausbreitet. Weiterhin wird durch TNF die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen hochreguliert. Dies ermöglicht die Bindung von Monozyten und Leukozyten aus dem Blut und das Auswandern der immunkompetenten Zellen in das umliegende Gewebe. Die Erreger werden von Phagozyten und Lymphozyten endozytiert, um dann verdaut und abgebaut zu werden. Über die Lymphe werden die auf den Immunzellen präsentierten Peptide in die Lymphknoten transportiert, wodurch eine adaptive Immunantwort ausgelöst werden kann (Janeway et al., 2002). Zusätzlich unterstützt TNF die Aktivierung von T- und B- Lymphozyten (Scheurich et al., 1987), fördert die Expression von MHC-Klasse-I-Antigenen (Doukas et al., 1990) und induziert in Nervenzellen über die Freisetzung von Prostaglandin E₂ Fieber (Dinarello et al., 1986).

Bei einer systemischen Infektion, die mit der übermäßigen Freisetzung von TNF durch Makrophagen einhergeht, haben die Effekte von TNF katastrophale Folgen. Die systemische Freisetzung führt zu einer Gefäßerweiterung und dem Verlust von Plasma ins umliegende Gewebe durch die erhöhte Permeabilität der Gefäße und damit zum Volumenmangelschock. Außerdem löst TNF an vielen Stellen spontan eine Blutgerinnung aus, die zu vielen kleinen Thrombosen führt. Durch den somit erhöhten Verbrauch an Gerinnungsproteinen ist eine angemessene Blutgerinnung in Geweben mit tatsächlichem Bedarf nicht mehr möglich,

was schnell zum Versagen lebenswichtiger Organe führt. Dies erklärt auch die hohe Sterblichkeit beim septischen Schock.

Gleichzeitig mit der Entdeckung von TNF als Faktor bei Entzündungen wurde auch seine Bedeutung bei der Kachexie deutlich. Ursache dafür ist die Herunterregulation der Lipoproteinlipase, dies gekoppelt mit einem Anstieg von Triglyceriden und einem Verbrauch von Proteinreserven (Beutler et al., 1986; Fong et al., 1989). Die pathologischen Wirkungen von TNF werden auch bei HIV-Infektionen (Duh et al., 1989; Osborn et al., 1989), Graft-versus-Host Reaktion (Holler et al., 1990), sowie bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. Rheumatoider Arthritis (Yocum et al., 1989) deutlich.

2.1.2 TNF-Rezeptor

TNF bindet an den TNF-Rezeptor, wobei hier zwei verschiedene Formen nebeneinander existieren. Der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) hat eine Größe von 55 kDa und wird daher auch als TNF-R55 bezeichnet, der TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2) mit einer Größe von 75 kDa, dementsprechend auch als TNF-R75.

In dieser Arbeit geht es um die Signalweiterleitung am TNF-R1.

TNF kann über den TNF-R1 verschiedene Signalwege aktivieren. Dabei sind die verschiedenen Domänen am TNF-R1 für die Aktivierung sehr unterschiedlicher Signalwege entscheidend.

Nach Bindung von TNF an den TNF-R1 und Trimerisierung des Rezeptors werden die Adaptermoleküle TRADD und FADD an die Todesdomäne (DD) rekrutiert. Dies induziert die Aktivierung der sauren SMase (2.4.2), wobei der genaue Signalweg, der zu dieser Aktivierung führt, bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist (Schwandner et al., 1998).

Ein anderer, über TRADD und FADD vermittelter Weg, ist die Typ I Apoptose. Dabei bindet FADD an die DD von TRADD und rekrutiert Pro-Caspase-8 in den Komplex. Durch autokatalytische Spaltung der Pro-Caspase-8 wird erst Caspase-8 und dann weitere Caspasen aktiviert und damit der Vorgang der Apoptose eingeleitet (Nicholson et al., 1997).

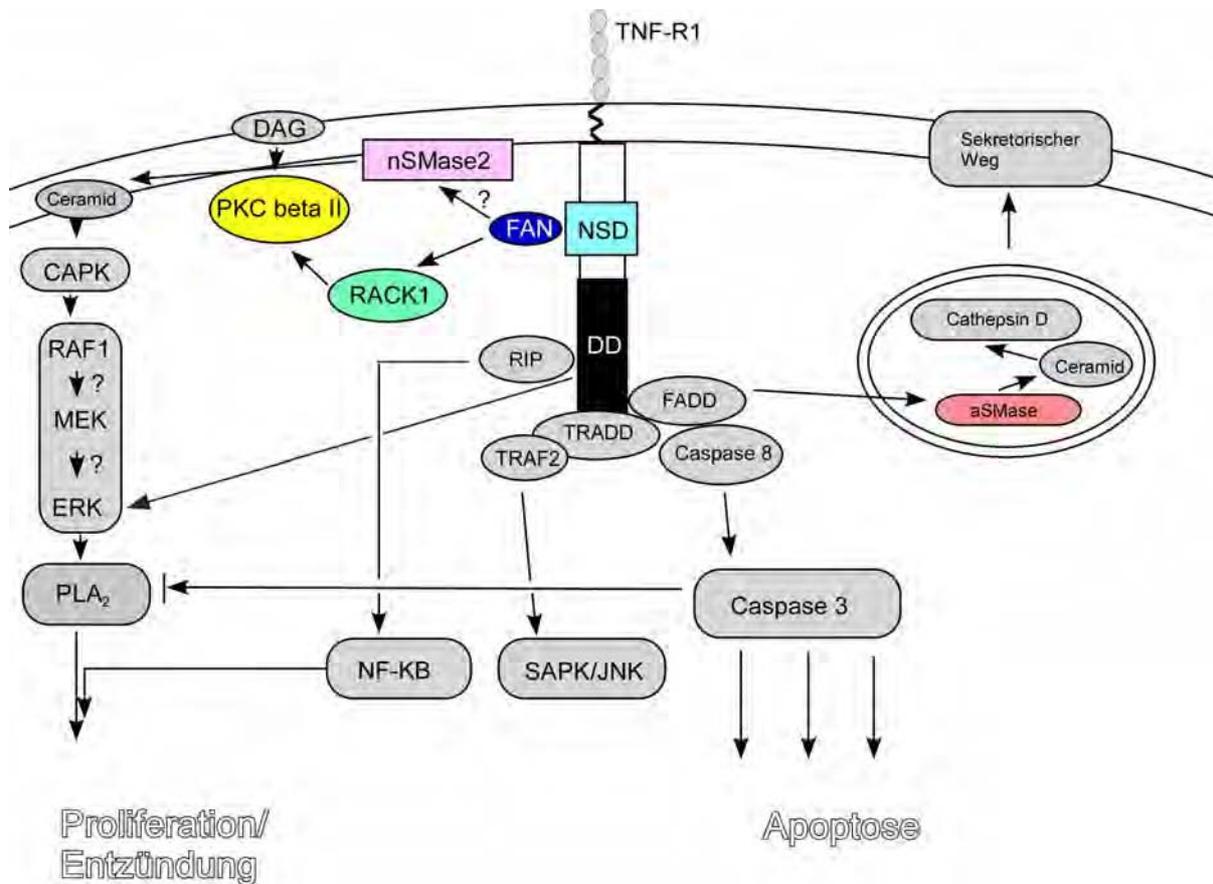


Abbildung 1: TNF Signalwege in der Zelle

Erläuterungen siehe Text.

Über den TNF-Rezeptor assoziierter Faktor (TRAF2), welcher ebenfalls an TRADD binden kann, werden „Stress-aktivierte Protein Kinasen“ (SAPK) und c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) aktiviert (Baud et al., 2001). Über das Rezeptor interagierende Protein (RIP) kann der NF- κ B Weg aktiviert werden (Kelliher et al., 1998).

Ein von der DD unabhängiger TNF-Signalweg ist der Weg über die nSMase-Aktivierungs-Domäne (NSD). Hierbei wird nach Ligandbindung das Adaptermolekül „Faktor assoziiert mit der neutralen Sphingomyelinase Aktivierung“ (FAN) an die NSD rekrutiert. Es konnte gezeigt werden, dass FAN einen Einfluss auf die Aktivierung der neutralen SMase hat (Adam-Klages et al., 1996), die wiederum membranständiges Sphingomyelin in Phosphocholin und den „second messenger“ Ceramid spalten kann (2.4.1.2). Für Ceramid ist eine Signalweiterleitung über die Ceramid aktivierte Protein

Kinase (CAPK) beschrieben worden (Huwiler et al., 1996), wobei der Weg zur Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) über CAPK fraglich ist. Die Arbeitsgruppe um Adam-Klages konnte eine direkte Aktivierung der ERK über die DD des TNF-R1 zeigen (Lüschen et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Protein RACK1 an FAN bindet (Tcherkasowa et al., 2002). RACK1 ist als „Rezeptor für Aktivierte C-Kinasen“ erkannt worden, seine zugehörige PKC ist die PKC- β -II (2.2.1). Dies lässt die Vermutung zu, dass über TNF auch eine Aktivierung der PKC- β -II möglich ist.

2.2 *WD-REPEAT PROTEINE*

Einige der am TNF-Signalweg beteiligten Proteine sind so genannte WD-Repeat Proteine. WD-Repeat Proteine gehören zu einer immer größer werdenden konservierten Proteinfamilie (Neer et al., 1994). Die Sequenz eines einzelnen WD-Repeat Proteins umfasst sich wiederholende Motive, die so genannten repeats (engl.: Wiederholung). Die Anzahl der WD-Repeats in einem WD-Repeat Protein schwankt zwischen vier und 16 Kopien. Dabei treten am häufigsten Proteine mit sieben Wiederholungen eines WD-Repeats auf (Smith et al., 1999).

Ein WD-Repeat besteht gewöhnlich aus einer Sequenz von 44-60 Aminosäuren, wobei sich das namensgebende WD-Dipeptid - W steht für die Aminosäure Tryptophan, D für die Aminosäure Aspartat - am C-Terminus befindet. Ein weiteres, für WD-Repeat Proteine charakteristisches Dipeptid, das GH-Dipeptid - G steht für die Aminosäure Glyzin, H steht für die Aminosäure Histidin - befindet sich am N-Terminus des WD-Repeats. Das GH- und das WD-Dipeptid werden von ungefähr 40 Aminosäuren getrennt. Diese Zahl erklärt auch die alternative Bezeichnung WD-40 anstelle von WD-Repeat. Eine allgemeine Formel für den Aufbau eines WD-Repeats zeigt Abbildung 2.

$$\{X_{6-94} - [GH - Y_{23-41} - WD]\}^N$$

Abbildung 2: Aufbau eines WD-Repeats

Hierbei steht X für die Aminosäureanzahl vor der Struktur des WD-Repeats, bzw. zwischen den einzelnen Repeats, Y zeigt die Anzahl der Aminosäuren zwischen GH und WD. N bezeichnet die Anzahl der Wiederholungen der Repeats.

Das bisher einzige WD-Repeat Protein, dessen Struktur aufgeklärt ist, ist die G β -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins (Wall et al., 1995; Sondek et al., 1996). Im G-Protein formt die G β -Untereinheit ein Dimer mit der G γ -Untereinheit.

Die G β -Untereinheit nimmt die Form eines β -Propellers an, wobei die WD-Repeats sich aus vier antiparallelen β -Blättern zusammensetzen. Dabei stimmt die Sequenz des WD-Repeats nicht mit dem Propellerblatt überein, jedes Blatt enthält 3 Bänder des einen und das vierte Band des nächsten WD-Repeats (Abbildung 3).

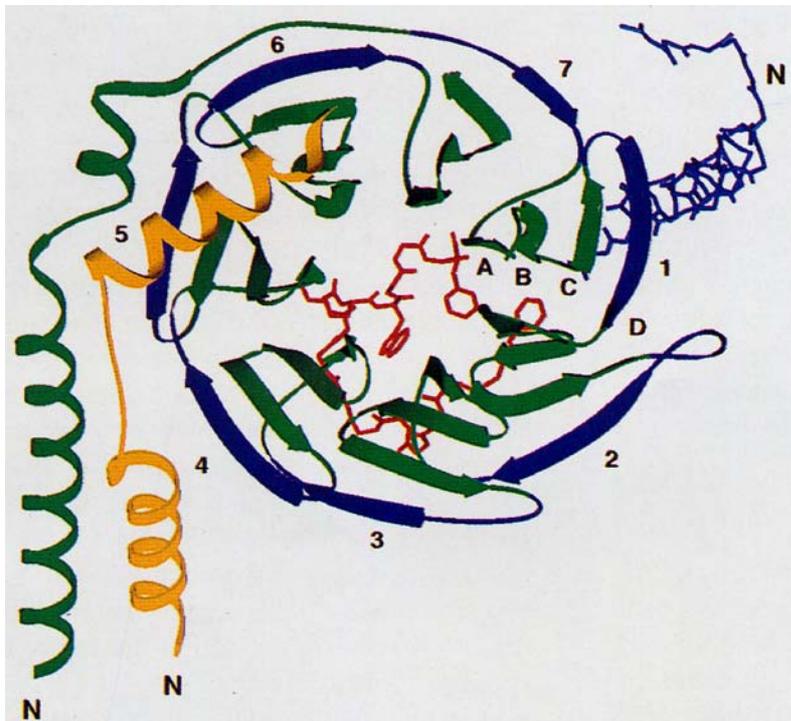


Abbildung 3: Struktur des G-Protein Heterotrimers (Wall et al., 1995)

Die Polypeptidketten, die die WD-Repeats verbindet, sind in Blau gezeichnet, sie entsprechen Strang D vom vorherigen WD-Repeat. Die Stränge vom ersten Propellerblatt sind von A bis D beschriftet. Die α -Untereinheit des G-Proteins ist in Rot dargestellt, die γ_2 -Untereinheit in Gelb.

Die β -Propeller-Struktur lässt drei potentielle Interaktionsoberflächen zu: die Oberseite, die Unterseite und den „Tunnel“, wobei davon ausgegangen wird, dass der „Tunnel“ zu eng für Protein-Protein-Interaktionen ist, aber vielleicht eine wichtige Rolle bei der Koordination verschiedener Proteine spielt (Garcia-Higuera et al., 1996).

WD-Repeat Proteine werden in fast allen Eukaryoten gefunden. Bis auf wenige Ausnahmen tauchen sie nicht in Prokaryoten auf. Dies lässt den Schluss zu, dass die WD-Repeat Familie in der ersten Entwicklungszeit der Eukaryoten entstanden ist. Auf der Internetseite des BMERC Instituts in Boston lässt sich überprüfen, ob ein Protein WD-Repeats enthält. (<http://bmerc-www.bu.edu/bioinformatics/wdrepeat.html>).

Von manchen WD-Repeat Proteinen sind inzwischen die Funktionen bekannt, es ist allerdings noch nicht ganz geklärt, ob die Funktionen vom WD-Repeat oder von den C- oder N-terminalen Domänen außerhalb der „Repeats“ abhängen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verschiedene biologische Funktionen von WD-Repeat Proteinen, (Li et al., 2001)

Biologische Funktion	Protein
Signal Transduktion	RACK1, G β Protein, FAN
RNA Synthese und Prozessierung	TATA-box-binding-protein associated factors (TAFs)
Chromatin Zusammenbau	chromatin assembly factor-1 (CAF-1)
Vesikulärer Transport	viele α und β COP Proteine, CHS, SEC13
Zytoskelett Zusammenbau	microtubule-associated protein (MAP), actin related protein (Arp2 und Arp 3)
Zellzyklus Regulation	cell division control protein 4 (CDC4), Coronin, spindle-checkpoint protein (Mad2)
Programmierter Zelltod	Apoptotic protease activating factor (Apaf-1)
unbekannte Funktionen	WDR1, WDR3

2.2.1 RACK1 (Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1)

Das WD-Repeat Protein RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) hat eine Masse von 36 kDa und besteht aus sieben WD-Repeats. Als Besonderheit weist RACK1 neben den WD-Repeats keine anderen Proteinendomänen auf. Da RACK1 viele Homologien zu der β -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins zeigt, wird auch bei RACK1 eine Faltung zum β -Propeller vorausgesagt.



Abbildung 4: RACK1 (Sengupta et al., 2004)

Aufsicht auf ein RACK1-Homologie Modell: Die einzelnen WD-Repeats sind farblich markiert, C- und N-Terminus sind gekennzeichnet.

Das Protein RACK1 wurde erstmals 1989 kloniert (Guillemot et al., 1989). Als RACK1 (Receptor for activated C-Kinase 1) wurde es allerdings erstmals 1994 von der Arbeitsgruppe um Mochly-Rosen bezeichnet (Ron et al., 1994), die das Protein als ein Ankerprotein für Protein Kinase C erkannten. RACK1 erfüllt die verschiedenen Kriterien, die ein RACK (Rezeptor für C-Kinasen) erfüllen muss (Dorn et al., 2002):

- Injektion von Zellen mit gereinigtem RACK blockiert PKC-vermittelte Zellprozesse
- Einbringen von Peptiden blockiert die Interaktionen zwischen einem PKC-Isoenzym und seinem RACK
- Injektion von Peptiden, welche die Interaktion vom PKC-Isoenzym und dem dazugehörigen RACK vermitteln, aktivieren die PKC
- RACK bindet an die PKC in Anwesenheit von PKC-Aktivatoren

Bis jetzt ist nur ein weiteres RACK entdeckt worden (Schechtman et al., 2002), das RACK2, welches an die PKC- ϵ bindet.

Bei den Protein-Kinasen C, mit denen RACK1 interagiert, handelt es sich um die klassischen PKC-Isoformen (2.3), wobei die PKC- β -II der wahrscheinlich bevorzugte Bindungspartner ist (Ron et al., 1994).

Neben den PKCs sind in den letzten Jahren noch viele weitere Proteine entdeckt worden, mit denen RACK1 interagiert (Tabelle 2). Dabei lassen sich zwei verschiedene Arten der Interaktionen unterscheiden: konstitutive und stimulusabhängige. Zu den stimulusabhängigen Interaktionen zählt z.B. die Interaktion von PKC- β -II mit RACK1.

Tabelle 2: RACK1 interagierende Proteine (McCahill et al., 2002)

RACK1 Interaktionsproteine	Referenzen
PKC- β : C2 und V5 Domäne	(Ron et al., 1995b; Stebbins et al., 2001)
PDE4D5	(Yarwood et al., 1999; Steele et al., 2001)
Src Kinase: Phosphotyrosin Binde Tasche der SH2 Domäne	(Chang et al., 2001)
PH-Domänen von β -Spectrin, β - Dynamamin und p120GAP	(Rodriguez et al., 1999)
GABA Typ A Rezeptor: α 1 und β 1 Untereinheit	(Brandon et al., 2002)
β -Integrin Untereinheit	(Liliental et al., 1998)
FAN	(Tcherkasowa et al., 2002)
HIV-Nef Protein	(Gallina et al., 2001)
NR2B Untereinheit des NMDA Rezeptors	(Yaka et al., 2002)
IGF-1 Rezeptor	(Hermanto et al., 2002; Kiely et al., 2005)

1999 konnte die Arbeitsgruppe um Yates (Link et al., 1999) mit Hilfe der Massenspektrometrie zeigen, dass RACK1 ein Teil der kleinen ribosomalen Untereinheit ist. 2004 wurde dann gezeigt, dass RACK1 auf dem Kopf der kleinen Untereinheit sitzt, in direkter Nähe zum Ausgang der mRNA. Dies legt die Vermutung nahe, dass RACK1 hier als Chaperon die verschiedenen Proteine in räumliche Nähe zu einander bringt und damit z.B. die Phosphorylierung von mRNA durch die PKC ermöglicht (Nilsson et al., 2004).

2.2.2 FAN (Faktor assoziiert mit der nSMase Aktivierung)

Das von der Arbeitsgruppe Krönke in einem Hefe „Two-Hybrid“ System gefundene Protein FAN, welches mit der NSD des TNF-R1 interagiert (Adam et al., 1995; Adam-Klages et al., 1996; Adam et al., 1996), ist ein weiteres WD-Repeat Protein (Abbildung 5). Dabei spielt FAN eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der nSMase (Adam-Klages et al., 1996; Adam-Klages et al., 1998). Eine negativ-dominante Mutante von FAN, die nur die WD-repeats 2-5 enthält (Abbildung 5), zeigt einen negativen Effekt auf die TNF-vermittelte Aktivierung der nSMase, eine C-terminale Deletionsmutante hat keinen Einfluss (Abbildung 5; (Adam-Klages et al., 1996). Für FAN homozygot defiziente (KO) Mäuse konnte eine gestörte Wundheilung und eine verzögerte Aktivierung der nSMase in ihren Thymozyten gezeigt werden, die Aktivierung der extrazellulär-regulierten Kinasen (ERKs) nach TNF-Stimulation war jedoch nicht gestört (Kreder et al., 1999). Obwohl FAN eine hohe Strukturähnlichkeit mit dem CHS/beige Proteinen aufweist, zeigen FAN KO Mäuse nicht den Phänotyp der *beige* Mäuse (2.2.3).

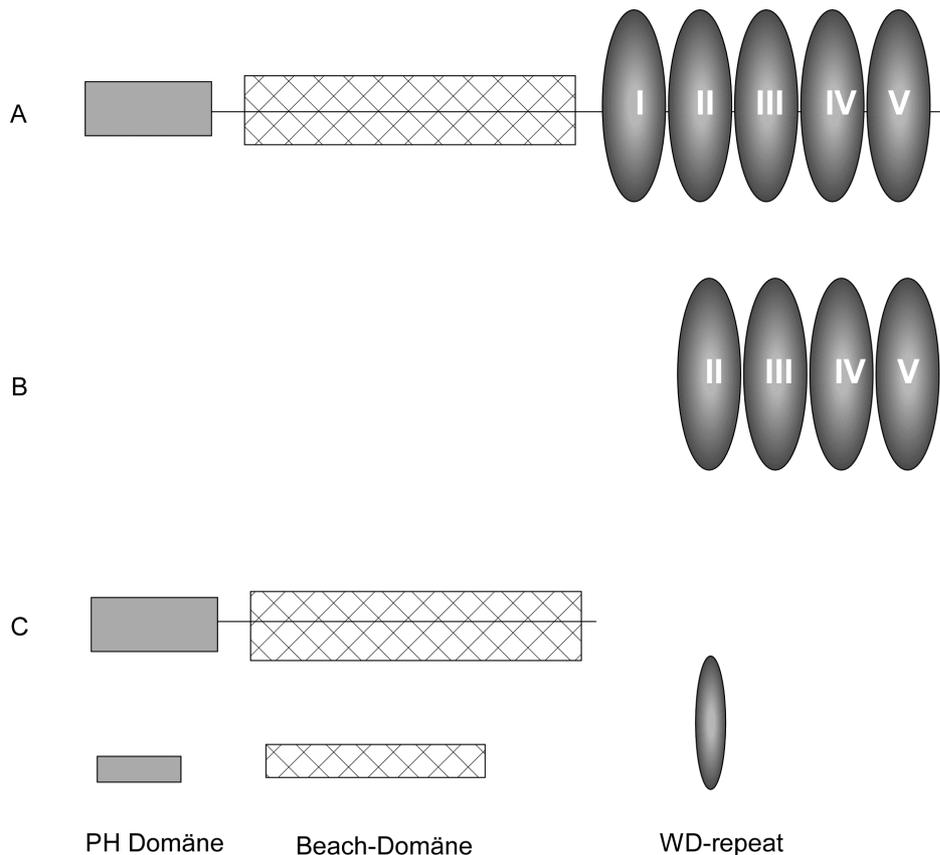


Abbildung 5: Vollständiges FAN Protein und FAN-Deletionsmutanten

Vollständiges FAN Protein (A), dominant-negatives FAN, das nur die WD-Repeats 2-5 enthält (B) und die C-terminale Deletionsmutante (C), weitere Erklärungen bei 2.2.2 und 2.2.3

2.2.3 Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) Protein und *beige* Protein

Das CHS Protein gehört ebenfalls zu den WD-Repeat Proteinen. Mutationen im CHS-Gen beim Menschen (Ward et al., 2000) führen zu Hypopigmentation, vermehrter Blutungsneigung und Dysfunktion der Immunzellen, z.B. der NK-Zellen, wobei die Anzahl dieser Zellen normal ist (Abo et al., 1982). Mäuse mit diesem Phänotyp werden *beige* (bg) Mäuse genannt. Fibroblasten dieser Mäuse fallen in der Zellkultur durch besonders große und sehr wenige Lysosomen auf. Die Arbeitsgruppe um Kaplan konnte durch das Klonieren der bg Region in künstliche Hefechromosomen (YAC) in Zellen mit dem beige Phänotyp den ursprünglichen Phänotyp wiederherstellen (Perou et al., 1997). Weiter konnte gezeigt werden, dass durch Fusion der murinen rekonstituierten *beige* Zellen mit humanen CHS

Zellen auch in den CHS Zellen der Phänotyp der humanen Zellen verändert werden konnte. Das so gefundene Gen für CHS-beige, auch LYST genannt, kodiert für ein zytosolisches, 3801 Aminosäuren großes Protein mit einem daraus resultierenden Molekulargewicht von 430 kDa. Alle bis jetzt beim Menschen bekannten Mutationen resultieren in einem Stopp Kodon, das ein verkürztes Protein bewirkt (Karim et al., 1997).



Abbildung 6: CHS/beige Protein (Ward et al., 2000)

CHS/beige Proteine besitzen N-terminal 20 bis 21 HEAT-Repeats, bei dieser Domäne vermutet man eine Assoziation mit dem Vesikeltransport. C-terminal befinden sich die WD-Repeats. Zwischen der HEAT und der WD-Repeat Domäne befindet sich die BEACH (beige/CHS) Domäne, wobei die BEACH- und die WD-Repeat-Domäne bei den CHS/beige homologen Proteinen hochkonserviert sind. Für die BEACH-Domäne ist unter anderem eine Rolle beim lysosomalen Transport beschrieben worden, andere BEACH-Proteine sind für Zytokinese wichtig (De Lozanne, 2003). Die in BEACH-Proteinen zusammen mit der BEACH-Domäne auftretende Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne ist für ihre Bindung mit Phosphatidylinositol bekannt, sie kann damit Proteine an Membranen verankern (Lemmon, 2004).

2.3 *PROTEIN-KINASE-C (PKC)*

Die Proteinkinase C Familie gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Sie lässt sich unterteilen in die klassischen PKCs, die „novel“ PKCs und die atypischen PKCs (Abbildung 7). Bei den klassischen PKCs führt ein durch Inositoltriphosphat (IP₃) angeregter Calciumanstieg zur Verlagerung der PKC aus dem Zytosol an die Membran. Hier wird sie durch eine Kombination von Ca²⁺, Diacylglycerin (DAG) und dem Membranphospholipid

Phosphatidylserin aktiviert. Nach der Aktivierung phosphoryliert die PKC ihre Zielproteine an bestimmten Serin- oder Threoninresten. Phorbolester wie z.B. Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) können die Wirkung von DAG nachahmen (Ron et al., 1999b).

Die unterschiedlichen klassischen PKC translozieren nach PMA Stimulation an unterschiedliche Orte in der Zelle (Goodnight et al., 1995). Die PKC- α transloziert an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums, die PKC- β -I an die Zellmembran, die PKC- β -II an das Aktinzytoskelett und an die Zellmembran und die PKC- γ an die Membran des Golgiapparates.

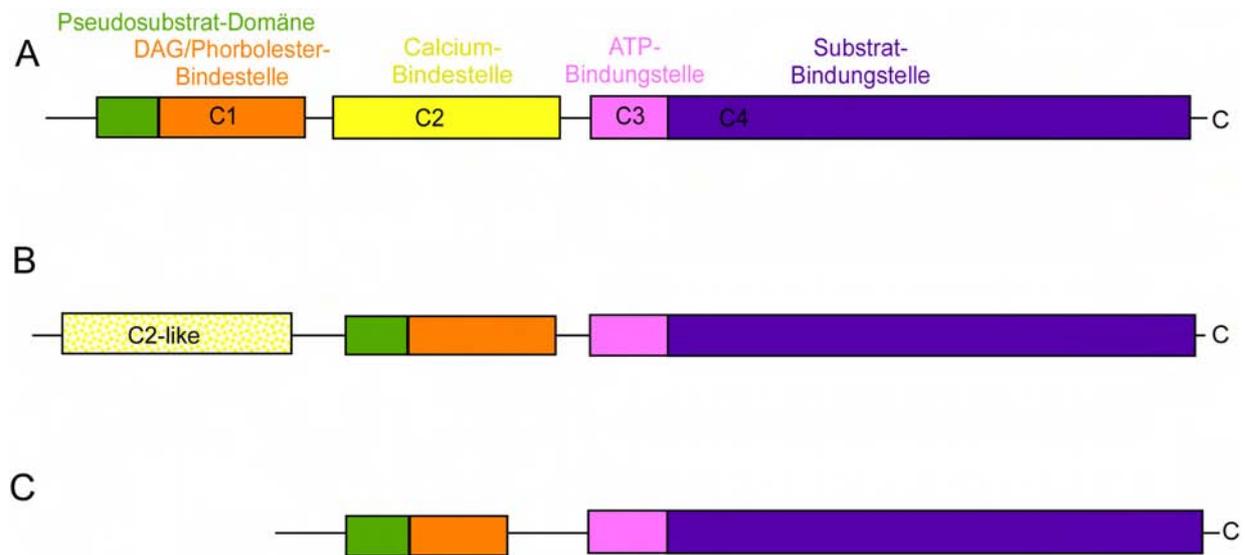


Abbildung 7: Protein Kinase C Familie (Newton, 1995)

Klassische PKC (α , β I, β II, γ) (A), novel PKC (δ , ϵ , η , θ , μ) (B), atypische PKC (ξ , λ) (C). Die novel PKCs binden DAG, aber kein Calcium mehr, die atypischen PKCs reagieren nicht auf Phorbolester und Calcium.

2.4 SPHINGOMYELINASEN

Sphingomyelinasen (SMasen) gehören zur Familie der Phosphodiesterasen und charakterisieren sich über die Spaltung von Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin (Abbildung 8). Ein weiterer Name für diese Enzyme ist Phospholipase C. Verschiedene Sphingomyelinasen, wie die basische SMase (Duan et al., 1995; Nyberg et al., 1996), die lysosomale saure SMase (Kanfer et al., 1966; Heller et al., 1966), die sekretierte Zink-abhängige saure SMase

(Spence et al., 1989), die membrangebundene Magnesium-abhängige neutrale SMase (Nilsson, 1969; Gatt, 1976; Rao et al., 1976) und die zytosolische Magnesium-unabhängige neutrale SMase (Okazaki et al., 1994) sind in unterschiedlichen Geweben beschrieben worden. Dabei werden den unterschiedlichen Enzymen verschiedene Signalwege zugeschrieben. Es wird angenommen, dass die regulierte Sphingomyelin-Hydrolyse, katalysiert durch Sphingomyelinasen und ausgelöst durch verschiedene Stress-Signale der Zelle, der Hauptweg der Produktion von Ceramiden und Ceramidderivaten ist. Sphingolipide formen spezialisierte Strukturen, vermitteln Zell-Zell-Interaktionen, modulieren zelluläre Proteine und Rezeptoren und nehmen an der Signaltransduktion teil. Hierbei ist besonders der Botenstoff („second messenger“) Ceramid interessant.

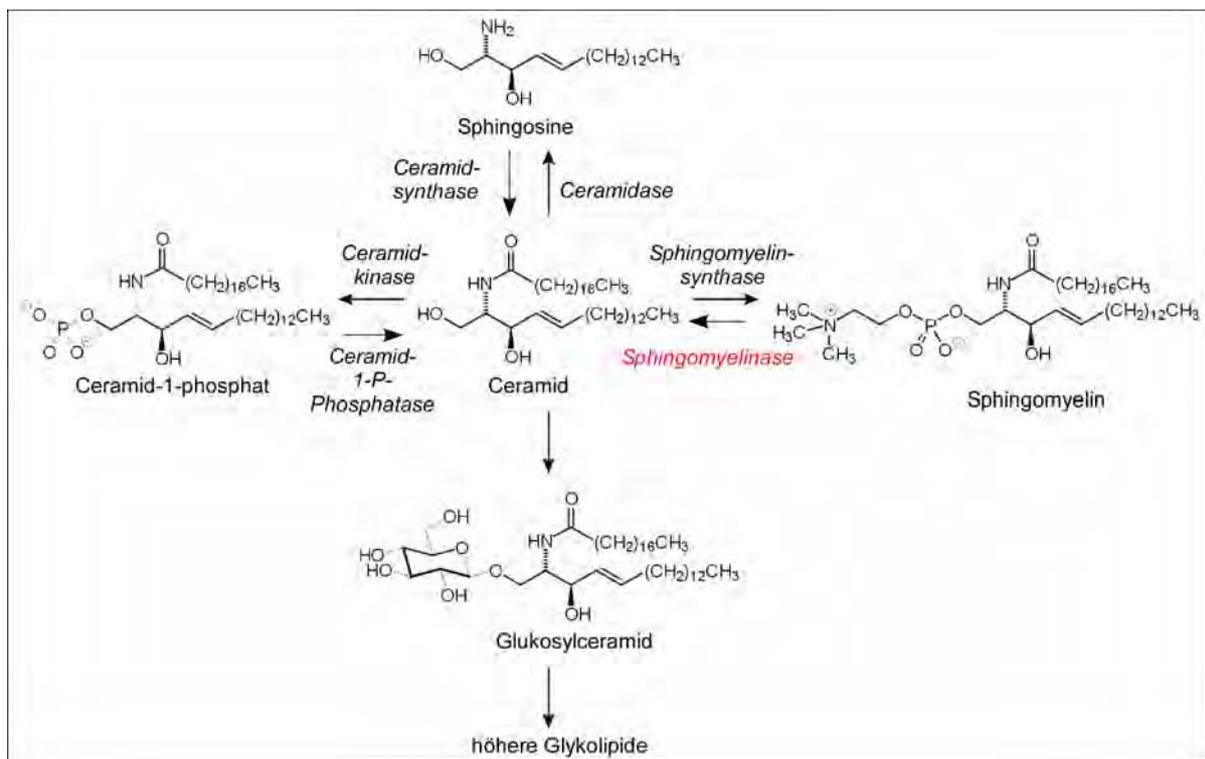


Abbildung 8: Der Ceramid-Stoffwechsel

Ceramid kann durch die Aktivität von Ceramidasen, Ceramidkinasen oder durch die Umwandlung zu Glukosylceramid aus dem System entfernt werden, neues Ceramid wird entweder durch de novo Synthese gebildet oder entsteht aus der Spaltung von Sphingomyelin durch Sphingomyelinase oder durch die Synthese aus Sphingosin durch Ceramidsynthasen.

2.4.1 Neutrale Sphingomyelinase

Die neutrale Sphingomyelinase ist eines der Hauptenzyme für die Generierung von Ceramid und damit ein Überträger von verschiedenen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Zellzyklusarrest und Apoptose (Marchesini et al., 2003). Dabei liegt das pH-Optimum des Enzyms, wie schon der Name beschreibt, im Neutralen und ist von Magnesiumionen abhängig. Aktiviert wird das Enzym durch ungesättigte Fettsäuren und Phosphatidylserin. Weiterhin ist die neutrale Sphingomyelinase der Säugetiere ein integrales Membranprotein, dessen Hauptaktivität im Hirngewebe zu finden ist.

2.4.1.1 Neutrale Sphingomyelinase 1

Die neutrale Sphingomyelinase 1 war die erste klonierte neutrale SMase (Tomiuk et al., 1998; Tomiuk et al., 2000). Ein anderer Name dieses Enzyms ist Sphingomyelin Phosphodiesterase 2. Da die biochemische Reinigung der neutralen SMase sich als schwierig gestaltete, benutzte die Gruppe um Stoffel ein generalisiertes Profil basierend auf einem Sequenzvergleich verschiedener bakterieller SMasen mit einem neutralen pH-Optimum und Magnesium-Abhängigkeit (Tomiuk et al., 1998; Tomiuk et al., 2000).

Allerdings konnte die Gruppe keine biologischen Effekte durch die Überexpression der neutralen SMase1 zeigen, wie sie nach Studien mit bakteriellen nSMase oder membrandurchlässigem Ceramid zu erwarten gewesen wären. Zusätzlich zeigte die nSMase1 eine ubiquitäre Expression der mRNA in allen Organen. Weiterhin konnte in der Immunfluoreszenz und bei der Analyse subzellulärer Fraktionen eine Lokalisation in der Membran des endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden. KO Mäuse der nSMase 1 zeigen keine erhöhten Sphingomyelinspiegel in ihren Zellen (Zumbansen et al., 2002) Die Gruppe um Hannun konnte 1999 nachweisen, dass die nSMase1 eine Lysophospholipase-C-Aktivität aufweist und damit als eine Lyso-Platelet-Aktivating-Factor-Phospholipase-C (lyso-PAF-PLC) anzusehen ist, physiologisch aber nicht als nSMase wirksam ist (Sawai et al., 1999).

2.4.1.2 Neutrale Sphingomyelinase 2

Die neutrale SMase 2, auch Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 genannt, wurde ebenfalls von der Stoffel Gruppe (Hofmann et al., 2000) beschrieben. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die nSMase 1 nicht die *bona fide* nSMase war, wurde in einer verbesserten Datenbanksuche und Phylogenieanalyse eine nSMase gefunden, die eine andere Domänenstruktur und nur wenig Ähnlichkeiten zu anderen SMasen aufwies (Hofmann et al., 2000).

Die Gruppe um Hannun (Marchesini et al., 2003) führte 2002 weitere Untersuchungen an überexprimierter nSMase2 in einem Hefestamm aus, der defizient für Inositol-Phosphosphingolipid-Phospholipase C (Isc1p) ist. Isc1p KO Hefen zeigen keine SMase-Aktivität mehr, nach Überexpression von neutraler SMase 2 in diesem Hefestamm konnte bei neutralem pH-Wert ein Teil der Sphingomyelinaseaktivität wieder hergestellt werden (Okamoto et al., 2003). NSMase2 KO Mäuse zeigen einen unerwarteten pleiotropen Phänotyp mit einer starken Verzögerung im späten embryonischen und postnatalen Wachstum und einer verkleinerten Hypophyse (Stoffel et al., 2005). Weiterhin haben die Mäuse einen wesentlich niedrigeren Insulin-Growth-Faktor1 (IGF1) Spiegel, der ihren Zwergenwuchs erklären kann (Stoffel et al., 2005).

Doppel KO Mutanten, die defizient für nSMase 1 und nSmase 2 sind, weisen keinerlei neutrale Sphingomyelinase Aktivität mehr auf, sie zeigen allerdings keine Sphingomyelin-Speicher-Krankheit und auch keine vermehrte Apoptose während der gesamten Lebensdauer von zwei Jahren (Stoffel et al., 2005).

2.4.2 Saure Sphingomyelinase

Die saure SMase war die erste klonierte (Ferlinz et al., 1991) und auf molekularer Basis beschriebene SMase (Kanfer et al., 1966). Sie wird auch als Sphingomyelin Phosphodiesterase 1 bezeichnet. Defekte im sauren SMase-Gen, die im Menschen die erbliche Niemann-Pick Krankheit Typ A und B verursachen, resultieren in einer massiven Anhäufung von

Sphingomyelin in den Lysosomen und Tod in der frühen Kindheit (Brady et al., 1966). Mäuse, die ein mutiertes saures-SMase-Gen tragen, zeigen einen ähnlichen Phänotyp. Dabei wurde anfangs davon ausgegangen, dass dieses ubiquitär vorkommende Enzym nur Funktionen bei der metabolischen Degradation von Sphingomyelin übernimmt. Die Gruppe um Krönke konnte zeigen, dass TNF den NF- κ B Weg über die Generierung von Ceramid durch saure SMase aktiviert (Schütze et al., 1992). Der Einfluss der sauren SMase bei der Apoptose ist noch nicht genau geklärt, in vivo Daten von der Gruppe um Kirschnek zeigten, dass Ceramid beim „Selbstmord“ von CD95 und CD95L positiven Lymphozyten eine Rolle spielt (Kirschnek et al., 2000). Dies steht allerdings im Widerspruch zu der Aussage, dass hohe Dosen kreuzvernetzter Antikörper gegen CD95 keinen Zelltod in saure SMase-defizienten Zellen auslösen konnten (Lin et al., 2000).

2.5 HEFE „TWO-HYBRID“ SYSTEM

Das von Fields und Song (Fields et al., 1989) entwickelte Hefe „Two-Hybrid“ System weist Protein-Protein-Wechselwirkungen in intakten Zellen nach und basiert auf der biologischen Wirkung bestimmter eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Dadurch bietet es die Möglichkeit, viele bislang unbekannte Protein-Protein-Wechselwirkungen mit relativ geringem Aufwand „in vivo“ zu identifizieren und nicht nur „in vitro“ wie es bei vielen anderen biochemischen Methoden der Fall ist.

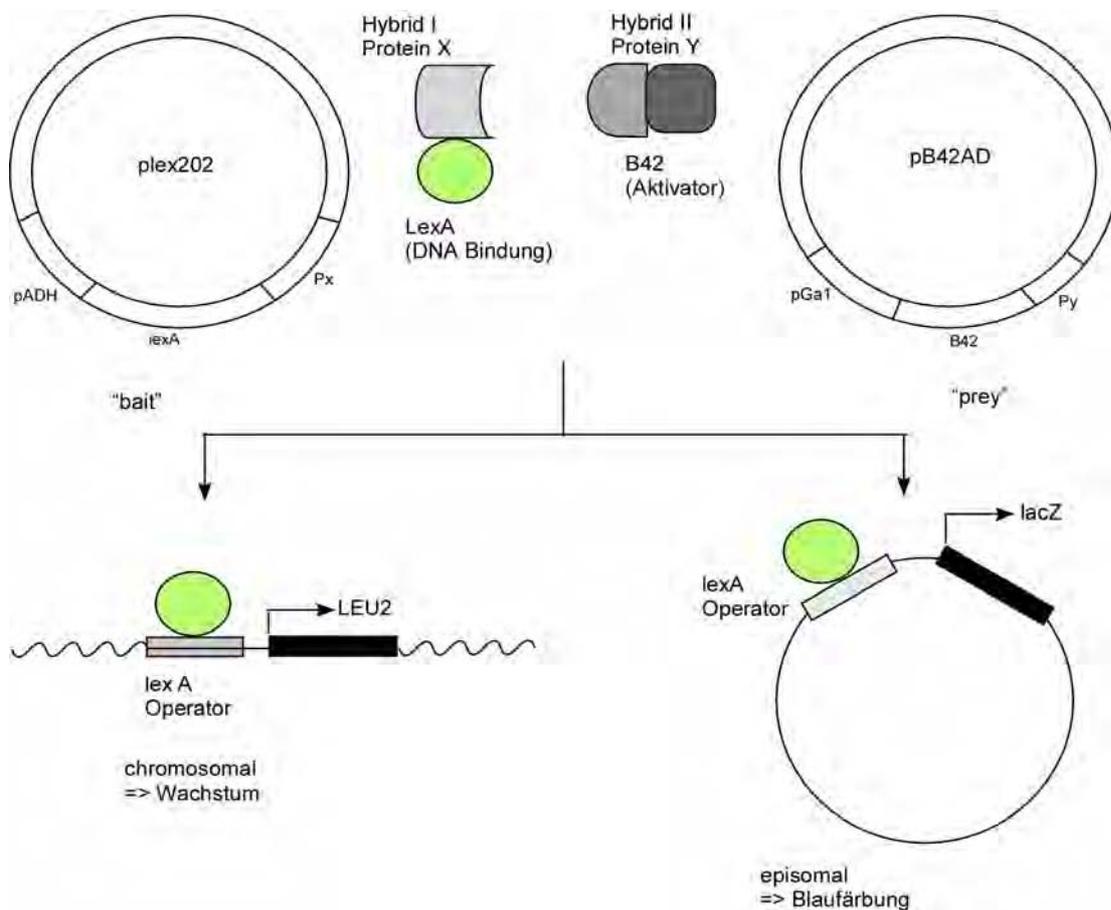


Abbildung 9: Funktionsweise des LexA Systems (aus: Lottspeich et al., 1998)

Erklärung siehe 2.5.1

Generell wird ein Transkriptionsfaktor dadurch in der Nähe eines Promotors positioniert, dass eine DNA-bindende Domäne mit einer spezifischen Upstream-Aktivatorsequenz der DNA interagiert. Der nun auf der DNA

„fixierte“ Transkriptionsfaktor nimmt mit Hilfe einer zweiten Domäne, der Aktivierungsdomäne, Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat auf und löst die Transkription aus.

Beim Two-Hybrid System wird ausgenutzt, dass die DNA-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne auch auf zwei verschiedenen Proteinen exprimiert werden können, die nicht gekoppelt sind. Zusätzlich muss noch ein weiteres Reportergen in den Zellen vorhanden sein: die Promotorregion muss die DNA-Sequenz enthalten, an die die DNA-Bindungsdomäne binden kann und die aktivierbare Transkription muss messbar sein.

Die getrennte Expression der Funktionsmodule wird keine Transkription des Reportergens auslösen, da die DNA-Bindedomäne kein Aktivierungspotential besitzt und die Aktivierungsdomäne nicht in der Nähe des Reportergens gebunden wird.

Wenn nun aber die DNA-Bindedomäne mit einem Protein X (Beuteprotein) und die Aktivierungsdomäne mit einem Protein Y (Köderprotein) fusioniert werden und die Proteine X und Y miteinander interagieren, wird die Transkription ausgelöst. Ursache dafür ist die räumliche Nähe der Aktivierungsdomäne zum Reportergen. Die Wirkung des Transkriptionsfaktors ist also direkt von der Interaktion der Proteine X und Y abhängig.

Prinzipiell lassen sich viele verschiedene Proteine mit dem „Two-Hybrid“ System untersuchen, in der Praxis gibt es jedoch Einschränkungen, wenn die Interaktion der Proteine X und Y z.B. von Glykosylierung oder Phosphorylierung abhängig ist.

2.5.1 Die Elemente des LexA Systems

Fields und Song hatten die Funktionsmodule aus dem GAL4-Protein verwendet, in diesem System wurde die Transkription stärker aktiviert und dementsprechend waren die Hintergrundsignale höher im Vergleich zum LexA System.

Im Hefe „Two-Hybrid“ System nach Brent (Brent et al., 1985) enthält die DNA-Bindedomäne das DNA-bindene Segment aus dem bakteriellen LexA Protein, das korrespondierende Reportergen die LexA-Erkennungssequenz

in seiner Promotorregion. Die Promotorregion ist so verändert, dass sie keine eigenen Aktivierungssequenzen mehr enthält, der Promotor reagiert also nicht mehr auf physiologische Stimuli, wie z.B. Galaktose. Das Reporter-gen wird nur abgelesen, wenn aktivierende Proteine an den LexA-Operator rekrutiert werden. Als Reporter-gen dient im LexA-System (wie auch im GAL4-System) das *lacZ* Gen aus *E.coli*, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. β -Galaktosidase katalysiert die Umsetzung vom farblosen X-Gal zum blauen Farbstoff Brom-4-chlorindigo. Durch die Blaufärbung sind Hefezellen, in denen das Reporter-gen aktiviert wurde, leicht zu erkennen (Abbildung 10). Weiterhin wurde in das Genom des Hefestamms ein zweites Reporterkonstrukt integriert, derselbe LexA-Operator wurde vor das *LEU2*-Gen kloniert. Dies bietet den Vorteil, dass Hefezellen nur wachsen, wenn durch Interaktion der Fusionsproteine die Leucinbiosynthese hochreguliert wird. Die Hefen mit aktiviertem Reporter-gen proliferieren also auf Medien, die Leucin-defizient sind.

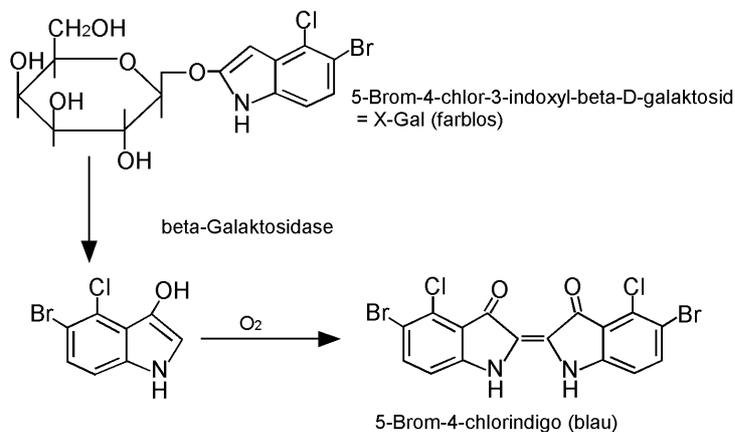


Abbildung 10: Spaltung von farblosem X-Gal zum blauen 5-Brom-4-chlorindigo

2.5.1.1 Köderprotein im Vektor plex 202

Das Kernelement des Vektors plex 202 (Abbildung 11) ist eine Transkriptionseinheit, die vom ständig aktiven Alkoholdehydrogenase-Promoter gesteuert wird. Die von diesem Promotor exprimierte mRNA kodiert für ein Fusionsprotein, das aminoterminal die DNA-bindende

Domäne des LexA-Proteins enthält. Das Köderprotein wird carboxyterminal fusioniert. Abgeschlossen wird die Transkriptionseinheit mit einer hefespezifischen Terminatorsequenz.

Zusätzlich besitzt der Vektor die Elemente 2 μ ori (einen hefespezifischen Replikationsursprung), das HIS3-Gen (für die Selektion auf transformierte Zellen), das für die Histidin-Biosynthese gebraucht wird, Amp^r (das β -Lactamase-Gen) und einen Replikationsursprung für die Amplifikation des Plasmids in *E.coli*.

2.5.1.2 Beuteprotein im Vektor 4-5 stuffer bzw. Vektor pB42AD

Der Beutevektor (4-5 stuffer (Abbildung 12) oder pB42AD (Abbildung 16)) besteht aus einer Transkriptionseinheit, die aus mehreren Elementen zusammengesetzt ist. Der GAL1-Promotor ist ein durch Galaktose aktivierbarer Promotor. Der Terminator der Transkriptionseinheit ist, wie auch beim Vektor plex 202 die Sequenz aus dem Alkoholdehydrogenase-Gen. Das hiervon kodierte Fusionprotein setzt sich aus folgenden Teilen zusammen: N-Terminal enthält es ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) für den Transport des Proteins in den Zellkern, daran schließt sich die Aktivierungsdomäne an. C-Terminal wird die „Beute“sequenz, bzw. die Genbibliothek inseriert. Des Weiteren besitzt der Vektor, ähnlich wie der Vektor plex 202, die Elemente 2 μ ori, das TRP1 -Gen (für die Selektion auf transformierte Zellen), das für die Tryptophan-Biosynthese gebraucht wird, Amp^r (das β -Lactamase-Gen) und einen Replikationsursprung für die Amplifikation des Plasmids in *E.coli*.

2.5.2 Durchführung des „Two-Hybrid“ Screenings

Für das Screening einer Genbibliothek oder zur Kontrolle von Interaktionen verschiedener Proteine müssen Köderplasmid, Beuteplasmid und das Reporterplasmid in einen Hefestamm transformiert werden, in dessen Kerngenom bereits ein Reporterkonstrukt für Wachstum nach Protein-Protein-Interaktion integriert ist. Der Hefestamm JK 103 erfüllt diese Voraussetzungen, hier wird das URA-Gen als Marker für das lacZ-

Reporteragen verwendet. Das Köderplasmid und das Beuteplasmid werden nacheinander in den Hefestamm transformiert. Für die Transformation mit dem Köderplasmid bzw. wenn das Beuteplasmid das Gen eines bekannten Proteins enthält, ist eine moderate Transfektionseffizienz ausreichend. Wenn jedoch eine Genbibliothek transformiert werden soll, muss auf eine hohe Transformationseffizienz geachtet werden, damit auch seltene cDNAs repräsentiert werden.

Wenn beide Konstrukte in die Hefe transformiert sind, erfolgt das eigentliche Screening. Da das Aktivatorprotein durch die Anwesenheit von Galaktose im Medium induzierbar ist, müssen die Hefen auf galaktosehaltiges Medium umgesetzt werden. Wenn die exprimierten Hybridproteine interagieren, wachsen die Zellen auf leucinfreiem Medium. Gleichzeitig ist in diesem Medium X-Gal enthalten, das sich bei Galaktosidaseaktivität blau verfärbt. Da nur Galaktose das Aktivatorprotein, und damit eine Interaktion induziert, dürfen transfizierte Hefen, die Glucose als Kohlenstoffquelle angeboten bekommen, nicht blau werden. Aus Klonen, die sich als positiv herausgestellt haben, kann die DNA isoliert werden. Zur Selektion auf das Beuteplasmid wird die DNA zunächst in *E.coli* KC8 transformiert. Dieser Stamm ist auxotroph für Tryptophan, die Bakterien wachsen also nur auf M9-Minimal-Medium ohne Tryptophan, wenn sie das Beuteplasmid enthalten. Das enthaltende Beuteplasmid kann aus *E.coli* KC8 verhältnismäßig einfach in hoher Reinheit isoliert und anschließend sequenziert werden und das enthaltene Genfragment über Datenbankenvergleich identifiziert werden.

2.6 FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit sollten die Rollen der WD-Repeat Proteine FAN und RACK1 bei der TNF-vermittelten Signalweiterleitung untersucht werden.

Dabei ging es besonders um die Rolle, die TNF bei der Aktivierung der PKC- β -II in murinen Zellen hat. Falls sich herausstellte, dass TNF einen Einfluss auf die Aktivierung der PKC hat, sollte untersucht werden, ob diese Aktivierung vom Protein FAN abhängig ist. Für diese Fragestellung stehen in der Arbeitsgruppe murine embryonale Fibroblasten eines FAN defizienten Mäusestammes zur Verfügung.

Weiterhin sollte die Interaktion von FAN und RACK1 genauer charakterisiert werden. Für die Untersuchung dieser Interaktionen stehen von der Arbeitsgruppe Tong FAN Deletionsmutanten zur Verfügung.

Zusätzlich sollten RACK1 Deletionsmutanten generiert werden und im Hefe „Two-Hybrid“ System mit verschiedenen in der Arbeitsgruppe vorhandenen FAN und RACK1 Mutanten auf Interaktionen untersucht werden.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass FAN einen Einfluss auf die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase hat. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob FAN direkt mit der neutralen Sphingomyelinase 2 interagiert. Falls FAN und die nSMase 2 nicht direkt miteinander interagieren, sollte im Hefe „Two-Hybrid“ System nach möglichen Interaktionspartnern der nSMase 2 gesucht werden und überprüft werden, ob diese auch mit FAN interagieren.

3 Material und Methoden

3.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

Agfa, Gera	Curix 60 Entwicklermaschine
Assistant, Sondheim	Mikroskopische Deckgläser (18 mm Ø)
Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK	Hyperfilm™ ECL-Chemoluminiszenz- film
BD Biosciences, Heidelberg	100 mm Zellkulturschalen (Falcon), FACS Calibur Analyser
Biometra, Göttingen	ThermocyclerTrioThermoblock, Standard Power Pack P25
Bio-Rad, München	Mini-PROTEAN II Gelelektrophoresekammer
Eppendorf, Hamburg	Tischzentrifuge.(5415R), Kühlzentrifuge.(4517R), Thermomixer 5436
Forma Scientific, Marietta, USA	Zellkulturbrutschrank
Greiner, Kehlheim	Spitzbodenröhrchen (15 ml und 50 ml)
IKA-Labortechnik, Staufen	Schütteltisch HS 260 Basic
INTAS Imaging Instruments, Göttingen	Geldokumentation: Intas GDS
Invitrogen, Karlsruhe	HORIZON 58, HORIZON 11•14 Agarosegel-Elektrophoresekammern
Heraeus, Osterode	LaminAir HB 2448K, Megafuge 1.0, Minifuge RF
Nunc, Wiesbaden	Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten mit sechs, zwölf und sechsendneunzig Kavitäten

Sartorius, Göttingen

Sarstedt, Nümbrecht

Schleicher & Schüll, Dassel

Tecan Deutschland,

Crailsheim

Techlab, Erkerode

Zeiss, Oberkochen

Analysenwaage

Einmalküvetten zur Protein-
bestimmung

Gel Blotting Papier GB002

Sunrise Mikrotiterplatten-Photometer

Hamilton Microliter™ Spritze

Fluoreszenzmikroskop: Axioskop

Laserscanning Mikroskop: LSM 510

3.2 CHEMIKALIEN, ENZYME UND REAGENZIEN

Alle Grundchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in analytischer Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Life Science, Braunschweig	ECL-Detektions-Kit, Gamma Bind™ G-Sepharose™
AppliChem GmbH, Darmstadt	Click - RPMI - Zellkulturmedium
BD Biosciences, Heidelberg	Bakto-Agar, Bakto-Trypton, Bakto-Hefe-Extrakt, Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino- acid (291940)
Biochrom, Berlin	Lösung zum Fixieren von Zellen: Cell Fix™ (340 181) fötale Kälberserum (FCS), Trypsin/EDTA, Glutamin, PBS
Biomol, Hamburg	Desoxynucleotide Set für die PCR
Bio-Rad, München	TEMED, Nitrozellulosemembran 0,45 µM, Proteinstandard: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (161-0374)
Invitrogen, Karlsruhe	DNA-Polymerase, T4 DNA Ligase, 100 bp DNA-Längenstandard, Proteinstandard: Bench Mark™ Prestained Protein Ladder (10748-010), Lipofectamine™ 2000,

	OptiMEM Medium
	Eindecklungsmedium Slow Fade Light Antifade Kit
Macherey & Nagel, Düren	Nucleo Bond PC500 (740 574)
	Nucleo Spin Plasmid (740 588)
	Nucleo Spin Extract (740 590)
MBI Fermentas, St.Leon-Rot	Restriktionsenzyme
Miltenyi, Bergisch Gladbach	NK Cell Isolation Kit (130-090-864)
New England Biolabs, Frankfurt	Restriktionsenzyme
PEQLAB Biotechnologie, Erlangen	peqGOLD Universal Agarose
Pierce Biotechnology, München	BCA Proteinbestimmungs-Reagenz mit BSA-Standard
Qbiogene, Heidelberg	Bakterienmedium: Circle Grow®
Qiagen, Hilden	Dye Ex™ 2.0 Spin Columns
Roche Applied Science, Mannheim	Complete Protease Inhibitor (11 873 580 001)
Serva, Heidelberg	Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1 40%)
TIB MolBiol, Berlin	Sequenzierprimer, PCR-Primer,
Zytomed, Berlin	Stift zum Markieren von Objektträgern: Mini PAP Pen (00-8877)

3.3 **ANTIKÖRPER**

BD Biosciences / Pharmingen, Heidelberg	α -RACK1 (610 178) NK1.1 IgG2a PE gekoppelt (553 165)	
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	α -Aktin (C-11) α -lex A (N-19) α -FAN (N-19) α -PKC- α (C-20) α -PKC- β -I (C-16) α - PKC- β -II (C-18) α -pan PKC (A-3) Esel- α -Ziege-Rhodamine	sc-1615 sc-1725 sc-6336 sc-208 sc-209 sc-210 sc-17769 sc-2094
Dianova, Hamburg	α -Maus IgM (315-005-020) Ziege- α -Maus IgG-POD (115-035-146) Ziege- α -Maus IgM-POD (115-035-075) Ziege- α -Kaninchen-POD (111-035-144) Maus- α -Ziege-POD (205-035-108) Ziege- α -Kaninchen-FITC (111-096-046) Esel- α -Kaninchen-TRITC (711-025-152) Esel- α -Maus IgG-TRITC (715-025-150) Esel- α -Ziege IgG-FITC (705-095-003) Ziege- α -Maus IgM-FITC (115-095-075) Ziege- α -Maus IgM-TRITC (115-025-075)	
Biomol, Hamburg	α -Phosphotyrosin (4G10)	
Sigma-Aldrich, München	α -FLAG (M5) F-4042	

3.4 VEKTOREN

3.4.1 plex 202

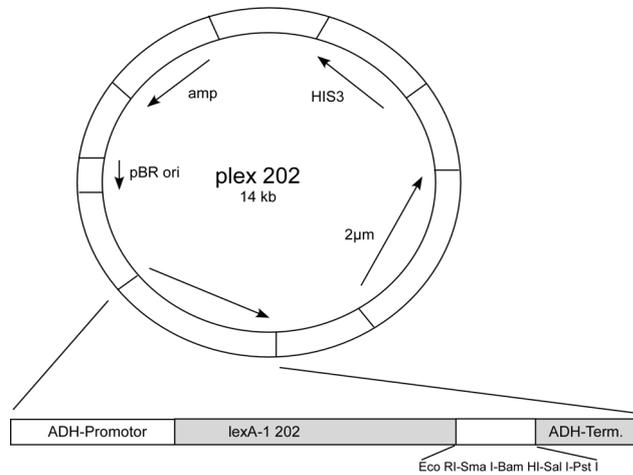


Abbildung 11: plex 202: Köder Vektor im Hefe „Two-Hybrid“ System

Der Hefevektor plex 202 (Abbildung 11) diente als Köder-Konstrukt im Hefe „Two-Hybrid“ System. Er war im Labor der Arbeitsgruppe D. Adam vorhanden (Adam-Klages et al., 1996). Der Vektor hat eine Größe von 14 kb.

3.4.2 4-5 stuffer

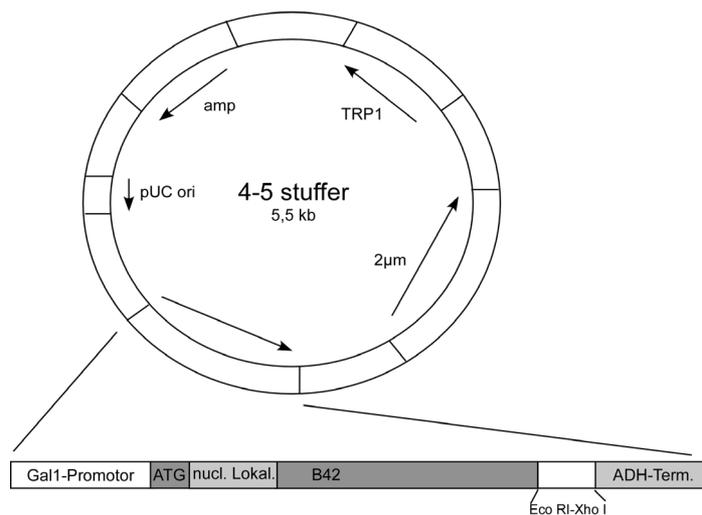


Abbildung 12: 4-5 stuffer: Beute Vektor im Hefe „Two-Hybrid“ System

Als Beute-Konstrukt im Hefe „Two-Hybrid“ System diente der Hefevektor 4-5 stuffer (Abbildung 12). Er war im Labor der Arbeitsgruppe D. Adam

vorhanden (Adam-Klages et al., 1996). Der Vektor hat eine Größe von 5,5 kb.

3.4.3 pPKC β -EGFP

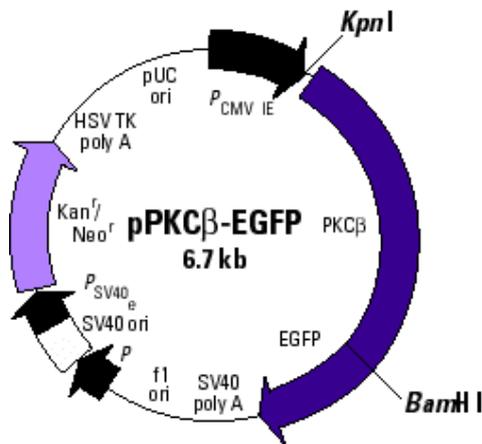


Abbildung 13: pPKC β -EGFP (Quelle: www.bdbeurope.com)

Der Vektor pPKC β -EGFP (Abbildung 13) diente zur Überexpression eines EGFP-Fusionsproteins für Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation der PKC- β -II in der Immunfluoreszenz. Er wurde von der Firma BD bezogen. Der Vektor hat eine Größe von 6,7 kb.

3.4.4 pcDNA3.1/*myc*-His A

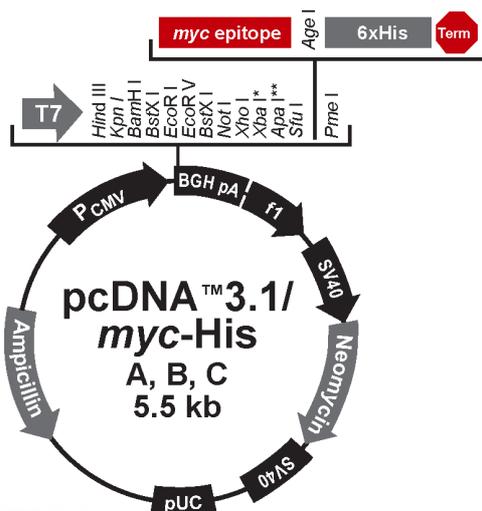


Abbildung 14: pcDNA 3.1/*myc*-His (Quelle: www.invitrogen.com)

Der Expressionsvektor pcDNA3.1/*myc*-His (Abbildung 14) wurde von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Er hat eine Größe von 5,5 kb.

3.4.5 pCR-Blunt II TOPO

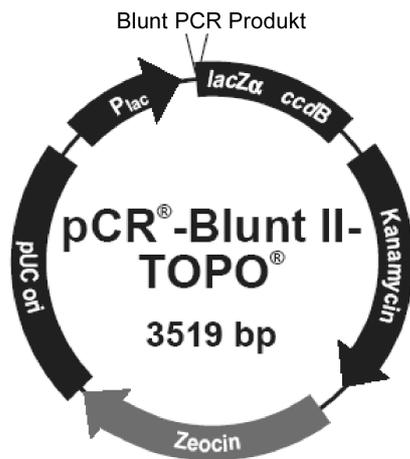


Abbildung 15: pCR-Blunt II TOPO Vektor (Quelle: www.invitrogen.com, modifiziert)

Der Vektor pCR Blunt II TOPO (Abbildung 15) erleichterte das Klonieren von blunt-end PCR Produkten. Er wurde von der Firma Invitrogen bezogen und hat eine Größe von 3,5 kb.

3.4.6 pB42AD

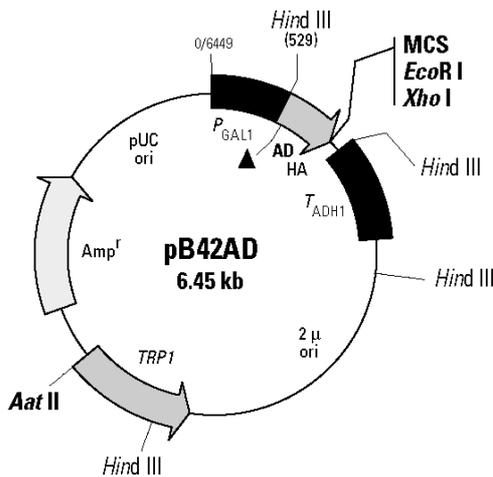


Abbildung 16: pB42AD: Beutevektor im Hefe „Two-Hybrid“ System (Quelle: www.bdeurope.com)

Der Hefevektor pB42AD (Abbildung 16) diente als Beute-Konstrukt im Hefe „Two-Hybrid“ System. Der Vektor hatte eine HeLa Gen-Bibliothek in der MCS integriert. Er wurde von der Firma BD bezogen und hat eine Größe von 6,45 kb.

3.5 DNA TECHNIKEN

3.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Herstellung verschiedener Konstrukte wurde die DNA mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten PCR-Primer sind im Ergebnisteil angegeben, (Tabelle 14, Tabelle 15, Tabelle 16). In Tabelle 3 sind die für die PCR Reaktion verwendeten Volumina angegeben.

Tabelle 3: PCR-Ansatz

Reagenz	Menge
DNA	500 ng
PCR-Puffer 10x	5 µl
Mg ₂ SO ₄ 50 mM	3 µl
dNTPs 2,5 mM von jedem	5 µl
Primer for (10 pmol/µl)	1 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	1 µl
Pfx	0,4 µl = 1 U
H ₂ O	ad 50 µl

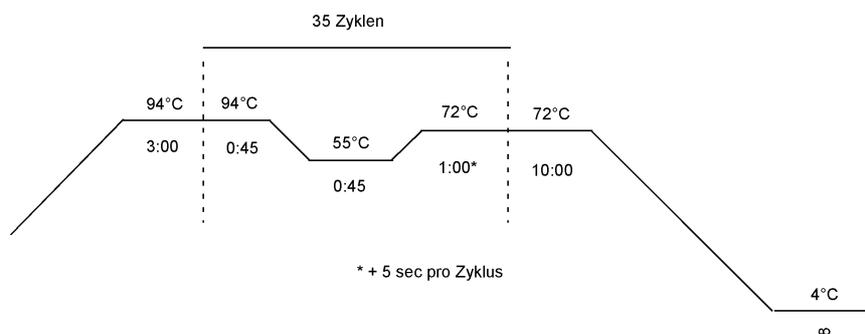


Abbildung 17: Temperatur-Programm der PCR

Das Temperaturprogramm der PCR lief wie in Abbildung 17 dargestellt ab. Bei 94°C wurde die DNA denaturiert, anschließend erfolgte bei 55°C das Annealing der Primer. Bei 72°C fand die Elongation statt, nach 35 Zyklen wurde auf 4°C gekühlt.

Die PCR Reaktion wurde über ein 1 % (w/v) Agarosegel in Banden aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mit Nucleo Plasmid Extract Kit gereinigt. Die Ligation erfolgte mit 4 µl des gereinigten PCR-Produkts in den pCR Blunt II TOPO-Vektor (Abbildung 15) nach Protokoll des Herstellers. Anschließend wurden 3 µl der Ligation in chemisch kompetente *E.coli* TOP 10 transformiert, auf LB-Platten mit Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die entstandenen Klone wurden in LB-Flüssigmedium vermehrt und die Plasmide isoliert (3.5.2.2). Aus den pCR Blunt II TOPO-Plasmiden wurde das PCR-Produkt mittels Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen geschnitten (2 h, 37°C) und über Nacht bei 4°C in den Vektor plex 202 ligiert (Tabelle 4).

Die Ligationen wurden in chemisch kompetente Zellen transformiert (3.6.1), die entstandenen Klone in LB-Flüssigmedium vermehrt und die Plasmide isoliert. Die Integrität der Sequenz des PCR Produkts wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Tabelle 4: Ligationsansatz

Reagenz	Menge
Vektor	2 µl
Insert	5 µl
T4 Ligase	1 µl
Puffer 10x	2 µl

3.5.2 Plasmidpräparation

3.5.2.1 Plasmidpräparation aus E.coli mittels „Boiling Mini-Prep“ (Del Sal et al., 1988)

1 ml einer Übernachtskultur von E.coli in Circle Grow-Medium wurde abzentrifugiert (600 g, 5 min), der Überstand verworfen und das Präzipitat in 200 µl STET (8 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) und 4 µl Lysozymlösung (50 mg/ml) resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei RT stengelassen, dann 45 s aufgekocht und abzentrifugiert (15000 g, 5 min, RT). Der entstandene Niederschlag wurde mit einem Zahnstocher entnommen und die Lösung mit 8 µl CTAB Lösung (5 % (w/v)) versetzt. Das entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert (5 min, 15000 g, RT) und anschließend in 300 µl NaCl-Lösung (1,2 M) resuspendiert. Die Lösung wurde mit 750 µl Ethanol (96 % (v/v)) versetzt und der Niederschlag abzentrifugiert (15000 g, 10 min, 4°C). Das Präzipitat wurde in Ethanol gelöst (70 % (v/v)), erneut abzentrifugiert (15000 g, 5 min, 4°C), luftgetrocknet und über Nacht in 39 µl Milli Q und 1 µl einer RNase A Lösung (10 mg/ml) gelöst.

3.5.2.2 Plasmidpräparation mittels Macherey und Nagel Kits

Zur Gewinnung der DNA wurde den Anweisungen des Herstellers Macherey und Nagel für die Kits Nucleo Bond PC 500 und Nucleo Spin Plasmid gefolgt.

3.5.2.3 Aufbereitung der DNA aus der „Boiling Mini Prep“ für Sequenzierung

Um die aus der „boiling-mini-prep“ gewonnene DNA weiter für eine nachfolgende Sequenzierung aufzureinigen, wurden 20 µl dieser DNA Lösung direkt auf die Säule (Nucleo Spin Plasmid Column) gegeben. Anschließend wurde zentrifugiert (11000 g, 1 min, RT), mit Waschpuffer gewaschen (11000 g, 1 min, RT) und anschließend die Säule getrocknet (11000 g, 2 min, RT). Zum Eluieren der DNA wurden 40 µl Eluationpuffer

auf die Säule gegeben, 5 min stehen gelassen und 1 min bei 11000 g zentrifugiert.

3.5.3 Sequenzierung der Plasmid DNA

Für die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA mittels Macherey und Nagel Kits nach Protokoll gereinigt.

Zum Ansatz der Sequenzierung mit dem ABI PRISM Big Dye® Terminator v.1.1 wurde folgendes Protokoll (Tabelle 5) verwendet:

Tabelle 5: Ansatz Sequenzierung

Reagenz	Menge
Plasmid	500 ng
Sequenzierpuffer 5 x	2 µl
Big Dye® Terminator	1 µl
Primer 20µM	0,5 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Es wurde das folgende Temperaturprogramm (Abbildung 18) benutzt.

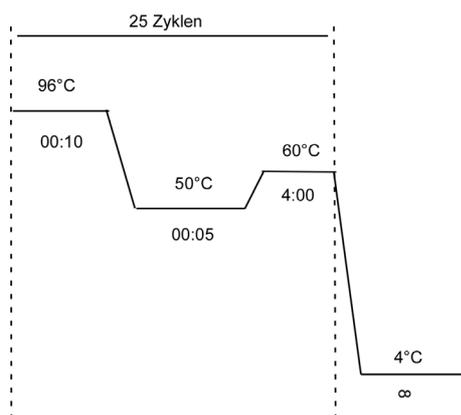


Abbildung 18: Temperaturprogramm für die Sequenzierung

Nach der PCR wurden die Proben mit dem Qiagen Kit gereinigt und im ABI Prism® 310 analysiert.

3.5.4 Sequenzierprimer

Für die Sequenzierungen wurden die folgenden Primer verwendet.

Tabelle 6: Sequenzierprimer der neutralen Sphingomyelinase 2

Primername	Sequenz
snSMase2-1	ATG GTT TTG TAC ACG ACC CC
snSMase2-r	TAG GTG GTG GGT ATG AA
snSMase2m2	GGC TAG AAG ACA AGA ACC CA
snSmase2-3	GGA GCA TTA AGA GGA CAG CC
snSmase2-4	GGG AGC CTG GGC AGC CCC TC
snSmase2-5	CGG CTA CTT CGA GTA CAT CC
snSmase2-6	GGA CTG GCT GGC TGA TTT CC
snSmase2-7	CCC ACC AGC AAG AGC

Tabelle 7: Sequenzierprimer für FAN

Primername	Sequenz
FAN_Seq_1	GGG CAG ACA CCA AAA CAA CT
FAN_Seq_2	CAG TTA CAC GAG CAC TAT AA
FAN_Seq_3	GAC GAG ATG CCA GGC ACC AA
FAN_Seq_4	GGA ACA GAT GGC TGT CTT AA
FAN_Seq_r5	CTC TTC ACC TGG GGA ATC TG

Tabelle 8: Sequenzierprimer für den Vektor plex 202

Primername	Sequenz
lex202.forward	TTC GTC AGC AGA GCT TC

Tabelle 9: Sequenzierprimer für den Vektor pB42AD

Primername	Sequenz
seq_pB42AD	CCT GAC TGG CTG AAA TCG AAT GGT

Tabelle 10: Sequenzierprimer für RACK1

Primernamen	Sequenz
RACKseqfo1	CGT GGC ACC CTC AAG GGC CA
RACKseqre2	GTT TCC ACA TGA TGA TGG TC
RACKseqfo3	GGA ACC CTG CGC CTC TGG GA
RACKseqfo4	CGC CCA ACA GCA GCA ACC C
RACKseqfo5	GAA GGC AAA CAC CTT TAC AC

3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Separation von DNA-Fragmenten wurden horizontale TAE-Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde 1 %ig in 30 ml TAE-Puffer (40 mM Tris (pH 7,4), 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst und das Gel mit Taschen gegossen. Die zu untersuchende DNA wurde mit 10 x Auftragspuffer (50 % (v/v) Glycerin, 100 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und in die Taschen des mit TAE-Puffer bedeckten Gels pipettiert. Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch mit einer konstanten Spannung von 5 V/cm getrennt und nach einer Ethidiumbromidfärbung (4 µg/ml) unter UV-Licht (312 nm) detektiert und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

3.6 TRANSFORMATION PROKARYOTISCHER ZELLEN

3.6.1 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Die chemisch kompetenten *E.coli* XL 1-Blue und *E.coli* KC8 wurden nach einem modifizierten Protokoll von Hanahan (Inoue et al., 1990) hergestellt. Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA durch vorsichtiges Schütteln vermengt. Anschließend wurde 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen, anschließend wurden die Zellen wieder für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl SOC (2 % (w/v) Bakto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bakto-Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 2,5

mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7,0) wurden die Zellen 1h bei 37°C geschüttelt. Die transformierten *E.coli* XL-1 Blue wurden auf LB-Platten (1 % (w/v) Bakto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bakto-Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 1,6 % (w/v) Bakto-Agar, pH 7,0) mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum aufplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die transformierten *E.coli* KC8 wurden auf M9 Minimalplatten (1 % (w/v) M9 Salz, 2 % (w/v) Agar, 40 mM Glucose, 50 ml DO Stammlösung (Tabelle 11), 8,3 ml Histidinlösung, 8,3 ml Leucinlösung, 8,3 ml Uracillösung) (Tabelle 11) mit Ampicillin ausplattiert und 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.7 ARBEITEN MIT HEFE

3.7.1 Transfektion des Hefestammes JK103

Zur Transfektion des Hefestammes JK103 wurden diese im entsprechenden Selektionsmedium (U⁻ Glc⁺ bzw. UH⁻ Glc⁺) als Übernachtskultur bei 30°C geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Hefesuspension 1:20 mit Selektionsmedium verdünnt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen (OD₆₀₀), bis die Suspension eine Dichte von OD₆₀₀=0,6 erreicht hatte.

Die Hefen wurden zweimal mit 50 ml sterilem Wasser gewaschen (900 g, 5 min) und anschließend in 700 µl 1 x TE/Lithiumacetat (pH 7,5, 1 M) resuspendiert. Die zu transformierende DNA wurde mit einem 50-fachen Überschuss an Lachssperma-DNA versetzt. Anschließend wurden zu dieser DNA jeweils 100 µl der Hefesuspension gegeben und gut gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 300 µl einer frisch angesetzten 40 %igen PEG 4000 Lösung (40 % (w/v) PEG 4000, 1 x TE/Lithiumacetat 1M, (pH7,5)). Die entstandene Suspension wurde 30 min bei 30°C geschüttelt. Die Hefen wurden für 15 min bei 42°C hitzegeschockt und anschließend direkt auf die Selektionsplatten (UH⁻, Glc⁺ bzw. UHW⁻ Glc⁺) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 1-2 Tage.

3.7.1.1 Plasmidgewinnung aus Hefe

Die Hefen wurden in Selektionsmedium (U⁻ Glc⁺ bzw. UH⁻ Glc⁺) angeimpft und bei 30°C im Schüttler bis in die frühe stationäre Phase inkubiert. Im Mikroskop wurde auf bakterielle Kontamination überprüft. Für den Aufschluss wurden 5 ml der Zellsuspension abzentrifugiert (900 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde abdekantiert. Das Präzipitat wurde in 500 µl Waschpuffer (1 M Sorbitol, 0,1 M EDTA pH 8,0) gewaschen und in Eppendorf Gefäße überführt. Nach erneutem Zentrifugieren (800 g, 5 min, RT) wurde das Präzipitat in 500 µl SCE (1 M Sorbitol, 100 mM Natrium-Citrat pH 5,8, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 mM Mercaptoethanol) aufgenommen und mit 40 µl einer Lyticaselösung (5 U/µl in SCE) versetzt. Die Suspension wurde 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (800 g, 5 min, RT) wurde das Präzipitat mit 500 µl Lysispuffer (50 mM Tris pH 7,4, 20 mM EDTA pH 8,0, 1 % (w/v) SDS) versetzt und 30 min bei 65°C inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden durch dreimaliges Ausschütteln mit einem Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) aus der Lösung entfernt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 50 µl Natriumacetatlösung (3 M) und 400 µl Isopropanol (10 min, RT).

Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (15000 g, 5 min, RT), an der Luft getrocknet und in 30 µl Wasser über Nacht resuspendiert. Am nächsten Tag wurde RNA durch Zugabe von 3 µl RNase A (10 mg/ml) und Inkubation bei 37°C für 1 h entfernt.

3.7.2 Identifikation von Interaktionspartnern der neutralen Sphingomyelinase 2 im Hefe „Two-Hybrid“ System

Zur Identifikation von Interaktionspartnern der neutralen Sphingomyelinase 2 (NSM) wurde Hefe kotransformiert mit einem Konstrukt, das die vollständig kodierende Region der NSM im Vektor plex 202 (Abbildung 11) und einer HeLa-Genbibliothek im Vektor pB42AD (Abbildung 16) enthält.

Auf UHWL-Gal⁺X-Gal⁺ Platten (Tabelle 12) wurden die Hefen bei 37°C auf Blaufärbung durch Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff durch

Galaktosidaseaktivität getestet (2 Tage - 1 Woche). Positive Kolonien wurden zur Reinigung auf UHWL-Gal⁺X-Gal⁺ Platten ausgestrichen. Zum Ausschluss von Falsch-Positiven Klonen wurde auf UHWL-Gal⁺X-Glc⁺ (Tabelle 12) auf Blaufärbung getestet. Auf glucosehaltigen Platten durften sich die Hefen nicht blau verfärben. Von den positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA extrahiert. Die DNA wurde in *E.coli* KC8 transformiert, hiermit konnte eine Vorselektion über die M9 Minimalplatten auf das Beutekonstrukt erreicht werden. Von den *E.coli* KC8 positiven Klonen wurde wiederum die Plasmid-DNA isoliert und in *E.coli* XL-1 Blue transformiert. Aus den *E.coli* XL-1 Blue wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Sequenzierung analysiert.

Tabelle 11: Aminosäurezusammensetzung des DO für das Hefe „Two-Hybrid“ System

Aminosäure	Endkonz. (= 1x) in mg/l	Stammlösungskonz. (= 20x) in ml/l	Stammlösung in mg/100ml ^a
Adenin	40	800	
L-Arginin (HCl)	20	400	
L-Asparaginsäure	100	2000	
L-Glutaminsäure	100	2000	
L-Histidin			240
L-Leucin			720
L-Lysin (mono-HCl)	30	600	
L-Methionin	20	400	
L-Phenylalanin	50	1000	
L-Serin	375	7500	
L-Threonin	200	4000	
L-Tryptophan			480
L-Thyrosin	30	600	
L-Valin	150	3000	
Uracil			240

Tabelle 12: Zusammensetzung der Hefepplatten für das Hefe „Two-Hybrid“ System

	UH- Glc ⁺	UHW-Glc ⁺	UHWL-Glc ⁺ X-Gal ⁺	UHWL-Gal ⁺ X-Gal ⁺
YNB	0,67%	0,67%	0,67%	0,67%
Agar	2 %	2 %	2 %	2 %
NaOH	1 Pellet	1 Pellet	1 Pellet	1 Pellet
KH ₂ PO ₄	--	--	70 mM	70 mM
DO-Stammlösung (Tabelle 11)	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
X-Gal (2 % in DMF)			2 ml	2 ml
Glucose	0,1 M	0,1 M	0,1 M	--
Galaktose	--	--	--	0,1 M
Leucinstamm- lösung	8,3 ml	8,3 ml	--	--
Tryptophanstamm- lösung	8,3 ml	--	--	--
H ₂ O	ad 1 l	ad 1 l	ad 1 l	ad 1 l

3.7.3 Untersuchung von Proteinlysaten aus Hefe

Zum Nachweis von Proteinen in Hefe wurden die Hefen über Nacht bei 30°C unter Schütteln in YNB-Medium hochgezogen. Über die OD₆₀₀ wurde die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. 1 x 10⁷ Zellen wurden mit 30 µl 2x SDS-Probenpuffer in TNE versetzt, 15 min bei RT stengelassen und danach 5 min bei 100°C aufgekocht. Das Lysat wurde abzentrifugiert (15000 g, 4°C) und vom Überstand jeweils 25µl pro Tasche in ein SDS-Gel pipettiert (3.11).

3.8 ZELLINIEN UND ZELLKULTUR

Die humane Cervixkarzinomzelllinie HeLa und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 wurden ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC Rockville, USA) bezogen.

Die murinen embryonalen Fibroblastenzelllinien FAN KO und FAN WT wurden von Dirk Kreder hergestellt (Kreder et al., 1999) und waren im Haus vorhanden. Die murinen Fibroblastenzelllinien C57Bl/6 und beige 24 (MCHS) wurden freundlicherweise von Jerry Kaplan, Utah zur Verfügung gestellt (Ward et al., 2003). Die Fibroblastenzelllinien FAN KO und FAN WT wurden in Click-RPMI Medium gehalten, die murinen Fibroblasten C57Bl/6 und beige 24 in DMEM-Medium mit HEPES, die HEK 293 Zellen wurden in DMEM-Medium ohne HEPES und die HeLa Zellen in RPMI 1640-Medium gehalten. Den Medien wurden jeweils 10 % (v/v) FCS, 10 mM Glutamin, je 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin und den murinen Zelllinien 0,5 % (v/v) einer β -Mercaptoethanol-Lösung (0,07 % (v/v) in 0,9 % (w/v) NaCl) zugesetzt. Die Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen oder -schalen bei 37°C und 100 % relativer Luftfeuchte in einem mit 5 % (w/v) CO₂-begasten Brutschrank gehalten und alle drei Tage passagiert. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in FCS mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

3.9 TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN

3.9.1 Transiente Transfektion von HEK 293 mittels der Calcium-Phosphat-Methode

Für die transiente Transfektion wurden die Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale in 10 ml DMEM-Medium ohne HEPES in einer Dichte von $1,2 \times 10^6$ ausgesät und über Nacht adhären gelassen. Am nächsten Tag wurde 5 µg DNA mit 50 µl CaCl₂ Lösung (2,5 M) vermischt und mit sterilem Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Diese Mischung wurde unter leichtem Vortexen zu 2 x HBS (280 mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,17) gegeben und die Gesamtlösung auf den Zellen verteilt. Nach 2 h wurde die Anwesenheit von Calciumphosphatkristallen kontrolliert, nach 24h wurden die Zellen lysiert.

3.9.2 Transiente Transfektion der murinen Embryonal Fibroblasten mit Lipofectamine 2000

Für die Untersuchung der Translokation der PKC- β -II an die Membran wurden murine EF transient mit einem PKC- β -EGFP- und teilweise zusätzlich mit einem RACK1-myc-Konstrukt transfiziert. Für die Untersuchung der neutralen Sphingomyelinase2 in der Immunfluoreszenz bzw. der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidase-Aktivität wurden die EF mit einem NSM-myc Konstrukt transfiziert. Hierzu wurden autoklavierte Deckgläschen in die 12 Kavitäten von Zellkulturschalen gelegt und mit sterilem PBS gespült. Die Zellen wurden in 1 ml des entsprechenden Mediums in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Kavität ausgesät und über Nacht adhären gelassen. Für die Transfektion wurden pro Kavität 1,6 μ g DNA mit 100 μ l OptiMEM-Medium als Mastermix in einem 15 ml Falcongefäß vermischt. Außerdem wurden in einem zweiten Falcongefäß pro Ansatz 4,0 μ l Lipofectamine 2000 mit 100 μ l OPTIMEM-Medium vermischt. Beide Ansätze wurden 5 min bei RT stehengelassen und anschließend vermischt. 20 min nach dem Vermischen der verdünnten DNA und des verdünnten Lipofectamine 2000s wurde der Komplex auf die Zellen pipettiert. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel mit 1,8 ml des entsprechenden Zellkultur-Mediums.

3.10 STIMULATION VON ZELLEN

Die Stimulation von Zellen mit TNF oder PMA erfolgte bei adhären Zellen grundsätzlich in Zellkulturschalen. Hierzu wurde die benötigte Anzahl Zellen ausgesät und bis zur Adhärenz über Nacht bei 37°C inkubiert. Falls die Zellen transfiziert wurden, erfolgte die Stimulation am Tag nach der Transfektion. Stimuliert wurde mit einer 10 fach konzentrierten Stammlösung in Medium ohne FCS. Danach wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitspannen bei 37°C inkubiert und anschließend lysiert.

Suspensionszellen wurden in Suspension stimuliert, abzentrifugiert (300 g, 5 min), mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend lysiert.

3.11 SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT ANALYSE

3.11.1 Zelllysate

Adhärenz Zellen wurden nach der Stimulation auf Eis gestellt, mit eiskaltem PBS gewaschen und direkt auf der Platte mit eiskaltem TNE⁺-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 1 % (v/v) NP-40, 2 mM EDTA, 1 mM Na-Orthovanadat, 5 mM NaF, 0,04 % (v/v) complete[®]-Lösung (1 Tablette auf 2ml)) lysiert. Suspensionszellen wurden nach der Stimulation gesammelt. Nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurde das Zellsediment in eiskaltem TNE⁺-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert.

Nach der Zentrifugation (10 min, 15000 g, 4°C) wurde aus dem Überstand der Zellextrakt gewonnen. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Proteinbestimmungs-Reagenz gegen eine Albumin-Kalibrierreihe (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg/ml BSA) ermittelt.

Für die Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung wurde statt TNE⁺ ein modifizierter RIPA⁺ Puffer (0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM Na-Orthovanadat, 5 mM NaF, 0,04 % (v/v) complete[®]-Lösung) nach Chang (Chang et al., 2001) als Lysispuffer verwendet.

3.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von endogenen und rekombinant exprimierten Proteinen und wurde in Anlehnung an die Standardmethode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dazu wurden die Zelllysate mit SDS-Probenpuffer (125 mM Tris pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau) zu einem maximalen

Endvolumen von 25 µl versetzt und zur Denaturierung für 3 min im Wasserbad aufgeköcht. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden aus den Gelen im Nass-Transfer-Verfahren (Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) durch Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h unter Kühlung auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Durch reversible Färbung der Membran mit Ponceau-Rot (0,5 % (w/v) Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure) wurde die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung und des Transfers kontrolliert. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen unter Schwenken über Nacht bei 4°C in Blockpuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST) inkubiert. Danach wurden sie für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit einer Primär-Antikörper Lösung inkubiert und dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden erneut dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Um die Peroxidase-gekoppelten Proteine nachzuweisen, wurde ein Chemilumineszenz Reagenz nach Anleitung des Herstellers verwendet.

3.12 IMMUNPRÄZIPITATION

Zum Nachweis der Interaktion verschiedener intrazellulärer Proteine wurden die Lysate, wie für die SDS-PAGE beschrieben, hergestellt (3.11).

Die entsprechende Proteinmenge wurde über Nacht bei 4°C rollend mit 2 µg des Antikörpers präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 20 µl Sepharose (für IgG-Antikörper mit gammabind-Sepharose, für IgM-Antikörper mit anti-IgM gekoppelter Protein-A-Sepharose) versetzt und für 40 min bei 4°C gerollt. Der Komplex aus Sepharose, Antikörper und Protein wurde abzentrifugiert (5 min, 500 g, 4°C), viermal mit kaltem Lysispuffer gewaschen und anschließend mit einer Hamiltonspritze bis zur Trockene abgesaugt. Der Komplex wurde mit 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und

10 min bei RT stehen gelassen. Zur Denaturierung wurde der Komplex 3 min aufgekocht und abzentrifugiert (10 s, 15000 g, RT). Danach wurde der gesamte Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das weitere Verfahren wurde analog der SDS-PAGE und dem Western-Blot durchgeführt (3.11).

3.13 HERSTELLUNG VON KERNEXTRAKTEN

Zur Untersuchung der Translokation von RACK1 in den Zellkernen wurden die Zellen mit EDTA/Trypsin-Lösung von den Zellkulturschalen gelöst (3 min, 37°C), in Eppendorfgefäße überführt und abzentrifugiert (300 g, 5 min, RT). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (300 g, 5 min, RT). Nach Abziehen des Überstandes wurde das Zellpräzipitat in 400 µl eiskaltem Puffer A (10 mM HEPES (pH 7,8), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,04 % complete®-Lösung) für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Lyse wurden die Zellen nach Zugabe von 25 µl einer 10 %igen NP-40 Lösung kräftig geschüttelt (2 min, 4°C). Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (15000 g, 15 sec, 4°C), der vorsichtig abgenommene Überstand bildete die Zytosolfraktion. Das Präzipitat wurde in 50 µl Puffer C (20 mM HEPES (pH 7,8), 0,4 M CaCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,04% complete®-Lösung (1Tablette auf 2ml)) resuspendiert. Durch 30 minütiges kräftiges Schütteln bei 4°C wurden die Zellkerne lysiert und die Kernproteine freigesetzt. Durch anschließende Zentrifugation (15000 g, 5 min, 4°C) wurde das Chromatingerüst abgetrennt, der Überstand (= Kernextrakt) wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden im Western-Blot weiter untersucht (Kap. 3.11.2)

3.14 *UNTERSUCHUNG DER SENESZENZ-ASSOZIIERTEN β- GALAKTOSIDASE AKTIVITÄT*

Die Untersuchung von Zellen auf seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase Aktivität erfolgte nach einem Protokoll von Dimri (Dimri et al., 1995). Dafür wurden EF mit NSM-myc nach der Lipofectamine 2000 Methode transfiziert (3.9.2) und in Zellkulturschalen mit 12 Kavitäten auf autoklavierten Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min mit Formaldehydlösung (3 % (w/v) in PBS, pH 7,4) fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen bei 37°C mit frischer seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase-Lösung (0,1% X-Gal, 40 mM Zitronensäure, 40 mM Na₃PO₄, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 6,0) inkubiert. Bei Galaktosidaseaktivität färbten sich die Zellen durch Spaltung des X-Gals blau. Die Zellen wurden am Axioskop mit einer 20fachen Vergrößerung im Hellfeld fotografiert. Als positiver Vergleich diente die lysosomale Galaktosidaseaktivität bei pH 4,0 im gleichen Puffersystem.

3.15 *IMMUNFLUORESCENZEN*

3.15.1 Untersuchung von Fibroblasten

Autoklavierte Deckgläschen wurden in die Kavitäten der Zellkulturschale gelegt und mit sterilem PBS gespült. Die Zellen wurden in einer Dichte von 3,5x10⁴ Zellen in 1,8 ml Medium pro Kavität ausgesät. Über Nacht adhärten die Zellen. Nach der Stimulation am nächsten Tag wurden die Schalen auf Eis gestellt, mit eiskaltem PBS gewaschen und 30 min mit Formaldehydlösung (2,5 % (w/v) in PBS, pH 7,4) fixiert. Die Lyse erfolgte mit Methanol für 10 min bei -20°C. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer BSA Lösung (5 % (w/v) in PBST, 1h RT) abgesättigt, anschließend wurde über Nacht mit dem Antikörper, der gegen das erste Protein gerichtet war, inkubiert (4°C in TBS). Die Zellen wurden zweimal für 5 min mit TBST gewaschen, dann zweimal für 5 min mit TBS, danach folgte die Inkubation

mit dem Antikörper, der gegen das zweite Protein gerichtet war (1 h RT in TBS). Nach erneutem Waschen (2 x mit TBST, 2 x mit TBS) folgte in zwei Schritten bei jeweils 37°C für 1 h die Inkubationen mit den entsprechenden Zweit-Antikörpern. Nach dem Waschen (2 x 5 min mit TBST, 2 x 5 min mit TBS) wurde zur Färbung des Zellkerns mit dem DNA-Farbstoff DAPI (1:100 in PBS) gefärbt (15 min bei 37°C) und erneut gewaschen (2 x mit TBST, 4 x mit TBS). Die Deckgläschen wurden anschließend mit einem Medium gegen das Ausbleichen (Slowfade®) auf Objektträger gebracht und mit farblosem Nagellack fixiert.

3.15.2 Untersuchung von NK-Zellen

Zur Gewinnung von murinen NK-Zellen wurden die Mäuse mit Ether narkotisiert, durch Genickbruch getötet und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Milzen durch ein Sieb homogenisiert und die Zellsuspension zweimal mit vorgewärmtem Click-RPMI-Medium gewaschen (5 min, 300 g, RT). Die Lymphozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mit Lympholyte-M abgetrennt (20 min, 900 g ohne Bremse, RT). Anschließend wurde die Lymphozytenschicht in PBS gewaschen und in Medium resuspendiert. Die NK-Zellen wurden mit dem NK-Cell Isolierungskit nach Protokoll isoliert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Nach der Stimulation wurden die NK-Zellen abzentrifugiert (alle Zentrifugenschritte erfolgten bei RT, 15000 g für 10 sec), mit eiskaltem PBS gewaschen und 20 min bei RT in Formaldehydlösung (2,5 % (w/v) in PBS, pH 7,4) fixiert. Zum Fixieren der Suspensionszellen auf dem Objektträger wurden die Zellen in 2,5 % (w/v) BSA Lösung in der cytopsin® Zentrifuge bei 700 g für 5 min zentrifugiert, anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei RT getrocknet. Am nächsten Tag wurden die NK-Zellen mit den entsprechenden Antikörpern und DAPI eingefärbt und mit 7µl Slowfade® und Nagellack eingebettet.

3.15.3 Aufnahmen am LSM

Zur Gewinnung digitaler Bilder am LSM wurden die eingedeckelten Zellen mit einem 40 x bzw. 63 x Öl-Immersionsobjektiv untersucht. Die Anregungswellenlängen und die Filter sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Wellenlängen des LSM

Anregungswellenlänge	Filter	verwendeter Farbstoff
543 nm	560 nm	TRITC, Rhodamin
488 nm	505-530 nm	FITC
351 nm	385-470 nm	DAPI

3.16 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

Die Immunfluoreszenz ermöglicht den Nachweis zellulärer Oberflächenantigene. Mit Hilfe des Durchflusszytometers können Zellen, welche mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden, hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzintensität analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode benutzt, um die Reinheit der isolierten NK-Zellen zu überprüfen.

1×10^5 Zellen wurden in 100 μ l des NK-Zellisolierungspuffers aufgenommen und mit 2 μ l Antikörper versetzt. Die Zellsuspension wurde 15 min bei 4°C stehengelassen und anschließend auf 1 ml mit dem NK-Zellisolierungspuffer aufgefüllt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (30 sec, 15000 g, RT), in 100 μ l Fixierlösung (Cell Fix (1:10 verdünnt)) aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt.

4 Ergebnisse

4.1 EINFLUSS VON TNF AUF DIE TRANSLOKATION DER KLASSISCHEN PKCS UND RACK1 IN MURINEN EMBRYONALEN FIBROBLASTEN

In COS-1 Zellen konnte in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass RACK1 nach Überexpression des TNF-R1 an der Plasmamembran mit FAN kolokalisiert (Tcherkasowa et al., 2002). RACK1 als „Rezeptor für aktivierte C Kinasen“ interagiert mit der PKC- β -II (Mochly-Rosen et al., 1995). Es sollte nun untersucht werden, ob nach TNF Stimulation eine Translokation von PKC- β -II und RACK1 erfolgt und wenn ja, ob diese vom Protein FAN abhängig ist.

4.1.1 Endogene PKC- β -II und endogenes RACK1 transloziert in EF FAN WT nach PMA Stimulation nicht an die Plasmamembran

Die EF FAN WT wurden in der Immunfluoreszenz auf Translokation der Proteine PKC- β -II und RACK1 nach Stimulation untersucht. Die Färbung der beiden Proteine PKC- β -II (rot) und RACK1 (grün) wies die erwartete zytosolische Verteilung (Abbildung 19(A)) auf. Nach Aktivierung der PKC- β -II durch das DAG imitierende PMA (2.3) sollte eine Translokation der PKC- β -II an die Membran erfolgen. In den EF FAN WT änderte sich die zytosolische Verteilung der beiden Proteine jedoch nicht (Abbildung 19 (B)). Eine Kolokalisation der Proteine war weder vor nach der Stimulation zu erkennen. Nach TNF Stimulation (100 ng/ml) war in den EF FAN WT weder eine Translokation der PKC- β -II an die Plasmamembran, noch eine Kolokalisation mit RACK1 zu erkennen. Da mit humanem TNF (hTNF) in murinen Zellen gearbeitet wurde und hTNF in murinen Zellen nur an den TNF-R1 bindet (Smith et al., 1986; Ameloot et al., 2001), konnte so sichergestellt werden, dass die auftretenden Effekte auf den TNF-R1 zurückzuführen sind.

Nach Stimulation mit PMA konnte in den EF FAN KO keine veränderte Verteilung der Proteine PKC- β -II oder RACK1 gesehen werden (Abbildung 20).

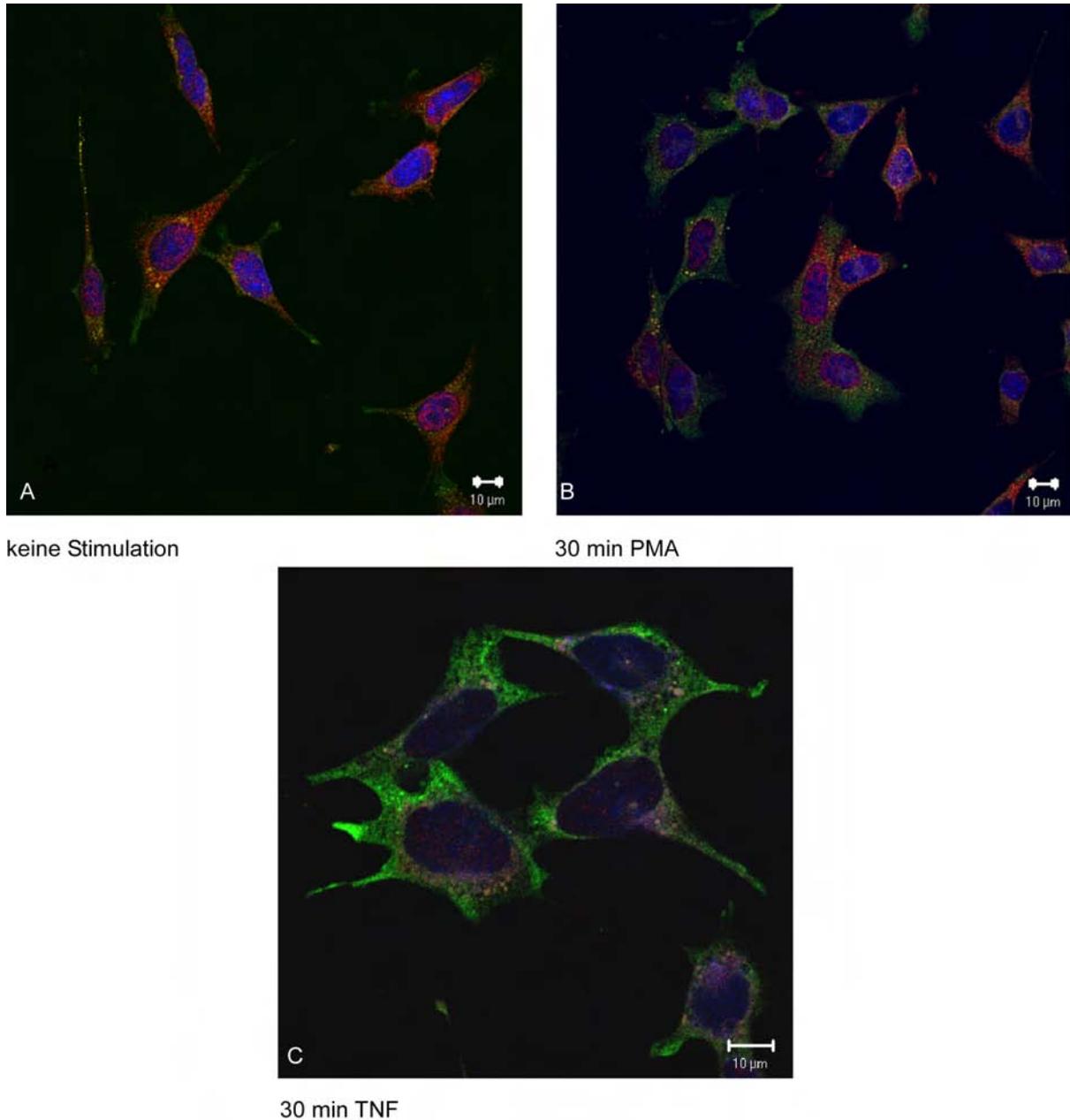
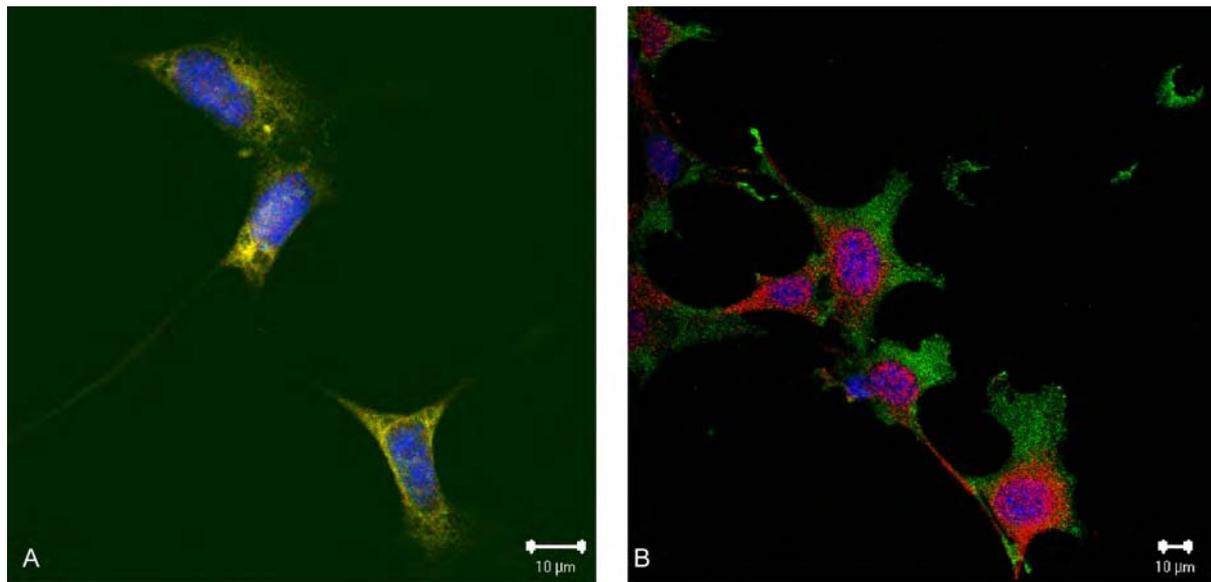


Abbildung 19: EF FAN WT: Darstellung der Proteine PKC- β -II und RACK1 durch spezifische Antikörper

$3,5 \times 10^4$ Zellen der EF FAN WT wurden auf CS ausgesät und adhären gelassen. Am folgenden Tag wurde mit Medium (A), für 30 min mit PMA (10 μ M) (B) bzw. für 30 min mit TNF (100ng/ml) (C) stimuliert. RACK1 wurde durch einen spezifischen Antikörper (1:200, RT, 1 h) und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α -Maus IgM-FITC (grüne Fluoreszenz) 1:1000, 1 h, 37°C). Die PKC- β -II wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:100, 4°C über Nacht) und einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper (α -Kaninchen-TRITC (rote Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C) nachgewiesen. Die Kerne wurden zur besseren Erkennung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gefärbt.



keine Stimulation

10 min PMA

Abbildung 20: EF FAN KO: Darstellung der Proteine PKC- β -II und RACK1 durch spezifische Antikörper

Die Durchführung erfolgte wie bei Abbildung 19, nur mit EF FAN KO als Zelllinie. Stimuliert wurde mit Medium (A) oder für 10 min mit PMA (B).

4.1.2 Endogene PKC- β -I transloziert in EF FAN WT nach PMA Stimulation nicht in die Kernperipherie

Im Vergleich zur PKC- β -II ist bei der PKC- β -I nach PMA Stimulation eine Translokation der PKC in die Kernperipherie zu erwarten (Kiley et al., 1995). Für die PKC- β -I ist nach Aktivierung durch PMA keine Kolokalisation mit RACK1 beschrieben worden.

In den unstimulierten EF FAN WT wiesen die Proteine PKC- β -I (rot) und RACK1 (grün) eine zytosolische Verteilung (Abbildung 21 (A)) auf. Nach Stimulation mit PMA änderte sich diese Verteilung nicht (Abbildung 21 (B)). Eine Kolokalisation von PKC- β -I und RACK1 war weder vor noch nach der Stimulation zu erkennen. Ebenso war in EF FAN KO eine zytosolische Verteilung der PKC- β -I und des RACK1 zu sehen, auch hier änderte sich die Verteilung nach Stimulation mit PMA nicht (Abbildung 22).

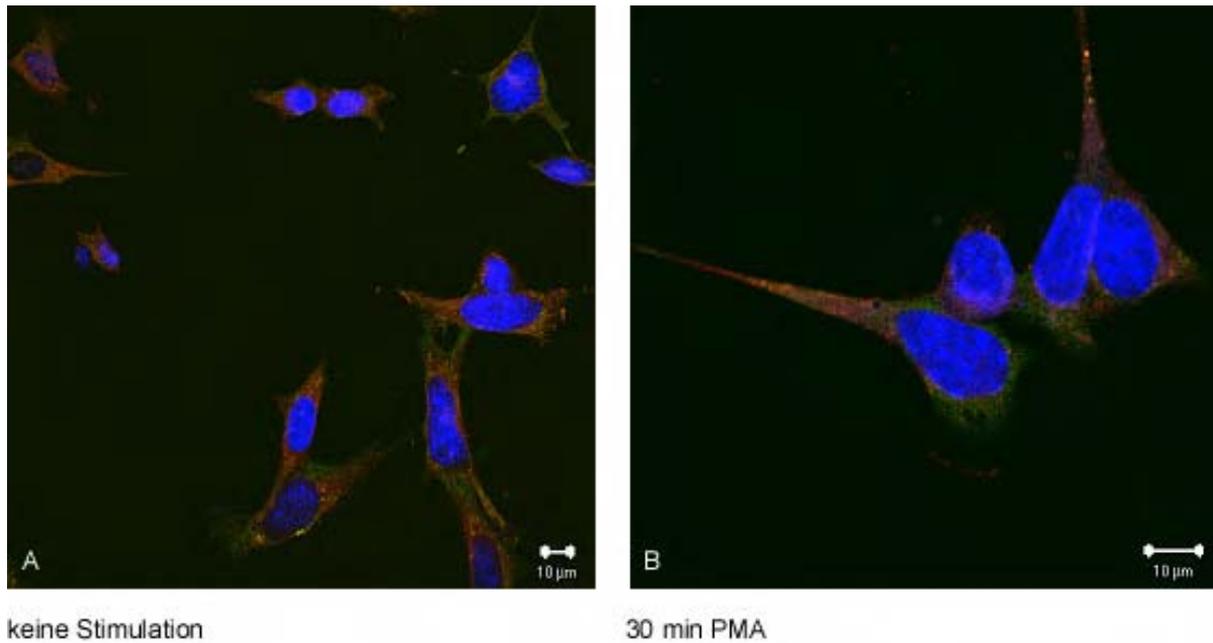


Abbildung 21: EF FAN WT: Darstellung der Proteine PKC- β -I und RACK1 durch spezifische Antikörper

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abbildung 19, nur unter Verwendung eines PKC- β -I Antikörpers (1:100, 4°C über Nacht) und einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper (α -Kaninchen-TRITC (rote Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C).

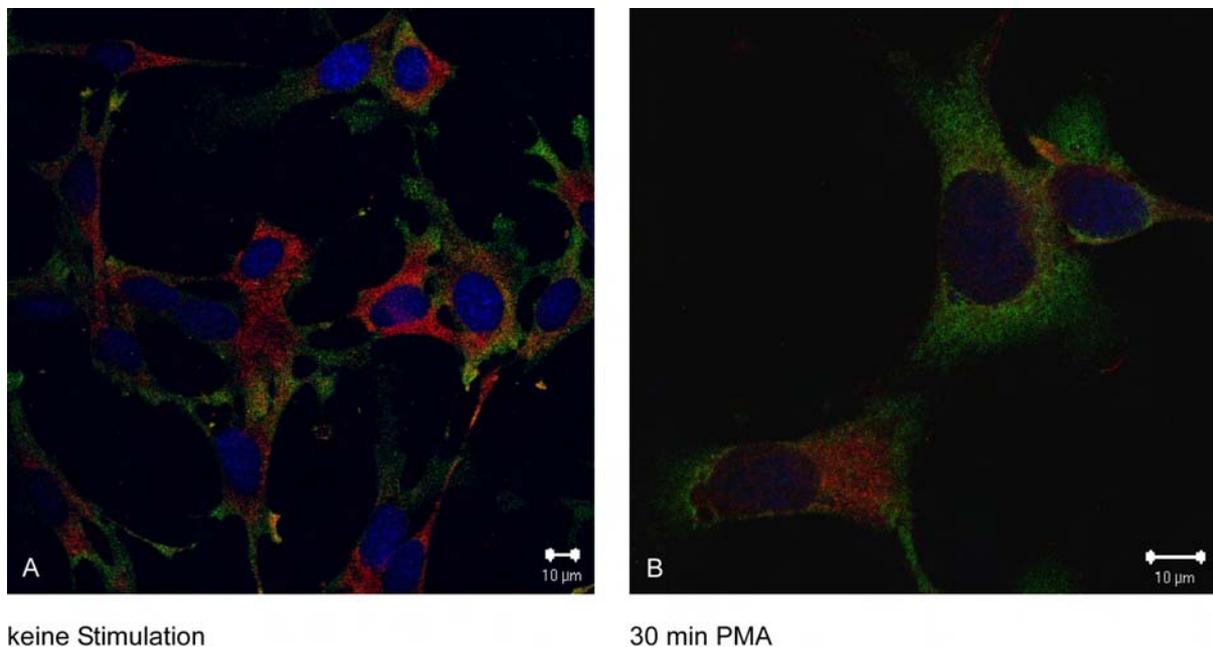


Abbildung 22: EF FAN KO: Darstellung der Proteine PKC- β -I und RACK1 durch spezifische Antikörper

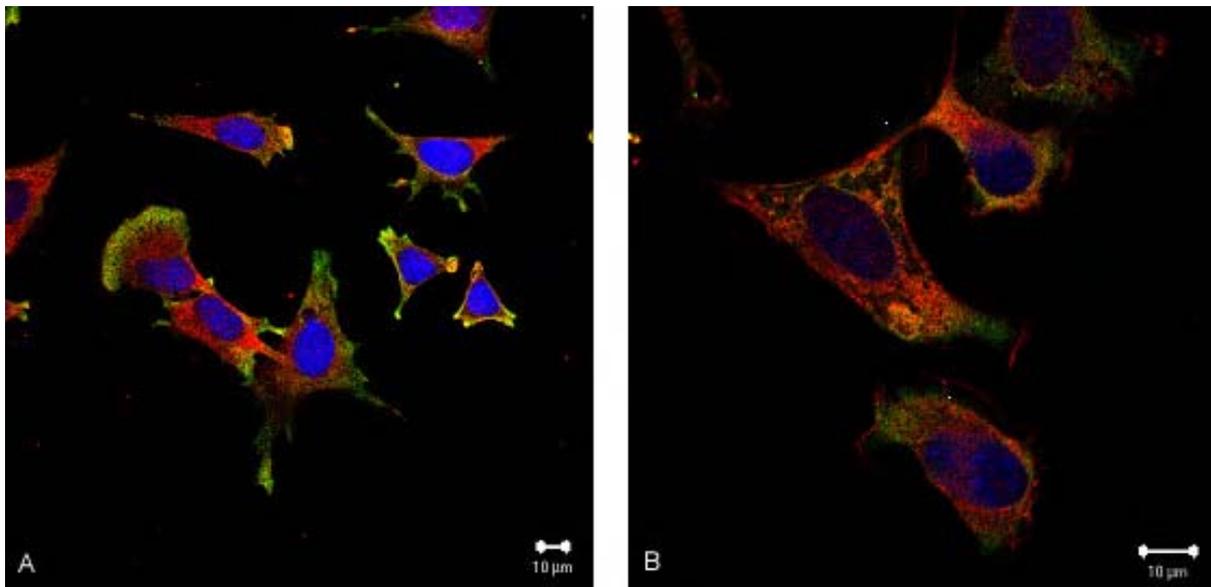
Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abbildung 21, nur unter Verwendung von EF FAN KO als Zelllinie.

4.1.3 Endogene PKC- α transloziert in EF FAN WT oder EF FAN KO nach PMA Stimulation nicht an die Plasmamembran

Ebenso wie für die PKC- β -II ist auch für die PKC- α nach Stimulation mit PMA eine Translokation an die Membran zu erwarten (Kiley et al., 1995).

In den EF FAN WT zeigten die unstimulierten Zellen eine zytosolische Verteilung der Proteine PKC- α (rot) und RACK1 (grün), wobei das RACK1 sich vermehrt in den Ausläufern der Zellen zeigte (Abbildung 23 (A)). Nach Stimulation mit PMA änderte sich an der Verteilung der PKC- α nichts, die Färbung des RACK1 nahm ab (Abbildung 23 (B)). Auch bei der PKC- α und RACK1 zeigte sich weder vor noch nach Stimulation eine Kolokalisation der beiden Proteine.

Die EF FAN KO zeigten eine zytosolische Verteilung der beiden Proteine PKC- α (rot) und RACK1 (grün) (Abbildung 24 (A)), es fand auch nach Stimulation mit PMA keine sichtbare Umverteilung der Proteine in der Zelle statt (Abbildung 24 (B)).



keine Stimulation

30 min PMA

Abbildung 23: EF FAN WT: Darstellung der Proteine PKC- α und RACK1 durch spezifische Antikörper

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abbildung 19, nur unter Verwendung eines PKC- α Antikörpers (1:100, 4°C über Nacht) und einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper (α -Kaninchen-TRITC (rote Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C).

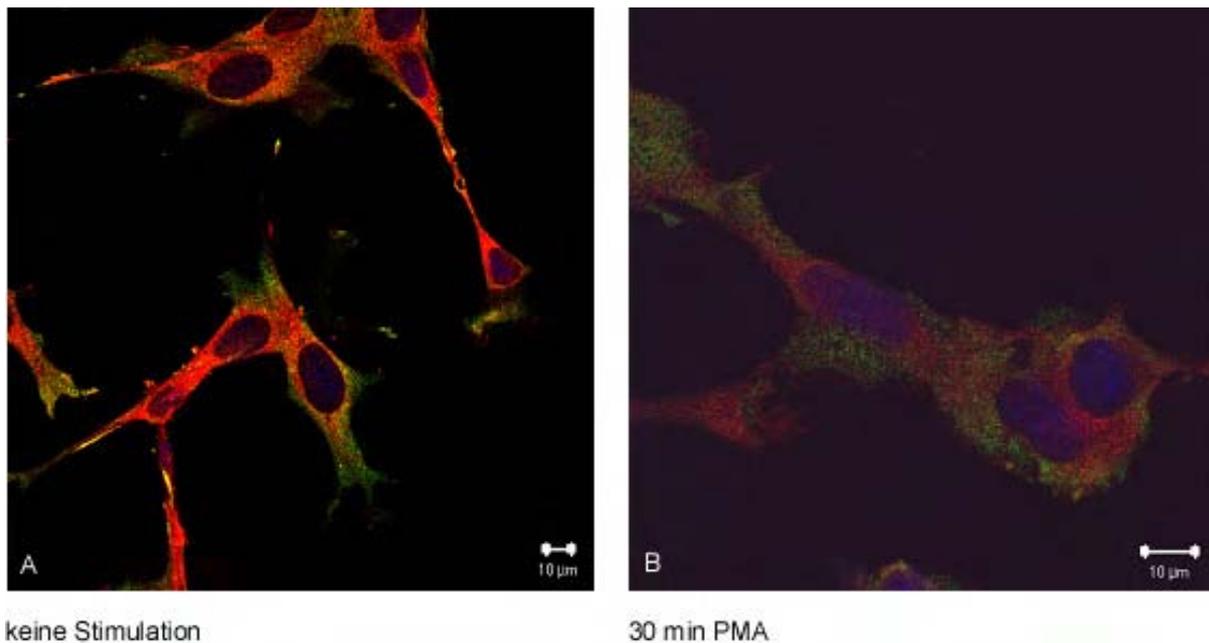


Abbildung 24: EF FAN KO: Darstellung der Proteine PKC- α und RACK1 durch spezifische Antikörper

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abbildung 19, nur unter Verwendung von EF FAN KO als Zelllinie.

4.1.4 Endogene PKC transloziert in EF FAN WT und EF FAN KO nach Stimulation mit PMA bzw. TNF nicht

Nachdem in den Fibroblasten weder die endogenen PKC- β -I und II noch die endogene PKC- α nach PMA Stimulation von der zytosolischen Verteilung an die Plasmamembran (PKC- β -II und PKC- α) oder in die Kernperipherie (PKC- β -I) transloziert und auch keine Kolokalisation der PKC- β -II mit RACK1 detektiert werden konnte, sollte mit einem Antikörper gegen pan PKC überprüft werden, ob nach PMA Stimulation überhaupt Translokationen der endogenen PKCs zu beobachten sind. Da der pan PKC Antikörper alle klassischen PKCs erkennt, ist auch zu erwarten, dass ein Teil mit RACK1 kolokalisiert.

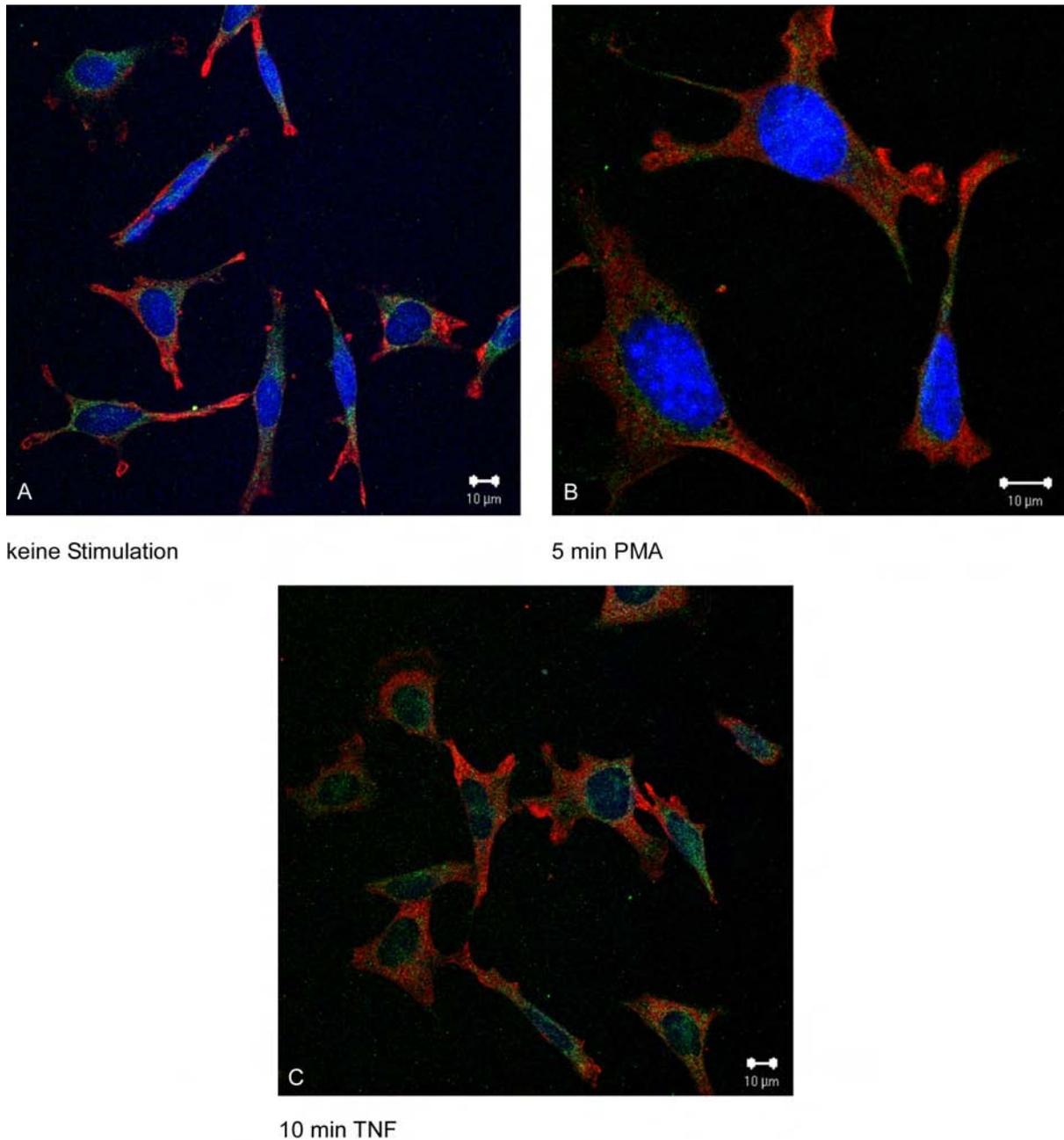


Abbildung 25: EF FAN WT: Darstellung der Proteine pan PKC und RACK1 durch spezifische Antikörper

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abbildung 19, nur unter Verwendung eines panPKC Antikörpers (1:100, 4°C über Nacht) und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper (α -Maus IgG-FITC (grüne Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C). Der Zweitantikörper für RACK1 ist TRITC gekoppelt (α -Maus IgM TRITC (rote Fluoreszenz) 1:500, 1 h, 37°C)

In den EF FAN WT war die PKC (grün) zytosolisch verteilt, wobei der größere Anteil sich in der Kernperipherie befand. RACK1 (rot) wies auch eine zytosolische Verteilung auf, wobei die Färbung der Ausläufer der Fibroblasten besonders ausgeprägt war (Abbildung 25 (A)). Nach der

Stimulation für 5 min mit PMA änderte sich die Verteilung der Proteine nicht. Es war weder eine Umverteilung der PKC zu erkennen, noch eine auftretende Kolo-kalisation mit RACK1 (Abbildung 25 (B)). Zu anderen Stimulationszeitpunkten war ebenfalls keine Veränderung der Proteinverteilung zu erkennen. (Daten nicht gezeigt). Nach Stimulation mit TNF zeigte sich keine Änderung der Proteinverteilung (Abbildung 25 (C)).

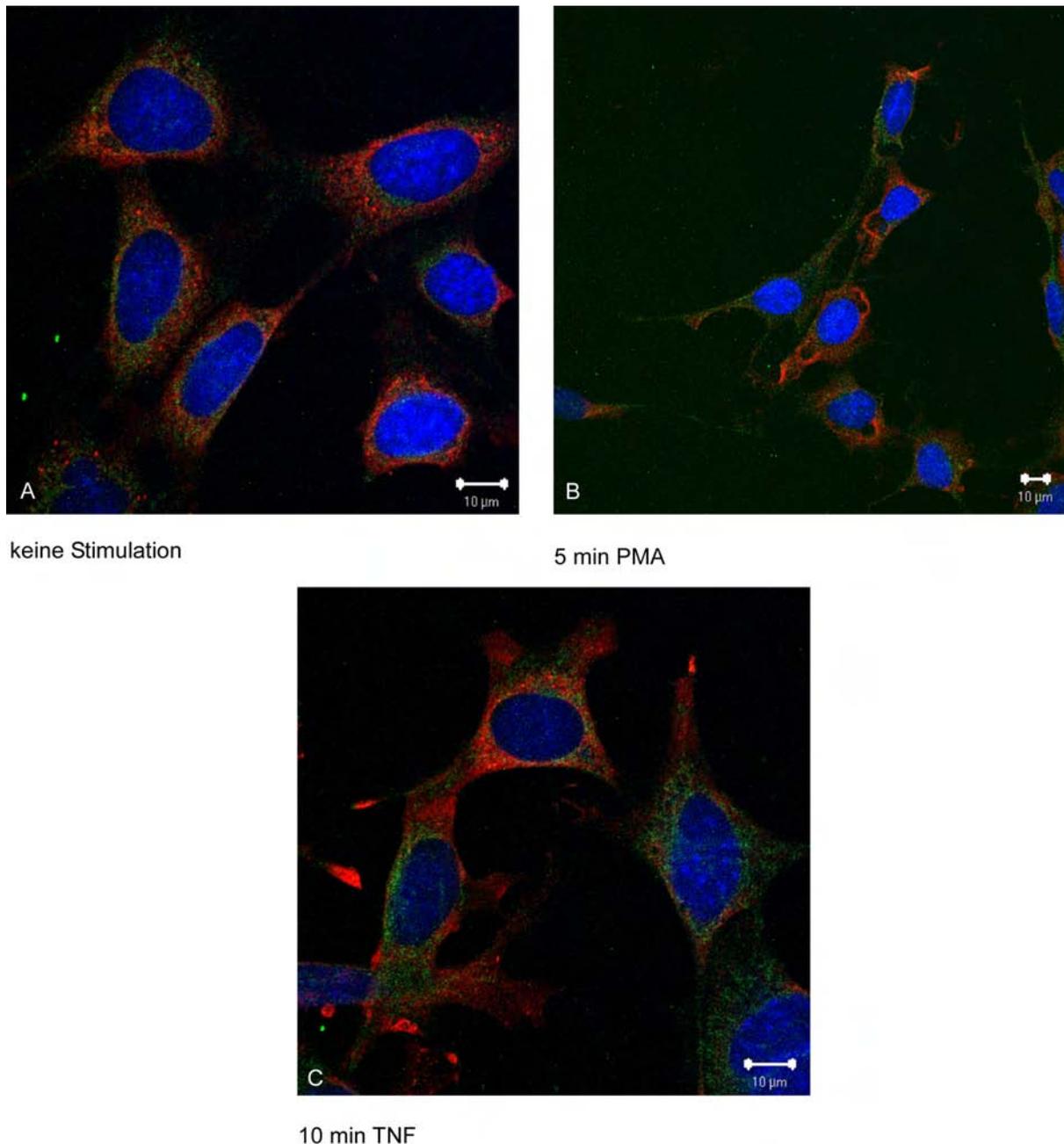


Abbildung 26: EF FAN KO: Darstellung der Proteine pan PKC und RACK1 durch spezifische Antikörper

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abbildung 25, nur unter Verwendung von EF FAN KO als Zelllinie.

Auch in den EF FAN KO hatte die PKC (grün) eine zytosolische Verteilung, ebenso wie RACK1 (rot) (Abbildung 26 (A)). An dieser Verteilung im gesamten Zytosol änderte sich nach der 5-minütigen Stimulation mit PMA nichts. Eine Kolo-kalisation mit RACK1 war nicht zu erkennen (Abbildung 26 (B)). Auch zu späteren Zeitpunkten der Stimulation war keine Veränderung der Verteilung erkennbar (Daten nicht gezeigt). Ebenso zeigte die Stimulation mit TNF keine veränderte Verteilung im Vergleich mit den unstimulierten Zellen (Abbildung 26 (C)).

Die bisher gezeigten Ergebnisse der murinen Fibroblasten sprechen dafür, dass die Expression der PKC nicht ausreicht, um mit den kommerziell erworbenen Antikörpern nach Stimulation deutliche Effekte erkennbar zu machen. Für die nächsten Versuche wurde die PKC- β -II als EGFP-Konstrukt überexprimiert. Dadurch sollte eine ausreichende Expression der PKC erreicht werden und die Problematik der geringen Affinität der verwendeten Antikörper umgegangen werden.

4.1.5 Überexprimierte PKC- β -II-EGFP transloziert in EF nach PMA Stimulation an die Plasmamembran, nicht jedoch nach TNF Stimulation

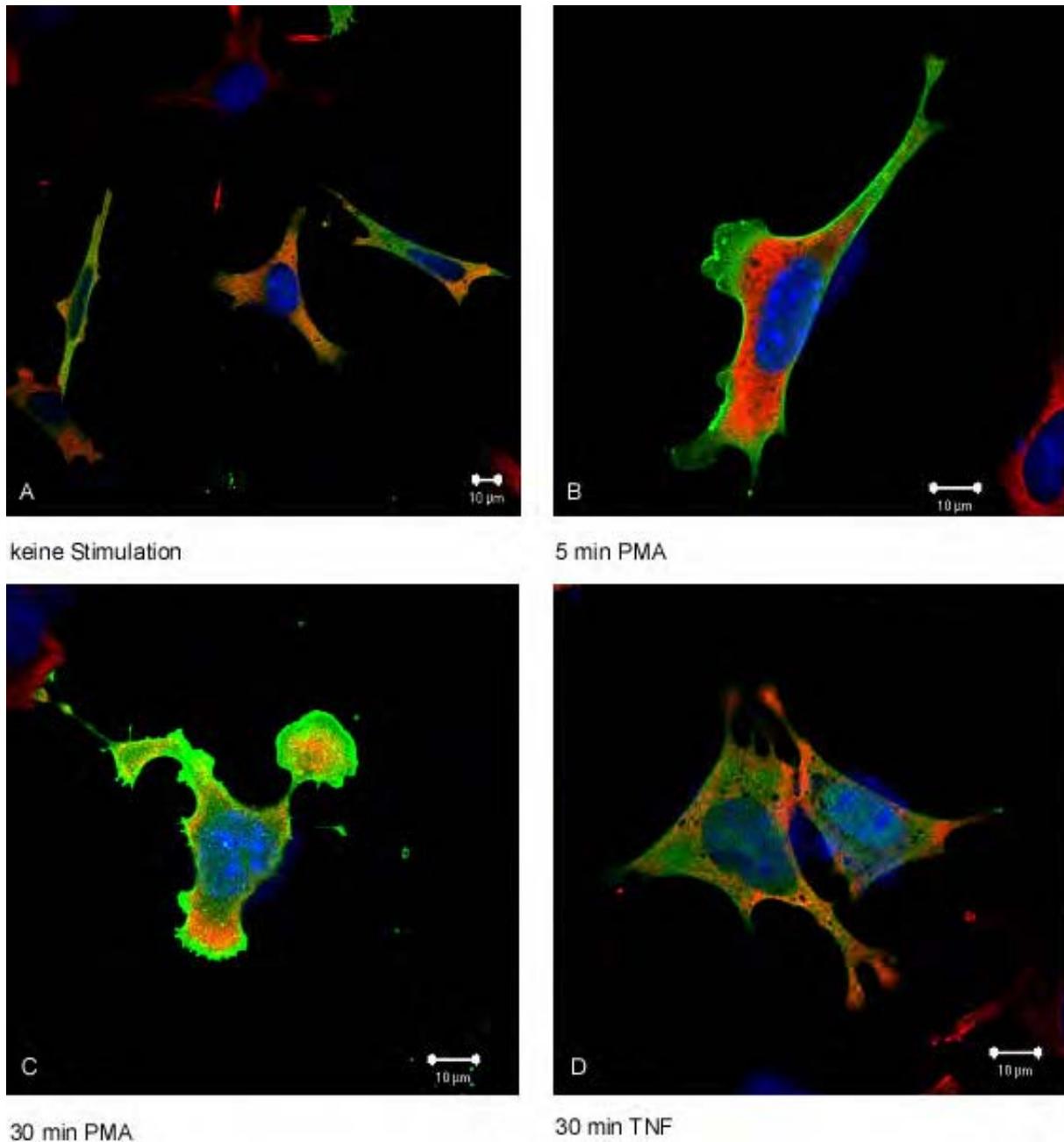


Abbildung 27: EF FAN WT: Darstellung der Proteine PKC- β -II als EGFP-Konstrukt und RACK1 durch spezifischen Antikörper

3,5 x 10⁴ Zellen der EF FAN WT wurden auf CS ausgesät, adhären gelassen und mit einem PKC- β -II-EGFP Konstrukt (grüne Fluoreszenz) transfiziert. Am folgenden Tag wurde mit Medium (A), für 5 min mit PMA (10 μ M) (B), für 30 min mit PMA (C) oder für 10 min mit TNF (100 ng/ml) (D) stimuliert. RACK1 wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:200, RT, 1 h) und einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α -Maus IgM TRITC (rote Fluoreszenz) 1:500, 1 h, 37°C). Die Kerne wurden zur besseren Erkennung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gefärbt.

Da die Expression der endogenen PKC- β -II und die Färbung durch Antikörper nicht ausreichte, um eine Kolo-kalisation von PKC- β -II mit RACK1 im LSM zu erkennen, wurden die Zellen mit einem PKC- β -II-EGFP Konstrukt (Abbildung 13) transfiziert. Durch die Überexpression der PKC- β -II als ein EGFP-Konstrukt musste die PKC nicht mehr durch Antikörper angefärbt werden, sondern war direkt im LSM sichtbar. RACK1 wurde weiterhin mit einem Antikörper detektiert.

Nach Transfektion der EF FAN WT mit dem Standardprotokoll für Lipofectamine 2000 wurde eine Transfektionseffizienz von 50 % erreicht.

Die PKC- β -II-EGFP zeigte unstimuliert eine zytosolische Verteilung wie sie auch bei der endogenen PKC- β -II zu sehen war. An der Verteilung des endogenen RACK1 ändert sich durch die Überexpression der PKC- β -II nichts (Abbildung 27 (A)).

Nach Stimulation für 5 min mit PMA war eine Umverteilung der PKC- β -II in Richtung Plasmamembran erkennbar. An der Verteilung des RACK1 änderte sich nichts (Abbildung 27 (B)). Die Translokation der PKC- β -II in Richtung Plasmamembran war zu den Zeitpunkten 10 min und 20 min deutlich zu sehen (Daten nicht gezeigt), nach 30 min war die Translokation am deutlichsten (Abbildung 27 (C)). Allerdings war nach der Überexpression der PKC- β -II ebenfalls keine Kolo-kalisation mit RACK1 zu erkennen. Bei der Stimulation mit TNF änderte sich die Verteilung der PKC- β -II zu keinem Zeitpunkt und auch hier ließ sich keine Kolo-kalisation mit RACK1 beobachten, dargestellt ist nur die Stimulation für 30 min TNF (Abbildung 27 (D)).

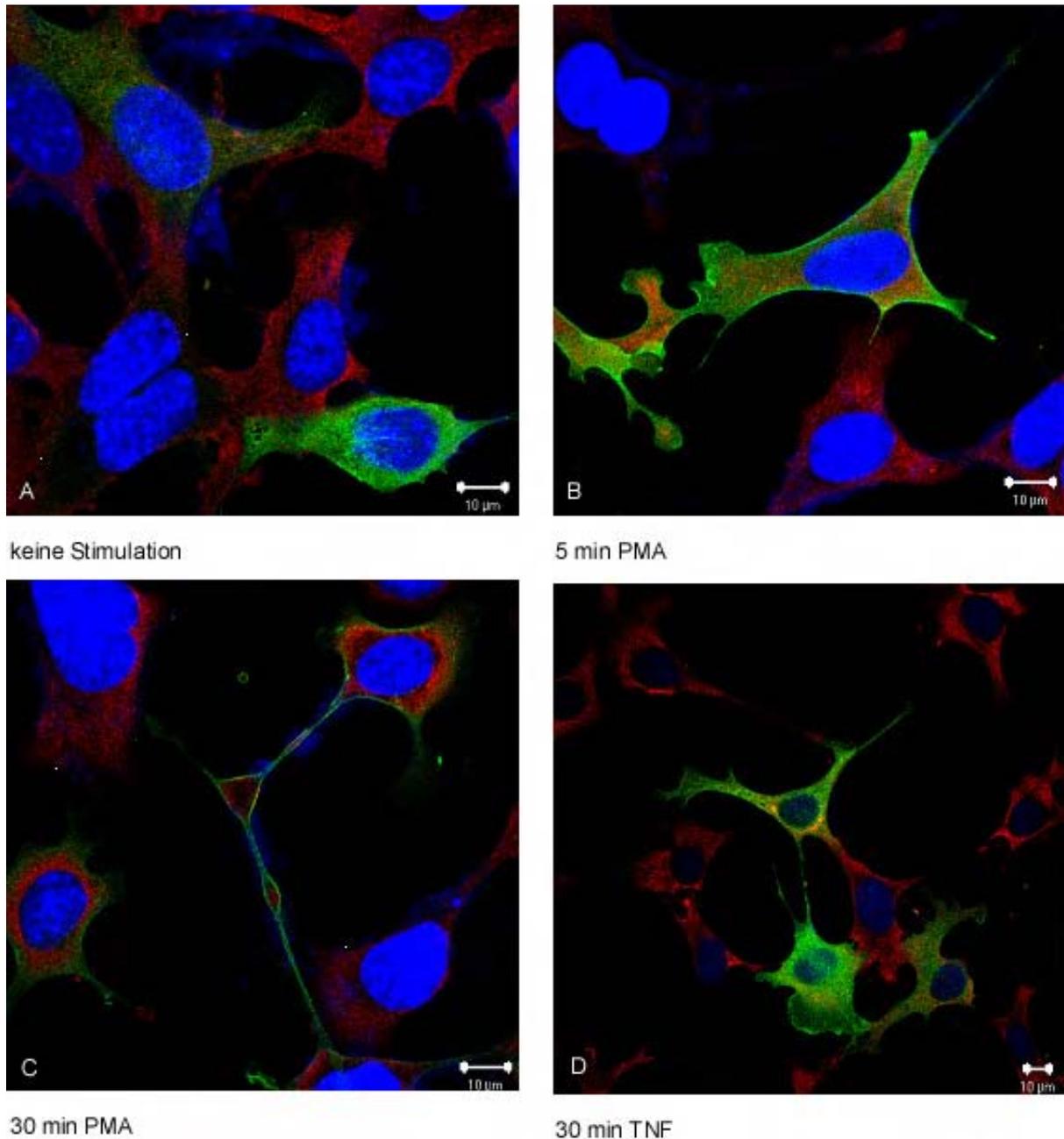


Abbildung 28: EF FAN KO: Darstellung der Proteine PKC- β -II als EGFP-Konstrukt und RACK1 durch spezifischen Antikörper

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abbildung 27, nur unter Verwendung von EF FAN KO als Zelllinie.

Bei den EF FAN KO wurde mit dem Standardprotokoll für Lipofectamine 2000 ebenfalls eine Transfektionseffizienz von 50 % erreicht. Die überexprimierte PKC- β -II hatte auch hier unstimuliert eine zytosolische Verteilung, wie schon die Daten von der endogenen PKC- β -II zeigten. RACK1

zeigte die gleiche Verteilung wie ohne überexprimierte PKC- β -II (Abbildung 28 (A)).

Nach Stimulation mit PMA begann nach 5 min für die PKC- β -II eine Translokation an die Plasmamembran, die Verteilung des RACK1 blieb unverändert (Abbildung 28 (B)). Die Translokation nahm bei den Werten 10 min und 20 min weiter zu (Daten nicht gezeigt), nach 30 min war fast die gesamte PKC- β -II an der Membran. Da RACK1 seine zytosolische Verteilung beibehält, war auch hier keine Kolokalisation der Proteine zu beobachten (Abbildung 28 (C)).

Nach 30-minütiger TNF Stimulation war weder eine PKC- β -II noch eine RACK1 Translokation an die Membran zu beobachten, auch hier gab es keine Kolokalisation (Abbildung 28 (D)). Auch die Werte für 10 min und 20 min TNF Stimulation zeigten keine Veränderung der Verteilung und keine Kolokalisation (Daten nicht gezeigt).

Die bisher gezeigten Daten aus der Immunfluoreszenz sprechen dafür, dass in murinen Fibroblasten TNF keinen Einfluss auf die Aktivierung der PKC hat. Weiterhin konnte in den hier verwendeten Zellen keine Kolokalisation von RACK1 und der PKC gezeigt werden, auch die Aktivierung der PKC durch PMA änderte daran nichts.

4.1.6 Überexprimierte PKC- β -II-EGFP transloziert in MCHS Zellen nach PMA Stimulation an die Plasmamembran, RACK1 jedoch nicht

Als weiteres Zellsystem für die Untersuchung der Translokation der PKC durch TNF und der eventuellen Kolokalisation von RACK1 wurden murine CHS Zellen gewählt (2.2.3). Die Wahl fiel auf dieses Zellsystem, weil für Patienten mit CHS eine veränderte PKC Aktivierung beschrieben ist (Cui et al., 2001). Bei den MCHS Zellen wurde durch die Transfektion mit Lipofectamine 2000 eine Transfektionseffizienz von ungefähr 35 % erreicht. RACK1 wurde endogen mit Antikörper nachgewiesen. Die PKC- β -II wies in den unstimulierten Zellen eine zytosolische Verteilung auf, wobei besonders viel des Proteins im perinuklären Raum sichtbar war (Abbildung 29 (A)). Es

zeigte sich keine Kollokalisierung mit RACK1. Nach Stimulation mit PMA translozierte die PKC- β -II an die Membran. An der Verteilung des RACK1 änderte sich durch die Stimulation nichts, auch gab es nach der Stimulation keine Kollokalisierung der beiden Proteine (Abbildung 29 (B)). Zu vorherigen Zeitpunkten war die Translokation der PKC- β -II nicht ganz so ausgeprägt, an der RACK1 Verteilung änderte sich nichts (Daten nicht gezeigt). Nach 60-minütiger Stimulation mit TNF war ein Teil der PKC- β -II an der Membran, der größte Teil allerdings noch im Zytoplasma (Abbildung 29 (C)). Auch zu früheren Zeitpunkten war hier keine Änderung zu sehen und keine Kollokalisierung mit RACK1 (Daten nicht gezeigt). Die murinen Fibroblastenzelllinien C57Bl/6 als Vergleichszelllinie der MCHS zeigten vor und nach Stimulation ein ähnliches Verteilungsmuster der Proteine wie die MCHS (Daten nicht gezeigt).

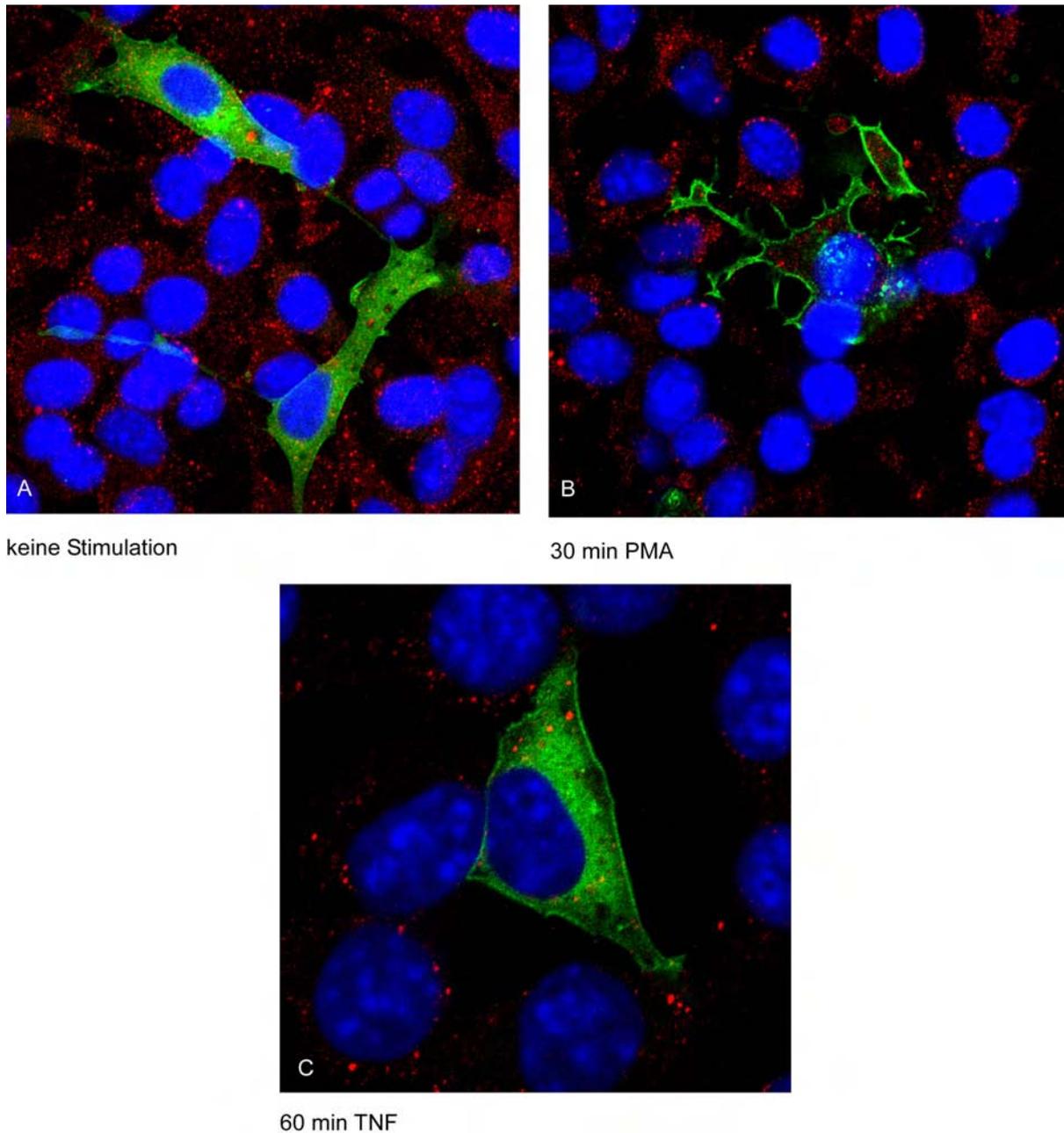


Abbildung 29: Murine CHS Zellen: Darstellung der Proteine PKC- β -II als EGFP-Konstrukt und RACK1 durch spezifischen Antikörper

3,5 x 10⁴ Zellen der MCHS wurden auf CS ausgesät, adhären gelassen und mit einem PKC- β -II-EGFP Konstrukt (grüne Fluoreszenz) transfiziert. Am nächsten Tag wurde mit Medium (A), für 30 min mit PMA (10 μ M) (B), oder für 60 min mit TNF (100 ng/ml) (C) stimuliert. RACK1 wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:200, RT, 1 h) und einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α -Maus IgM TRITC (rote Fluoreszenz) 1:1000, 1 h, 37°C). Die Kerne wurden zur besseren Erkennung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gefärbt.

4.1.7 Untersuchung von murinen NK Zellen in der Immunfluoreszenz

4.1.7.1 Kontrolle der Reinheit der murinen NK-Zellen nach Isolierung mit dem NK Cell Isolation Kit

Um die mögliche Kolokalisation der endogenen PKC- β -II und RACK1 in einem anderen Zellsystem als den embryonalen Fibroblasten zu überprüfen, wurden murine natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ausgewählt. Die Auswahl fiel auf NK Zellen, weil für Patienten mit Chediak-Higashi-Syndrom eine gestörte Killerzellaktivität und veränderte PKC-Aktivität beschrieben worden ist (Abo et al., 1982) und überprüft werden sollte, ob in NK-Zellen aus FAN-defizienten Mäusen in diesen Zellen ein ähnlicher Phänotyp zu erkennen ist. Für die Gewinnung der NK-Zellen wurden aus den Milzen von C57/B16 Mäusen mittels Dichtegradientenzentrifugation Lymphozyten isoliert. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch magnetische Negativseparation. Dazu wurden die Lymphozyten mit Antikörpern gegen T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, myeloide Zellen und erythroide Zellen inkubiert und durch magnetische Separation von den NK-Zellen getrennt. Um eine Aussage über die Reinheit der isolierten NK-Zellen machen zu können, wurden die Lymphozyten und die NK-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Lymphozyten enthielten ungefähr 4,31 % NK-Zellen (Abbildung 30 (C)). Nach der Reinigung erhöhte sich dieser Anteil auf knapp 79 % (Abbildung 30 (D)).

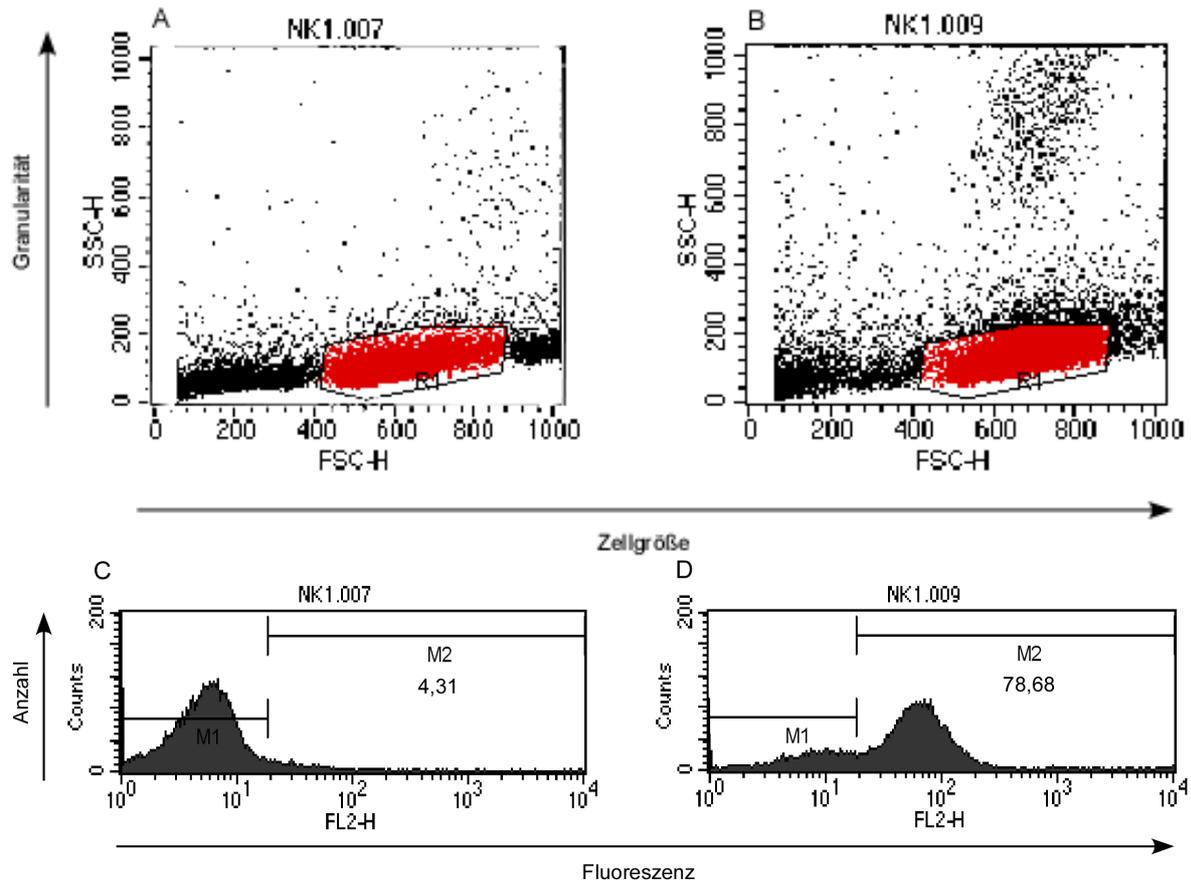


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse von murinen Lymphozyten und NK-Zellen nach Negativ Isolierung

Lymphozyten wurden aus den Milzen zweier männlicher C57/Bl6 Mäuse durch Lympholyte M aufgereinigt. Diese wurden durchflusszytometrisch nach Granularität und Größe analysiert. Dies geschah vor (A) und nach magnetischer Negativ-Isolierung von NK-Zellen (B). Die jeweils lebende, in rot dargestellte Lymphozytenpopulation wurde durch den Bereich R₁ dargestellt (oberes Teilbild). Die mit einem Antikörper gegen NK1.1 gefärbten Zellen wurden durchflusszytometrisch nach der Fluoreszenzintensität analysiert, dies geschah vor (C) und nach der Isolierung der NK-Zellen (D). Die gefärbten Zellen sind durch den Bereich M2 dargestellt (unteres Teilbild).

4.1.7.2 In murinen NK-Zellen ist nach Stimulation mit PMA oder TNF keine Translokation der endogenen PKC- β -II zu erkennen

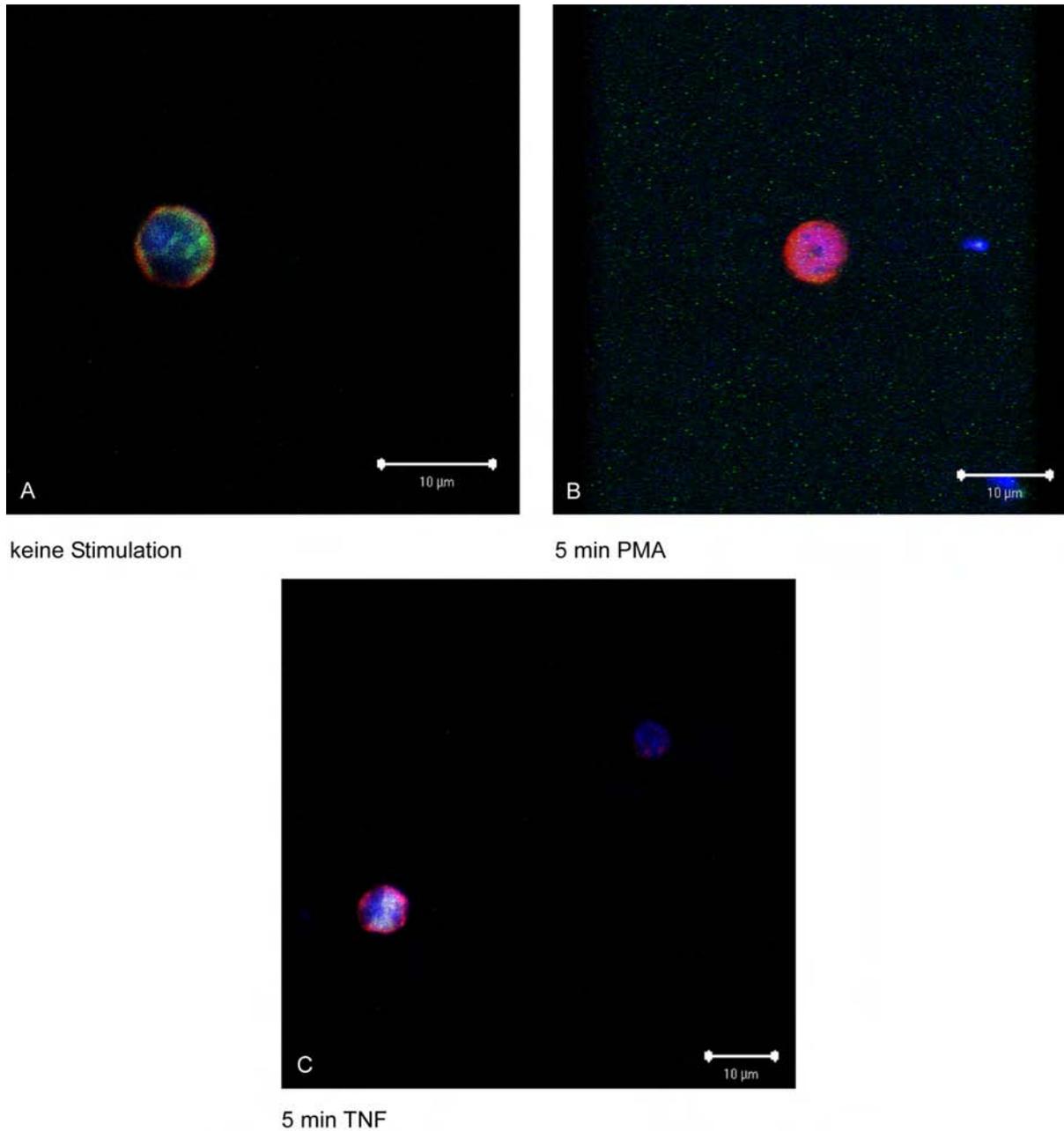


Abbildung 31: Murine NK Zellen: Darstellung der Proteine PKC- β -II und RACK1 durch spezifische Antikörper

Die NK Zellen wurden im Isolierungspuffer mit Medium (A), für 5 min mit PMA (10 μ M) (B) oder für 5 min mit TNF (100 ng/ml) (C) stimuliert. Danach wurden die Zellen mittels cytopsin-Zentrifuge auf den Objektträgern fixiert und über Nacht trocknen gelassen. RACK1 wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:200, RT, 1 h) und einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α -Maus IgM TRITC (rote Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C). Die PKC- β -II wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:100, 4°C über Nacht) und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper (α -Maus IgG-FITC (grüne Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C) nachgewiesen, die Kerne wurden zur besseren Erkennung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gefärbt.

Ebenso wie in den EF ist in den NK-Zellen für die PKC- β -II nach Stimulation mit PMA eine Translokation an die Membran zu erwarten.

In den NK-Zellen zeigten die unstimulierten Zellen eine zytosolische Verteilung der Proteine PKC- β -II (grün) und RACK1 (rot), wobei das große Volumen des Zellkerns (blau) die Unterscheidung zwischen Zytosol und Membran erschwert (Abbildung 31 (A)). Nach Stimulation mit PMA änderte sich an der Verteilung der PKC- β -II und des RACK1 nichts (Abbildung 31 (B)). Auch zeigte sich weder vor noch nach Stimulation eine Kolo-kalisation der beiden Proteine. Die hier nicht sichtbare Translokation der PKC- β -II könnte auch auf die nicht ausreichende Affinität der Antikörper zurückzuführen sein, wie schon in den EF gezeigt wurde. Die Stimulation der NK-Zellen mit TNF änderte ebenfalls nicht die Verteilung der PKC- β -II und des RACK1 (Abbildung 31 (C)).

4.1.8 Inkubation der EF mit zwei verschiedenen Antikörpern für myc-RACK1

In dem Artikel, der die Interaktion von FAN und RACK1 zeigte (Tcherkasowa et al., 2002), konnte eine Lokalisation von RACK1 an der Plasmamembran nach TNF-R1 Überexpression gezeigt werden. Bei diesen Versuchen wurde allerdings überexprimiertes RACK1-myc in COS-1 Zellen verwendet. In den EF FAN WT und EF FAN KO sollte auf unterschiedliche Verteilung von endogenem RACK1 und überexprimiertem RACK1-myc getestet werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich überexprimiertes RACK1 nach TNF Stimulation anders verhält als endogenes RACK1.

Nach Transfektion der EF FAN WT (Abbildung 32) und EF FAN KO (Abbildung 33) wurden die Zellen nacheinander mit einem Antikörper gegen myc (rot), der also nur überexprimiertes RACK1-myc erkennt und einem Antikörper gegen endogenes RACK1 (grün) und den entsprechenden Zweitantikörpern inkubiert. Die LSM Aufnahmen zeigten eine deutlich von einander unterschiedliche Verteilung des endogenen RACK1 und des überexprimierten RACK1. Interessanterweise zeigte sich neben der zu erwartenden Gelbfärbung (entstehend durch die gleichzeitige Erkennung

des überexprimierten RACK1 durch den RACK1-spezifischen Antikörper (grün) und den myc-spezifischen Antikörper (rot)) auch eine rote Fluoreszenz, was dafür spricht, dass Teile des überexprimierten RACK1 vom spezifischen RACK1 Antikörper nicht erkannt wurden.

Auch die TNF Stimulation veränderte an der Verteilung des endogenen RACK1 nichts. Beim überexprimierten RACK1 war nach TNF Stimulation eine deutliche Translokation in den Zellkern zuerkennen (Abbildung 32 (B), Abbildung 33 (B)), nicht aber an die Plasmamembran. Die Beobachtung, dass eine Translokation des endogenen RACK1 an die Plasmamembran nicht nachgewiesen werden konnte, lag also nicht an einer zu geringen Expression des endogenen RACK1.

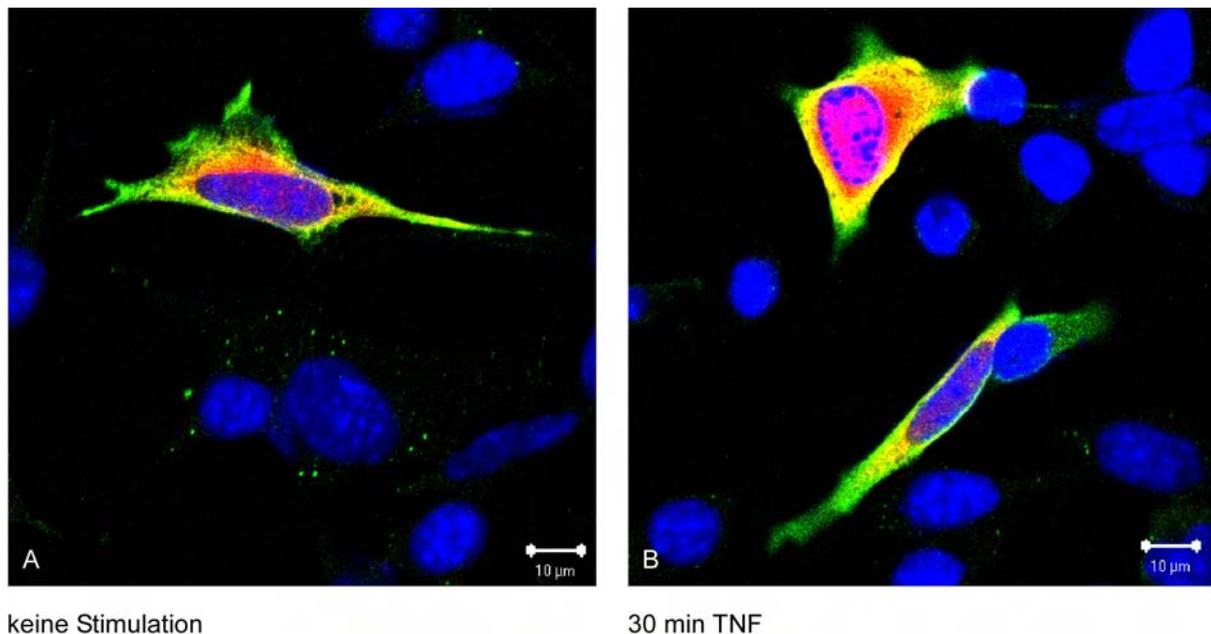


Abbildung 32: EF FAN WT: Darstellung von endogenen und transfiziertem RACK1 mit spezifischen Antikörpern

3,5 x 10⁴ Zellen der EF FAN WT wurden auf CS ausgesät, adhären gelassen und mit einem RACK1-myc Konstrukt transfiziert. Endogenes RACK1 wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:200, RT, 1 h) und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α -Maus IgM FITC (grüne Fluoreszenz) 1:1000, 1 h, 37°C). Zusätzlich wurde ein spezifischer Antikörper gegen myc (1:200, 4°C über Nacht) verwendet und mit einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper (α -Maus IgG-TRITC (rote Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C) nachgewiesen. Die Kerne wurden zur besseren Erkennung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gefärbt.

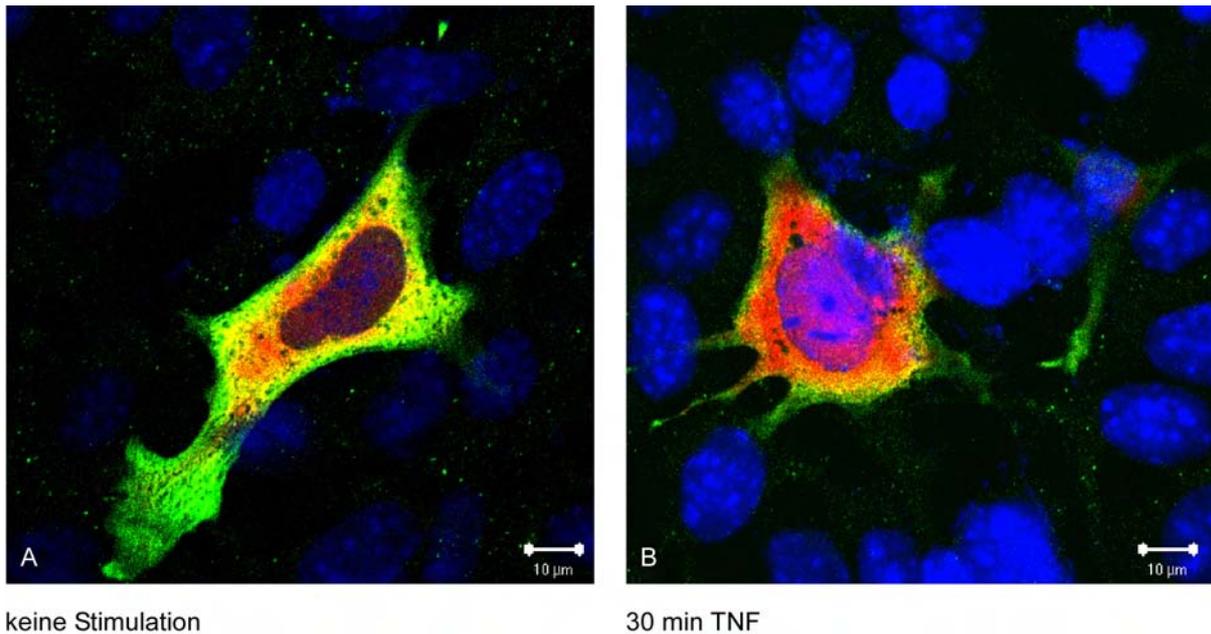


Abbildung 33: EF FAN KO: Darstellung von endogenen und transfiziertem RACK1 mit spezifischen Antikörpern

Die Durchführung erfolgte wie bei Abbildung 32, es wurden allerdings EF FAN KO als Zelllinie verwendet.

4.2 KOLOKALISATION VON AKTIN UND RACK1

Da in einigen Präparaten der Zwei-Antikörper-Färbungen von PKC und RACK1 eine deutlich fädige Anordnung des RACK1 zu erkennen war, und auch für WD Repeat-Proteine (Buensuceso et al., 2001; Brandt et al., 2002; Cox et al., 2003), bzw. für die PKC (Brandt et al., 2002) eine räumliche Assoziation mit Aktin beschrieben ist, sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von FAN einen Einfluss auf die Assoziation von RACK1 und Aktin hat.

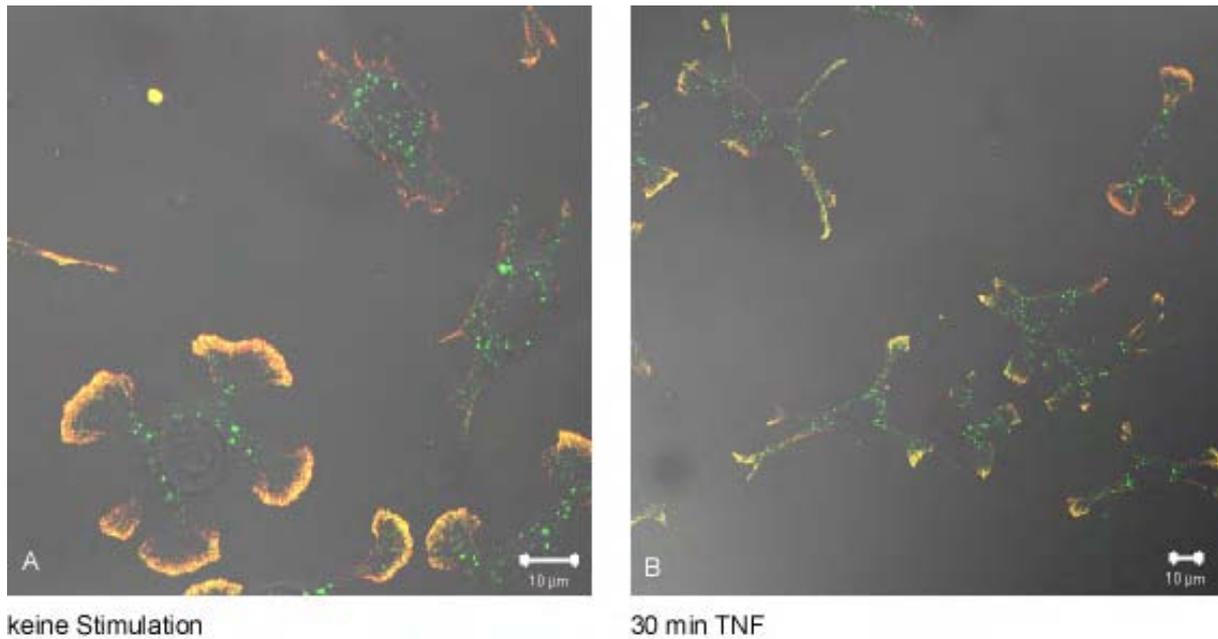
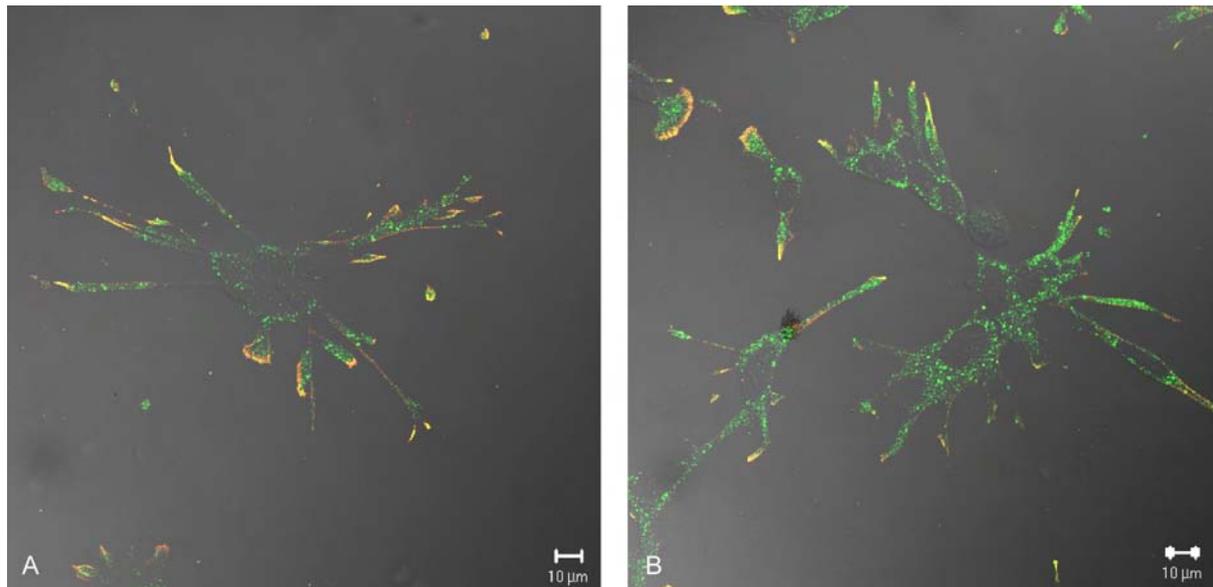


Abbildung 34: EF FAN WT: Darstellung der Proteine RACK1 und Aktin durch spezifische Antikörper

$3,5 \times 10^4$ Zellen der EF FAN WT wurden auf CS ausgesät und adhären gelassen. Am nächsten Tag wurde mit Medium (A), oder für 30 min mit TNF (100 ng/ml) (B) stimuliert. RACK1 wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:200, RT, 1 h) und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α -Maus IgM FITC (grüne Fluoreszenz) 1:1000, 1 h, 37°C). Aktin wurde mit einem spezifischen Antikörper (1:50, 1 h, RT) und einem Rhodamin gekoppelten Zweitantikörper (α -Ziege-Rhodamin (rote Fluoreszenz) 1:75, 1 h, 37°C) nachgewiesen.

In den unstimulierten EF FAN WT (Abbildung 34 (A)) zeigte sich eine punktige Verteilung von RACK1 (grün) über das gesamte Zytosol und eine membranassoziierte Verteilung in den Ausläufern. Aktin (rot) ließ sich hauptsächlich in den Ausläufern der Zelle nachweisen. In diesen war ebenfalls eine deutliche Kolo-kalisation der beiden Proteine zu erkennen, welche sich allerdings auf die Membranen der Ausläufer beschränkte. An den Membranen, die nicht zu den Ausläufern gehören, war keins der Proteine detektierbar.

Nach TNF Stimulation (Abbildung 34 (B)) sollte eine Rekrutierung von FAN an den membranständigen TNF-Rezeptor erfolgen, und damit auch eine Umverteilung von RACK1. In diesen Präparaten war allerdings eine morphologische Veränderung der Zellen zu sehen. Sie nahmen eine deutlich lang gestrecktere Form an, die Verteilung der Proteine und die daraus resultierenden Kolo-kalisation und eine mögliche Interaktion wurde weniger.



keine Stimulation

30 min TNF

Abbildung 35: EF FAN KO: Darstellung der Proteine RACK1 und Aktin durch spezifische Antikörper

Die Durchführung erfolgte wie bei Abbildung 34, es wurden jedoch EF FAN KO als Zellen verwendet

Die EF FAN KO wiesen eine morphologisch andere Form auf als die WT Zellen, allerdings war die Verteilung von RACK1 (grün) und Aktin (rot) ähnlich. RACK1 war in unstimulierten Zellen (Abbildung 35 (A)) in punktiger Verteilung im gesamten Zytosol zu erkennen und in den Ausläufern an der Membran. Aktin sah man nur an der Membran in den Ausläufern. Dadurch ergab sich auch hier eine Kolokalisation von Aktin und RACK1, die sich auf die Membranen der Ausläufer beschränkt und nicht an anderen Membranen zu sehen war.

Nach TNF Stimulation (Abbildung 35 (B)) änderte sich auch hier nur die Morphologie der Zelle geringfügig. Sie erschien ein wenig lang gestreckter, die Kolokalisation von Aktin und RACK1 in den Ausläufern nahm ab, aber es war keine deutliche Veränderung zu den unstimulierten Zellen zu erkennen. Da der Unterschied in den EF FAN WT und den EF FAN KO nach der TNF Stimulation nicht sehr gravierend ist, scheint FAN keinen Einfluß auf die Verteilung von Aktin zu haben.

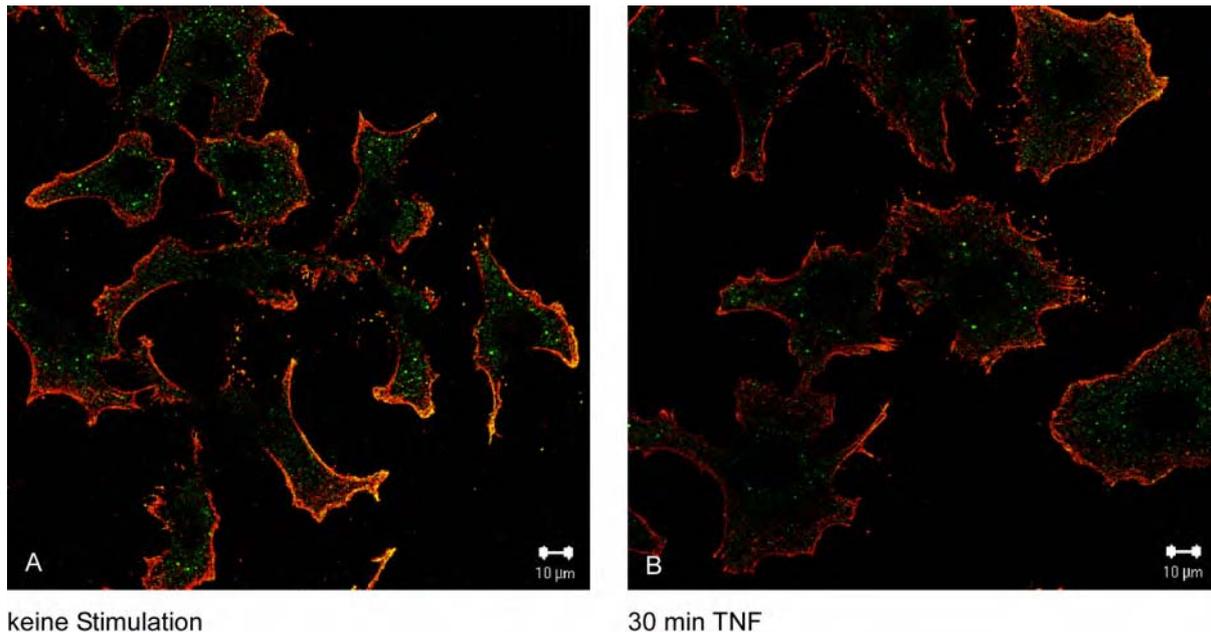


Abbildung 36: HeLa: Darstellung der Proteine RACK1 und Aktin durch spezifische Antikörper

Die Durchführung erfolgte wie bei Abbildung 34, nur unter Verwendung von 5×10^4 HeLa-Zellen pro CS.

Um einen Vergleich zu den murinen Zellen zu haben, wurden die gleichen Färbungen in humanen HeLa-Zellen durchgeführt.

Auch hier war in den unstimulierten Zellen (Abbildung 36 (A)) eine punktige RACK1 (grün) Verteilung im Zytoplasma zuerkennen und die Anwesenheit von RACK1 an der Zellmembran. Aktin (rot) war auch hier hauptsächlich membranassoziiert nachweisbar. Die daraus resultierende Kolo-kalisation von Aktin und RACK1 war hier im Unterschied zu den murinen Zellen allerdings an der gesamten Zellmembran zu sehen und nicht nur auf die Ausläufer beschränkt.

Nach TNF Stimulation (Abbildung 36 (B)) änderte sich an der Kolo-kalisation der beiden Proteine nichts, wobei die Intensität der RACK1 Färbung abgenommen hatte. Im Unterschied zu den murinen Zellen nahmen die HeLa-Zellen nach der Stimulation mit TNF keine lang gestreckte Form an.

4.3 *TRANSLOKATION VON RACK1 IN DEN ZELLKERN*

4.3.1 RACK1 transloziert nach TNF Stimulation in den Zellkern

Bei den Aufnahmen der Kolo-kalisation von RACK1 und PKC- β -II zeigte sich immer wieder eine Kolo-kalisation von RACK1 mit der durch DAPI-angefärbten DNA, die sich nach TNF Stimulation noch verstärkte (Abbildung 32, Abbildung 33). Von der Gruppe um Ron (He et al., 2002; Vagts et al., 2003) ist nach Ethanolstimulation eine Translokation von RACK1 in den Kern beschrieben worden. Diese Translokation findet unabhängig von der PKC- β -II statt, die PKC wird dabei also nicht aktiviert.

Nach Stimulation mit TNF war RACK1 im Kern zu sehen, dies war unabhängig davon, ob es sich um EF FAN WT oder EF FAN KO handelt. Bei überexprimiertem RACK1 war diese Translokation besonders deutlich zu sehen (Abbildung 32, Abbildung 33), aber auch endogenes RACK1 translozierte nach TNF in den Kern (Daten nicht gezeigt). Die Daten aus der Immunfluoreszenz gehen damit einher, dass nach TNF Stimulation keine Aktivierung der PKC stattfindet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass RACK1 nach Translokation in den Kern nicht mehr zur Stabilisierung der aktivierten PKC an der Plasmamembran zur Verfügung steht.

4.3.2 Nach Fraktionierung ist im Western-Blot keine Translokation von RACK1 in den Zellkern zu erkennen

Nachdem die Translokation von RACK1 in den Kern nach TNF-Stimulation in der IF gesehen wurde, sollte in einem anderen System diese Translokation auch nachgewiesen werden. Auch die Gruppe um Ron konnte eine Translokation von RACK1 in den Kern nachweisen, hier allerdings nach Stimulation mit Ethanol. Ethanol wurde daher als Positivkontrolle verwendet.

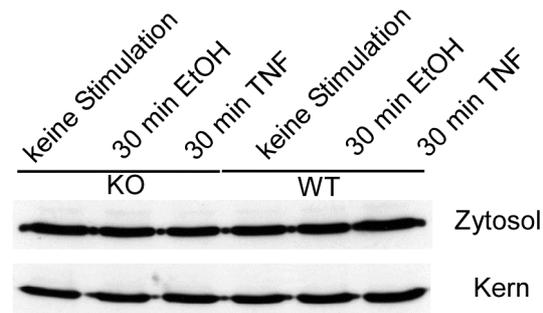


Abbildung 37: Stimulation der EF FAN WT und EF FAN KO mit TNF bzw. Ethanol und anschließende Fraktionierung in Zytosol- und Kernfraktion

EF FAN WT und EF FAN KO wurden für 30 min mit TNF (100 ng/ml) oder Ethanol (100 mM) stimuliert und anschließend lysiert. Die Lysate werden in Zytosol- und Kernfraktion aufgetrennt, über Western-Blot aufgetrennt und mit anti-RACK1 Antikörper inkubiert.

Nach der Stimulation der Zellen mit TNF bzw. Ethanol und der anschließenden Fraktionierung wurden die Lysate über Western-Blot aufgetrennt und mit anti-RACK1 Antikörper inkubiert (Abbildung 37). Weder in der Zytosolfraction noch in der Kernfraktion war ein Unterschied in der Bandenstärke zu erkennen. Dabei machte es keinen Unterschied, ob EF FAN WT oder EF FAN KO stimuliert werden. Auch die Positivkontrolle mit Ethanol zeigt keine vermehrte Expression von RACK1 im Kern oder eine Abnahme von RACK1 im Zytosol. Dieses Phänomen, dass die Translokation von RACK1 in den Zellkern nach TNF Stimulation in der IF zu sehen ist, im Western-Blot allerdings nicht, lässt sich damit erklären, dass nur ein sehr geringer Anteil des RACK1 in den Zellkern transloziert. Dies ist in der IF darstellbar, im Western-Blot jedoch nicht.

4.4 PHOSPHORYLIERUNG VON RACK1 DURCH TNF

4.4.1 Nach Stimulation mit TNF ist keine vermehrte Phosphorylierung von RACK1 zu erkennen

Nach Aktivierung verschiedener Protein Kinasen C war eine vermehrte Interaktion der Protein-Tyrosin-Kinase Src mit RACK1 beschrieben, die durch die Phosphorylierung von RACK1 noch verstärkt wurde (Chang et al., 2001). Hier sollte nun untersucht werden, ob auch die Stimulation mit TNF

eine Phosphorylierung von RACK1 und damit die Interaktion mit der Src Kinase bewirkt. Dies könnte einen neuen Hinweis auf einen TNF-vermittelten Signalweg geben.

Zum Nachweis von phosphoryliertem RACK1 wurden die Zellen entsprechend stimuliert und anschließend auf der Platte lysiert. Die Lysate wurden mit anti-pTyr (A) bzw. anti-RACK1 (B) versetzt und die Komplexe mit Sepharose gefällt (Abbildung 38).

Nach Fällung der am Tyrosin phosphorylierten Proteine wurde der Blot mit anti-RACK1 inkubiert. Es zeigte sich eine Bande (A), die allerdings keine Zu- oder Abnahme in der Stärke nach Stimulation aufweist. Auch war kein Unterschied zwischen den EF FAN WT und EF FAN KO zu erkennen.

Nach Fällung mit anti-RACK1 und Inkubation mit dem anti-pTyr war keine Bande zu erkennen (B), die Kontrolle der IP zeigte allerdings eine deutliche RACK1 Bande (D), die Fällung des RACK1 hatte also funktioniert.

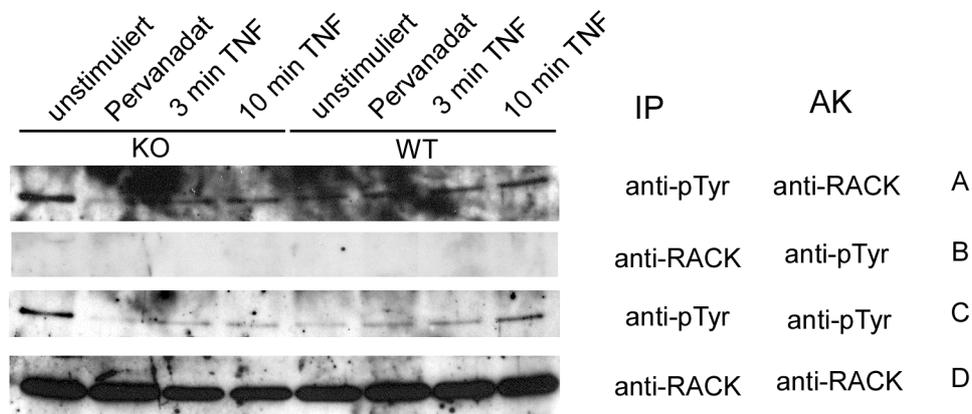


Abbildung 38: In murinen EF ist nach IP keine Phosphorylierung von RACK1 nach Stimulation mit TNF zu erkennen

EF FAN WT und EF FAN KO wurden für die angegebenen Zeiten mit TNF stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Pervanadat stimuliert. Nach Fällung des Antikörper-Proteinkomplexes wurden die Lysate aufgetragen und die Blots mit den angegebenen Antikörpern inkubiert (A und B). Als Kontrolle auf Fällung der Proteine wurden die Blots nachträglich mit den IP Antikörpern inkubiert (C und D).

Um einen Vergleich zu den Daten aus der Ko-IP zu bekommen, wurden Totallysate der EF FAN WT (Abbildung 39) und EF FAN KO (Abbildung 40) aufgetragen und mit anti-pTyr inkubiert (A). Die anschließende Kontrolle

mit anti-RACK1 (B) zeigte eine gleichmäßige RACK1 Bande, bei der Bande auf der gleichen Höhe im p-Tyr Blot zeigten sich keine Unterschiede in der Intensität ohne oder mit Stimulation. Die Kontrolle der Phosphorylierung mit Pervanadat zeigte eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung, allerdings nur sehr wenig auf der Höhe des RACK1. Durch Stimulation mit TNF ist also keine Phosphorylierung von RACK1 zu erkennen, dies bedeutet auch keine vermehrte Interaktion von RACK1 mit den src-Kinasen.

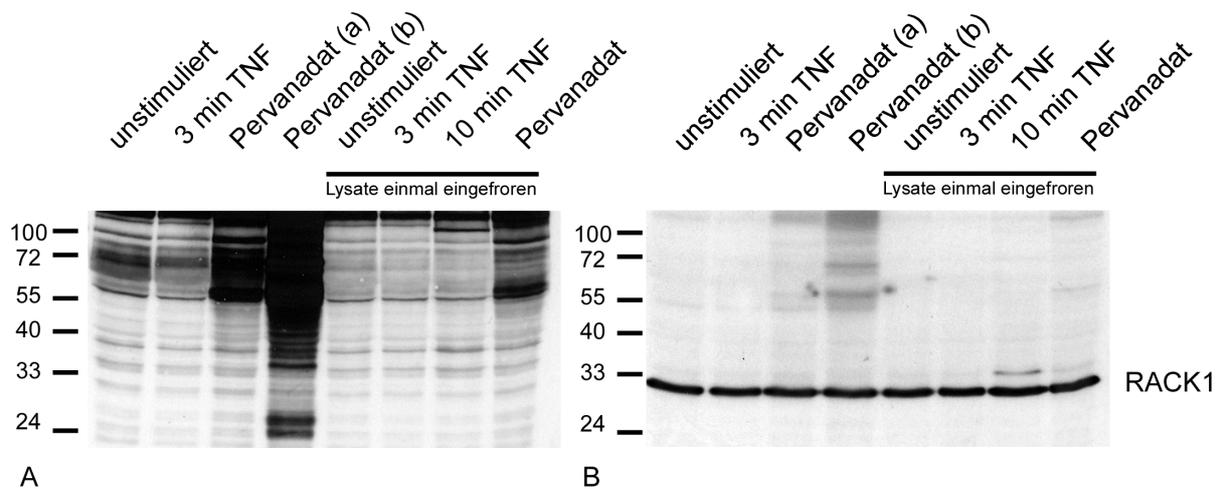


Abbildung 39: In EF FAN WT führt TNF Stimulation nicht zu einer vermehrten RACK1 Phosphorylierung

EF FAN WT wurden für 3 min mit TNF stimuliert, als Positivkontrolle diente eine Pervanadatlösung. Bei (a) wurde eine Pervanadatlösung direkt auf der Platte zu den Zellen gegeben (analog zur TNF Stimulation), bei (b) wurden die Zellen vorher abgelöst und dann in Suspension für 30 sec stimuliert. Der Blot (A) zeigt die Banden von Totallysaten, die mit einem anti-pTyr Antikörper inkubiert wurden, bei (B) wurde der Blot als Kontrolle nachträglich mit anti-RACK1 Antikörper inkubiert. Die eingefrorenen Lysate entsprechen den Banden aus Abbildung 38.

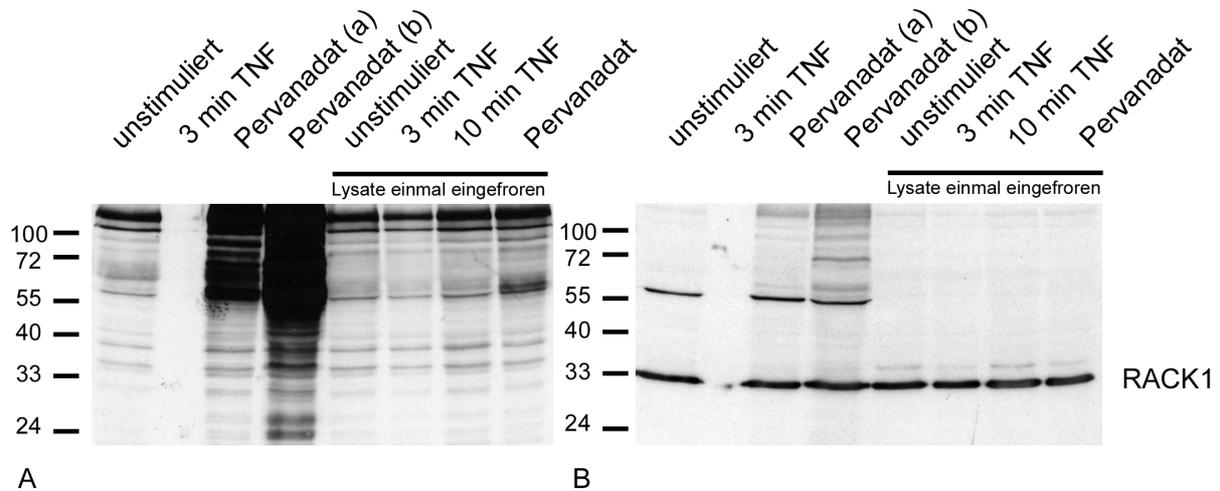


Abbildung 40: In EF FAN KO führt TNF Stimulation nicht zu einer vermehrten RACK1 Phosphorylierung

Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 39, als Zellen wurden EF FAN KO verwendet.

4.5 INTERAKTION VON FAN UND RACK1

Für das bessere Verständnis der Interaktionen von FAN und RACK1 wurden mit verschiedenen FAN Konstrukten und RACK1 Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Die FAN Konstrukte stellte freundlicherweise die Arbeitsgruppe Tong zur Verfügung (Jogl et al., 2002) (Abbildung 41).

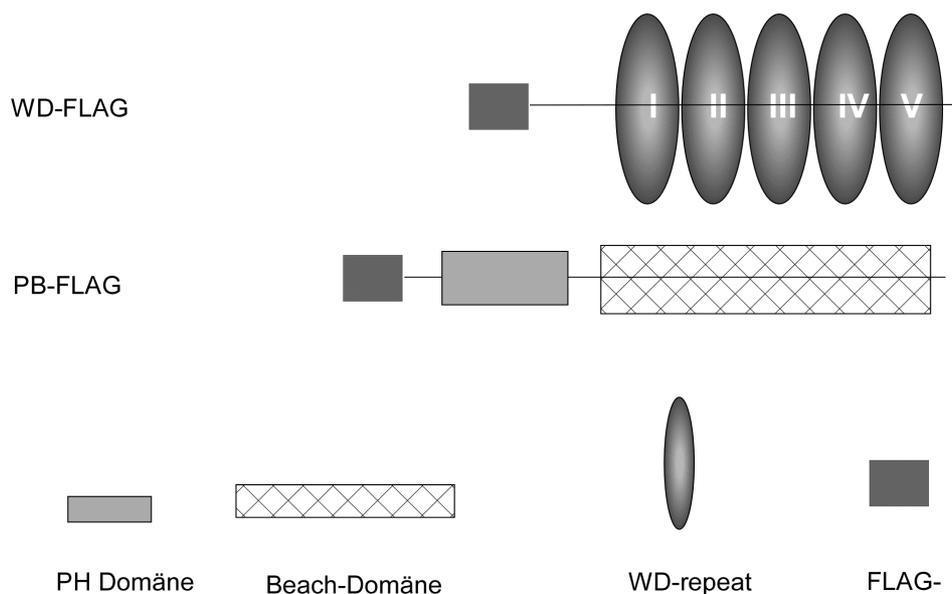


Abbildung 41: FAN Deletionsmutanten

Die von der Arbeitsgruppe Tong zur Verfügung gestellten FAN-Deletionsmutanten enthalten nur die WD-Repeats von FAN mit einem FLAG-Tag (auch WD-FLAG genannt) oder nur die PH und die BEACH-Domäne mit einem FLAG-Tag, auch PB-FLAG genannt.

4.5.1 RACK1 und die WD-Domäne von FAN interagieren

Nachdem bereits die Gruppe um Adam die Interaktion des WD-Repeats von FAN mit RACK1 dargestellt hatte (Tcherkasowa et al., 2002), sollte die Interaktion der WD-Domäne von FAN mit RACK1 mit anderen Konstrukten genauer kartiert werden. Es wurden 293 HEK Zellen kotransfiziert mit einem FAN-WD-FLAG-Konstrukt (WD-FLAG) und RACK1-myc.

Nach Fällung des überexprimierten RACK1-myc und dem anschließenden Western-Blot erfolgte die Inkubation mit einem anti-FLAG Antikörper zur Detektion des WD-FLAG (Abbildung 42 (B)). Hierbei zeigte sich eine Bande auf der Höhe des WD-FLAG, die sich nach Stimulation mit TNF nicht in der Intensität verändert. Als Negativkontrolle diente die Fällung von RACK1-myc aus untransfizierten 293 HEK Zellen, hier war die Bande nicht zu sehen. Weiterhin wurde die Fällung des RACK1-mycs mit einem Antikörper gegen myc geprüft (Daten nicht gezeigt).

Als Gegenkontrolle wurde das WD-FLAG mit einem FLAG-Antikörper gefällt und nach dem Western-Blot auf Ko-Fällung des RACK1 mit einem anti-myc Antikörper inkubiert (Abbildung 42 (A)). Hier zeigte sich keine Bande auf der Höhe des RACK1, auch durch die Stimulation mit TNF änderte sich nichts. Als Kontrolle wurde die Fällung des WD-FLAGs mit einem FLAG-Antikörper überprüft (Daten nicht gezeigt).

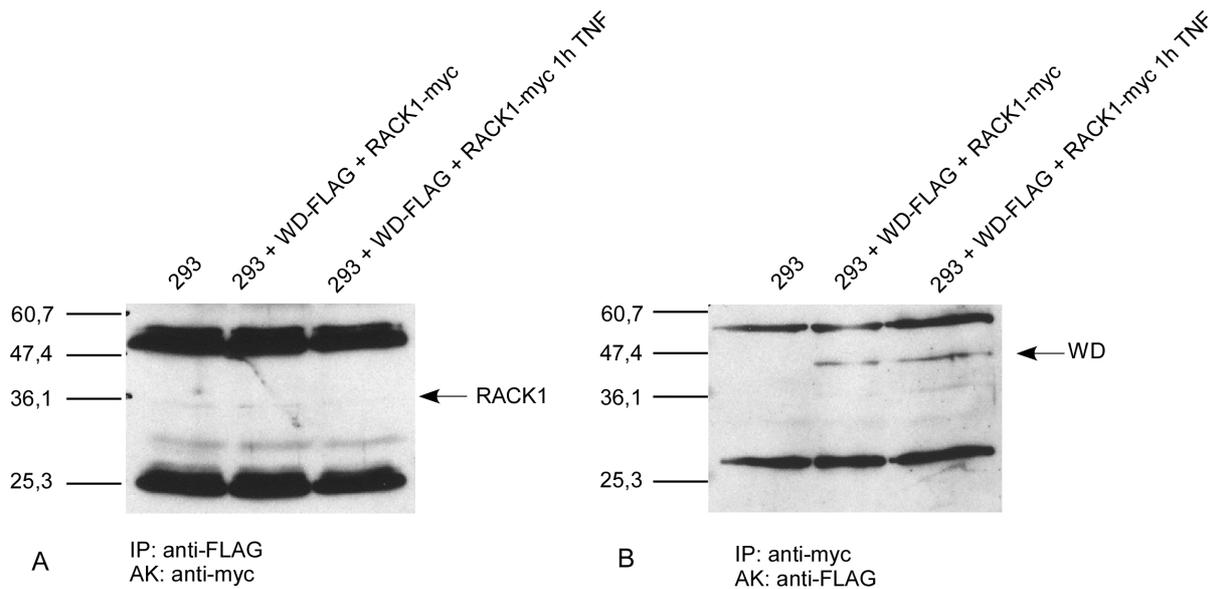


Abbildung 42: Ko-Immünpräzipitation der FAN Deletionsmutante WD-FLAG mit RACK1-myc

293 HEK Zellen wurden kotransfiziert mit RACK1-myc und WD-FLAG. Nach Fällung des RACK1 mit myc-Antikörper (B) bzw. WD-FLAG mit FLAG-Antikörper (A) (jeweils 1 mg Protein und 2 µg Antikörper) wurden nach Trennung über SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot die myc-Fällung mit dem anti-FLAG Antikörper inkubiert (B), die FLAG-Fällung mit dem anti-myc Antikörper (A).

4.5.2 RACK1 und die PH und BEACH Domäne von FAN interagieren

Als nächstes sollte die Interaktion der PH-BEACH-Domäne von FAN und RACK1 überprüft werden, da von verschiedenen Gruppen Interaktion von PH Domänen mit WD-Repeat Proteinen beschrieben wurden (Rodriguez et al., 1999; Koehler et al., 2001a). Auch das PH-BEACH-FLAG Konstrukt (PB-FLAG) stellte freundlicherweise die Arbeitsgruppe Tong zur Verfügung (Jogl et al., 2002)(Abbildung 41).

Nach Kotransfektion der 293 HEK Zellen mit dem PH-BEACH-FLAG Konstrukt (PB-FLAG) und RACK1-myc wurde das RACK1-myc mit einem anti-myc Antikörper gefällt (Abbildung 43 (B)). Der Western-Blot wurde mit anti-FLAG Antikörper inkubiert. Auf der Höhe des PB-FLAGs war eine Bande zu sehen, die in untransfizierten 293 HEK nicht zu erkennen war, durch Stimulation mit TNF änderte sich die Intensität der Bande nicht. Als Kontrolle wurde der Blot anschließend mit einem myc-Antikörper auf Fällung des RACK1-myc kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

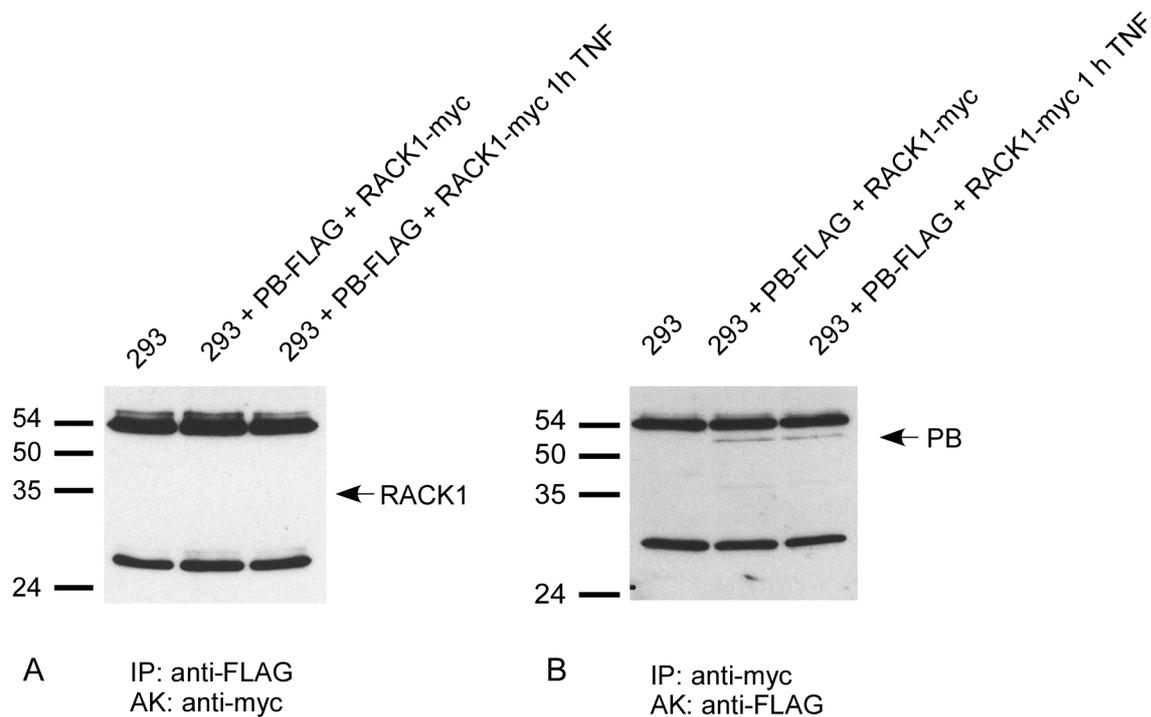


Abbildung 43: Ko-Immünpräzipitation der FAN Deletionsmutante PB-FLAG mit RACK1-myc

293 HEK Zellen wurden kotransfiziert mit RACK1-myc und PB-FLAG. Nach Fällung des RACK1 mit myc-Antikörper (B) bzw. PB-FLAG mit FLAG-Antikörper (A) (jeweils 1 mg Protein und 2 µg Antikörper) wurden nach Trennung über SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot die RACK1-myc Fällung mit dem anti-FLAG Antikörper inkubiert (B), die FLAG-Fällung mit dem anti-myc Antikörper (A).

Nach Fällung derselben Lysate mit anti-FLAG Antikörper und Inkubation des Western-Blots mit anti-myc Antikörper war auf Höhe des RACK1 keine Bande zu erkennen, auch die TNF-Stimulation änderte daran nichts (Abbildung 43 (A)). Auch hier wurde zur Kontrolle die Fällung des PB-FLAGs mit anti-FLAG überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion des FAN-PB_FLAG mit RACK1 ist also nur nach Fällung des RACK1 zu erkennen.

Die Interaktionen der FAN-Konstrukte und RACK1 lassen sich also nur nach Fällung des RACK1 darstellen, die dargestellten Interaktionen müssen also noch weitergehend verifiziert werden.

4.5.3 Interaktionen verschiedener Deletionsmutanten von RACK1 mit FAN

Für die Untersuchung der Interaktionen von FAN und RACK1 sollte genauer detektiert werden, wie viele der WD-Repeats von RACK1 für die Interaktion nötig sind. Dafür wurden verschiedene Deletionsmutanten von RACK1 mittels PCR hergestellt. Die Konstrukte sind graphisch in Abbildung 44 dargestellt.

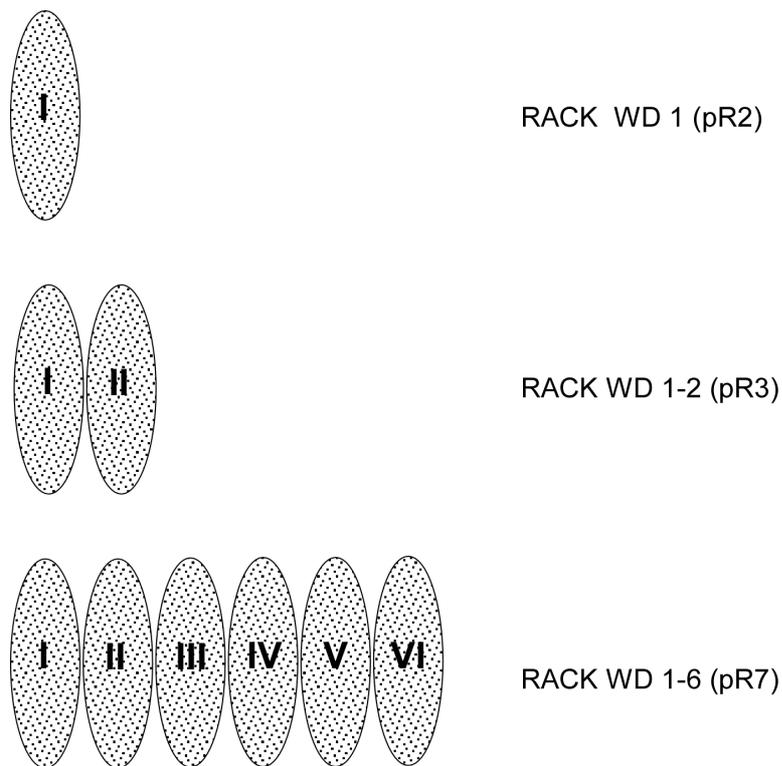


Abbildung 44: RACK1 Deletionsmutanten

4.5.3.1 Herstellung von Deletionsmutanten von RACK1

Für die Deletionsmutanten RACK1 WD1, RACK1 WD 1-2 und RACK1 WD 1-6 wurde das komplette RACK1 mittels PCR verkürzt und über die Schnittstellen Bam HI und Sal I (RACK1 WD1 und RACK1 WD 1-2) bzw. Eco RI und Xho I (RACK1 WD 1-6) in den Vektor plex 202 (Abbildung 11) ligiert. Dafür wurde die PCR von RACK1 mit folgenden Primern (Tabelle 14, Tabelle 15, Tabelle 16) durchgeführt.

Tabelle 14: PCR Primer RACK1 WD1

Primername	Sequenz
RACKBamfo	CTC GGA TCC ATG ACT GAG CAG ATG ACC CTT
RACKdelWD2	CAG CTG TTA CCG CAG AGC ACG CTG TGG AAT

Tabelle 15: PCR Primer RACK1 WD 1-2

Primername	Sequenz
RACKBamfo	CTC GGA TCC ATG ACT GAG CAG ATG ACC CTT
RACKdelWD3	CAG CTG TTA CAC AAA TCG CCT CGT GGT GGT

Tabelle 16: PCR Primer RACK1 WD 1-6

Primername	Sequenz
RACK-lex5'	CTC GAA TTC ATG ACT GAG CAG ATG
RACKΔ7 Sal	GTC GAC TTA GCT GGT ACT GAT AAC TTC

Nach der Ligation in den Vektor plex 202 wurde die Richtigkeit der einzelnen Sequenzen durch Sequenzierung überprüft.

4.5.4 Untersuchung der Interaktionen der RACK1-Deletionsmutanten im Hefe „Two-Hybrid“ System

Für die Untersuchung der Interaktion der RACK1 Deletionsmutanten mit den entsprechenden FAN-Konstrukten (Abbildung 45 (A + B)), wurden die Hefen zuerst mit den RACK1-Deletionsmutanten im Vektor plex 202 (Abbildung 11, Abbildung 44) und den bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen Konstrukten (Abbildung 45) im Vektor 4-5 stuffer (Abbildung 12) transfiziert und danach auf UHW-Glc⁺ Platten (Tabelle 12) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 2 Tage. Die Kolonien wurden dann in Flüssigmedium inkubiert (UHW-Glc⁺) und zur Prüfung auf Interaktion der transfizierten Proteine auf UHWL-X-Gal⁺ Gal⁺ Platten (Tabelle 12) bei 37°C bis zur Blaufärbung inkubiert. Die Expression der Proteine im Vektor plex 202 wurde durch Auftrennen der Lysate über SDS-PAGE und

anschließendem Western-Blot mit einem α -lex Antikörper überprüft (Daten nicht gezeigt).

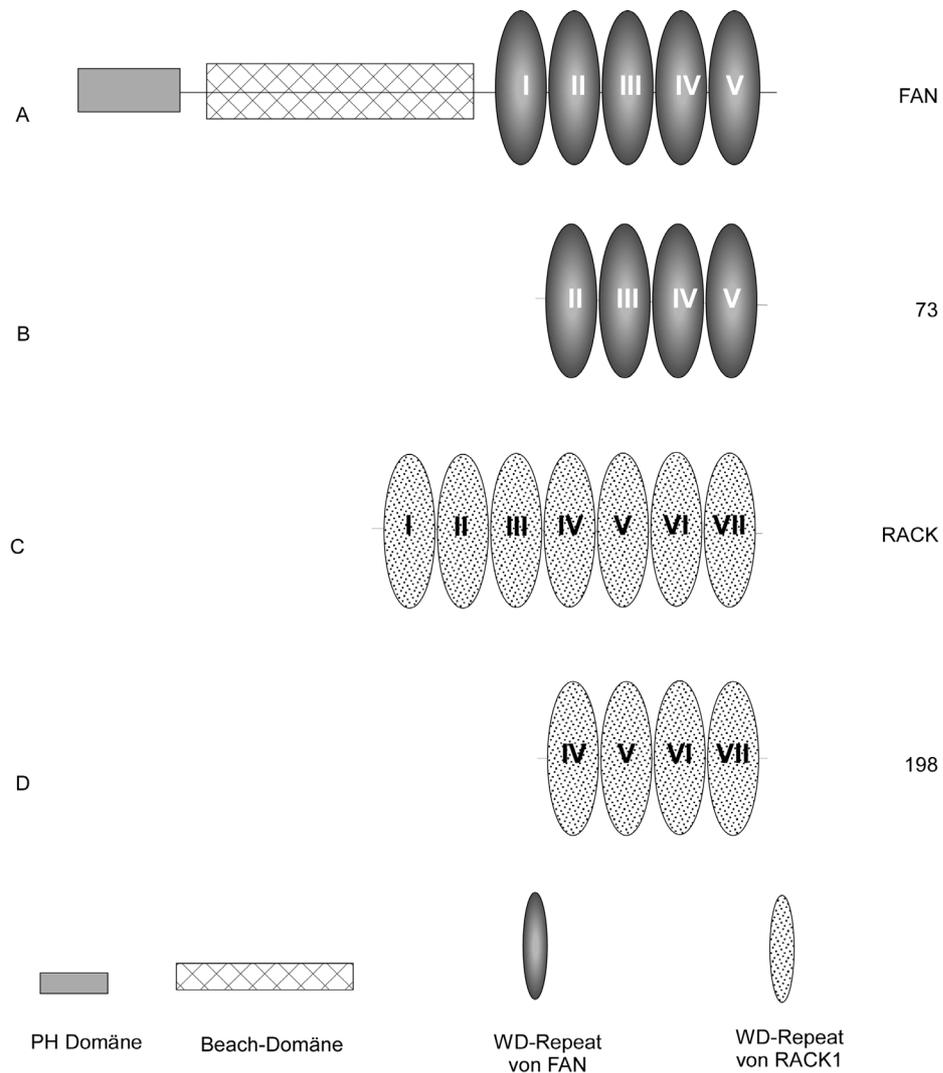


Abbildung 45: Deletionsmutanten von FAN und RACK1

Die Abbildungen A und B zeigen das volle-Länge-FAN (A) bzw. das dominant-negative FAN (B). C und D zeigen das volle-Länge-RACK1 (C) oder die letzten vier WD-Repeats von RACK1 (D).

4.5.4.1 FAN und RACK1 WD1 interagieren nicht

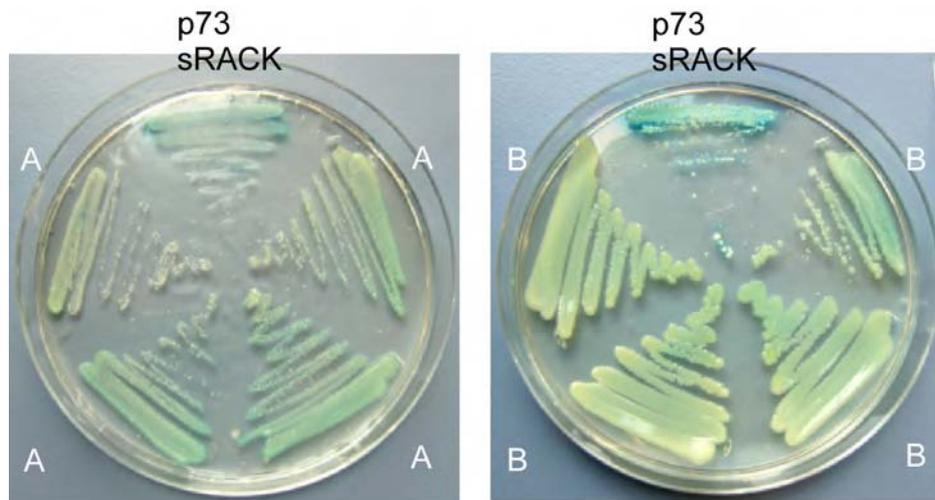


Abbildung 46: Test auf Interaktion von FAN und RACK1 WD1

Der Hefestamm JK103 wurde mit den Konstrukten pR2 + stu (A) oder pR2 + sFAN (B) transfiziert, die Hefen wurden auf UHWL- Gal⁺ X-Gal⁺ Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente mit p73 und sRACK transfizierte Hefe. Anschließend wurde auf Blaufärbung getestet.

Nach Kotransfektion der Deletionsmutante RACK1 WD1 im Vektor plex 202 (pR2) (Abbildung 44) mit FAN im Vektor 4-5 stuffer (sFAN) (Abbildung 45 (A)) wurde auf Interaktion, sichtbar durch Blaufärbung, getestet (Abbildung 46(B)). Als Positivkontrolle diente eine mit p73 und sRACK (Abbildung 45) transfizierte Hefe, diese zeigt die erwartete Blaufärbung. Die mit pR2 und sFAN transfizierten Hefen verfärbten sich nicht blau, es liegt also keine Interaktion der beiden Proteine vor. Als Negativkontrolle diente die Kotransfektion von pR2 mit Vektor 4-5 stuffer (stu) (Abbildung 46(A)). Die so transfizierten Hefen zeigen, wie erwartet, keine Blaufärbung im Vergleich zur Positivkontrolle.

4.5.4.2 FAN und RACK1 WD 1-2 interagieren nicht

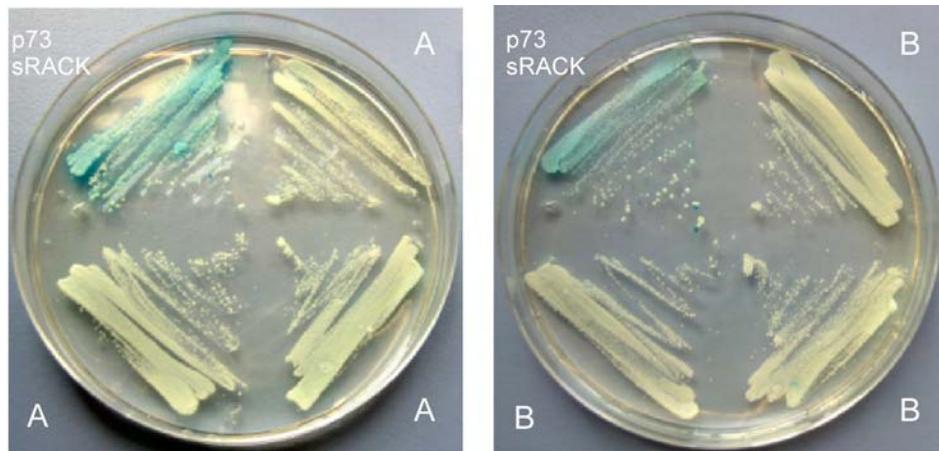


Abbildung 47: Test auf Interaktion von FAN und RACK1 WD 1-2

Die Durchführung erfolgte wie bei Abbildung 46, nur mit den Konstrukten pR3 + stu (A) oder pR3 + sFAN (B)

Für die Kontrolle der Interaktion eines zwei WD-Repeats enthaltenden RACK1 wurde der Hefestamm JK103 kotransfiziert mit der Deletionsmutante RACK1 WD 1-2 im Vektor plex 202 (pR3) (Abbildung 44) und FAN im Vektor 4-5 stuffer (Abbildung 45, Abbildung 47 (B)). Nach Inkubation der Hefen bei 30°C ist auch hier keine Blaufärbung zu erkennen, die Proteine interagieren also auch dann nicht, wenn RACK1 noch zwei seiner WD-Repeats besitzt. Als Negativkontrolle diente auch hier die mit pR3 und Vektor 4-5 stuffer (stu) kotransfizierte Hefe, die weiß bleibt (Abbildung 47 (A)). Die Positivkontrolle ist ebenfalls die mit p73 und sRACK kotransfizierte Hefe, die sich durch die Interaktion der Proteine blau verfärbt.

4.5.4.3 FAN und RACK1 WD 1-6 interagieren nicht



Abbildung 48: Test auf Interaktion in der Hefe: pR7 und verschiedene Konstrukte

Der Hefestamm JK103 wurde mit den Konstrukten pR7 + s73 (B), pR7 + sFAN (C) oder pR7 und s198 (D) transfiziert. Als Positivkontrolle diente mit p73 und sRACK transfizierte Hefe (A). Als Negativkontrolle diente Hefe kotransfiziert mit pR7 und stu (E). Die Hefen wurden auf UHWL- Gal⁺ X-Gal⁺ Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde auf Blaufärbung getestet.

Für die Kontrolle auf Interaktion von RACK1 WD 1-6 wurde die C-terminale Deletionsmutante im Vektor plex 202 (pR7) mit sFAN kotransfiziert und auf Blaufärbung getestet (Abbildung 48 (C)). Auch das verkürzte FAN, das nur die WD-Repeats enthält (Abbildung 45 (B)), interagiert nicht mehr mit dem verkürzten RACK WD 1-6. Die fehlende Blaufärbung zeigt, dass für die Interaktion von FAN und RACK1 das siebte WD-Repeat von RACK1 wichtig ist.

Weiter wurde getestet, ob pR7 mit einem deletierten RACK1 (s198) interagiert (Abbildung 48 (D)), da für das deletierte RACK1 eine starke Interaktion mit sich selbst beschrieben worden ist (Tcherkasowa et al., 2002). Allerdings war auch hier keine Blaufärbung und damit keine Interaktion zu erkennen.

Als Negativkontrolle diente hier auch die mit pR7 und dem Vektor 4-5 stuffer (stu) kotransfizierte Hefe (Abbildung 48 (E)), als Positivkontrolle die Blaufärbung der Hefe kotransfiziert mit p73 und sRACK (Abbildung 48 (A)).

Aus den Daten der Hefe „Two-Hybrid“ Experimente zeigt sich zusammen mit den vorherigen Daten der Arbeitsgruppe (Tcherkasowa et al., 2002), dass für die Interaktion von FAN und RACK1 die WD-Repeats 5-7 von RACK1 wichtig sind.

4.6 ÜBEREXPRESSION DER NEUTRALEN SPHINGOMYELINASE 2

Für FAN ist ein Einfluss auf die Aktivität der nSMase beschrieben worden (Tcherkasowa et al., 2002). In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob FAN und die nSMase 2 direkt miteinander interagieren.

4.6.1 Umklonierung der nSMase2 in verschiedene Vektoren

Für die Expression der neutralen Sphingomyelinase 2 in der Hefe bzw. in eukaryotischen Zellen wurde die Sequenz über PCR vervielfältigt und über Ligation in verschiedene Vektoren kloniert.

Tabelle 17: Primer für Klonierung der nSMase2 in den Vektor plex 202

Primernamen	Sequenz
NSMsalfor	GTC GAC GCA ATG GTT TTG TAC ACG ACC CCC
NSMsalrev	GTC GAC CTA TGC CTC CTC TTC CCC TGC AG

Für die Klonierung der nSMase 2 in den Vektor plex 202 für das Hefe „Two-Hybrid“ System wurde die PCR (3.5.1) mit den Primern aus Tabelle 17 durchgeführt. Die Richtigkeit und die Orientierung der Sequenz wurden über Sequenzierung kontrolliert.

Tabelle 18: Primer für Klonierung der nSMase2 in pcDNA3.1/myc-His A

Primernamen	Sequenz
nSMase2for	TCT ACC GCA ATG GTT TTG TAC ACG ACC CCC
nSMase2mor	GGT ACC TGC CTC CTC TTC CCC TGC AGA CAC

Für die Klonierung in den Vektor pcDNA3.1/myc-His A wurden die Primer aus Tabelle 18 verwendet. Die Richtigkeit der Sequenz wurde über Sequenzierung kontrolliert. Im Western-Blot entsprach die Bande der Größe der nSMase 2 von 72 kDa (Daten nicht gezeigt).

4.6.2 Überexpression der nSMase 2 in EF FAN WT und EF FAN KO

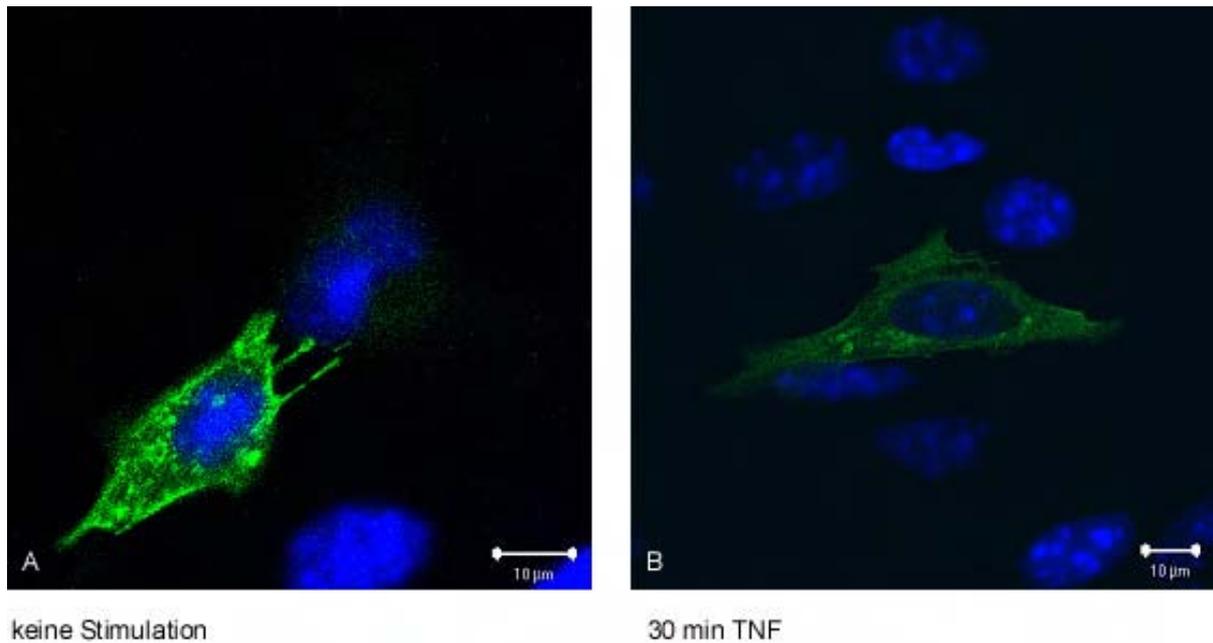


Abbildung 49: EF FAN WT transfiziert mit der neutralen Sphingomyelinase2

3,5 x 10⁴ Zellen der EF FAN WT wurden auf CS ausgesät, adhären gelassen und mit einem NSM-myc Konstrukt transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Medium (A) bzw. 30 min mit TNF (100 ng/ml) stimuliert und die NSM-myc wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen myc (1:200, RT, 1 h) und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α-Maus IgG FITC (grüne Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C). Die Kerne wurden zur besseren Erkennung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gefärbt.

Die Überexpression der nSMase2 in EF FAN WT zeigte eine zytosolische Verteilung des Proteins (Abbildung 49 (A)). Nach Stimulation mit TNF für 30 min zeigte sich eine schwache Translokation der nSMase 2 an die Membran, der größte Teil des Proteins wies aber immer noch eine zytosolische Verteilung auf (Abbildung 49 (B)).

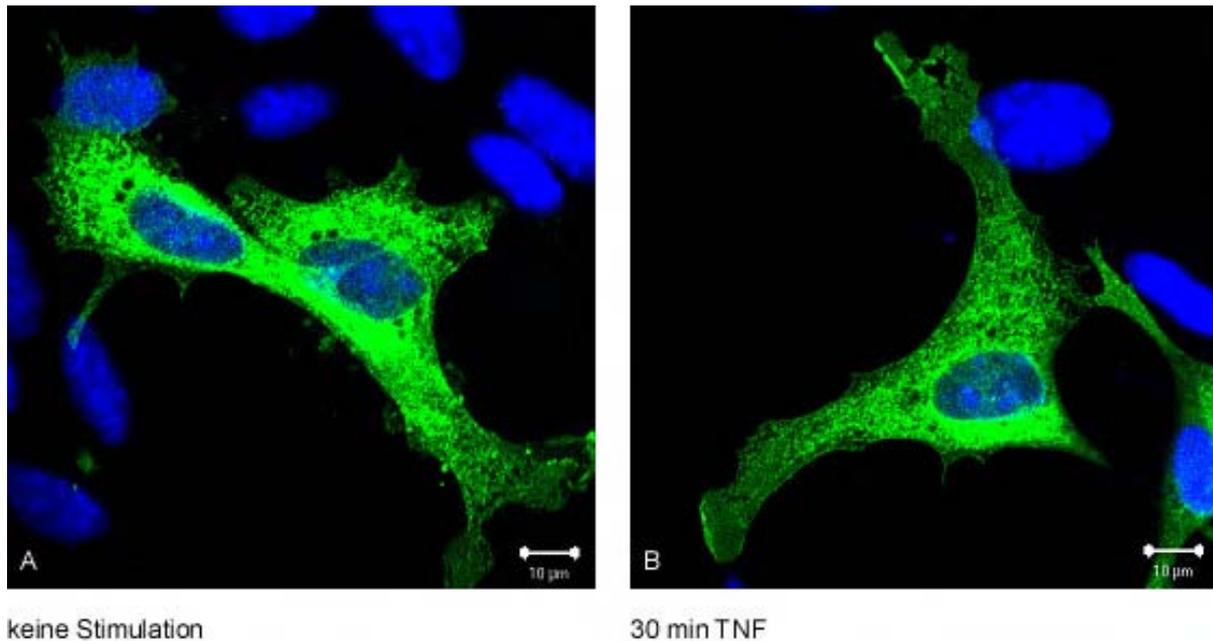


Abbildung 50: EF FAN KO transfiziert mit der neutralen Sphingomyelinase2

Die Durchführung erfolgte wie bei Abbildung 49, nur mit EF FAN KO als Zelllinie.

Auch in den EF FAN KO zeigte die nSMase 2 überexprimiert unstimuliert eine zytosolische Verteilung (Abbildung 50 (A)), auch hier war nach 30-minütiger TNF Stimulation eine leichte Translokation an die Membran zu erkennen, auch hier war weiterhin der größte Teil des Proteins zytosolisch verteilt (Abbildung 50 (B)). Diese Verteilung des überexprimierten Proteins widerspricht den Erwartungen, die von der Verteilung der nSMase als membranassoziiertes Protein vermutet werden.

4.7 SENESZENZ-ASSOZIIERTE BETA-GALAKTOSIDASE-AKTIVITÄT

4.7.1 EF FAN WT und EF FAN KO zeigen nach Transfektion mit der nSMase 2 keine Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität

Nach Transfektion mit nSMase 2 zeigten die EF FAN WT und EF FAN KO in der Immunfluoreszenz einen veränderten Phänotyp, der dem seneszenten Zellen sehr ähnlich ist. Um zu untersuchen, ob diese Veränderung durch die Überexpression der nSMase auf Seneszenz der Zellen zurückzuführen ist, wurden untransfizierte Zellen und mit der nSMase 2 im pcDNA3.1/myc-

His A transfizierte Zellen nach Fixierung für 16 h mit einem Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidasepuffer (SA- β -Gal-Puffer) bei pH 6,0 bei 37°C inkubiert. Es wurde darauf verzichtet, die transfizierten Zellen mit einem Antikörper zu markieren. Aus den Ergebnissen früherer Transfektionen unter identischen Bedingungen zeigte sich jedoch, dass die Transfektionseffizienz bei 50 % liegt, man kann also davon ausgehen, dass jede zweite Zelle die nSMase 2 überexprimiert (Daten nicht gezeigt).

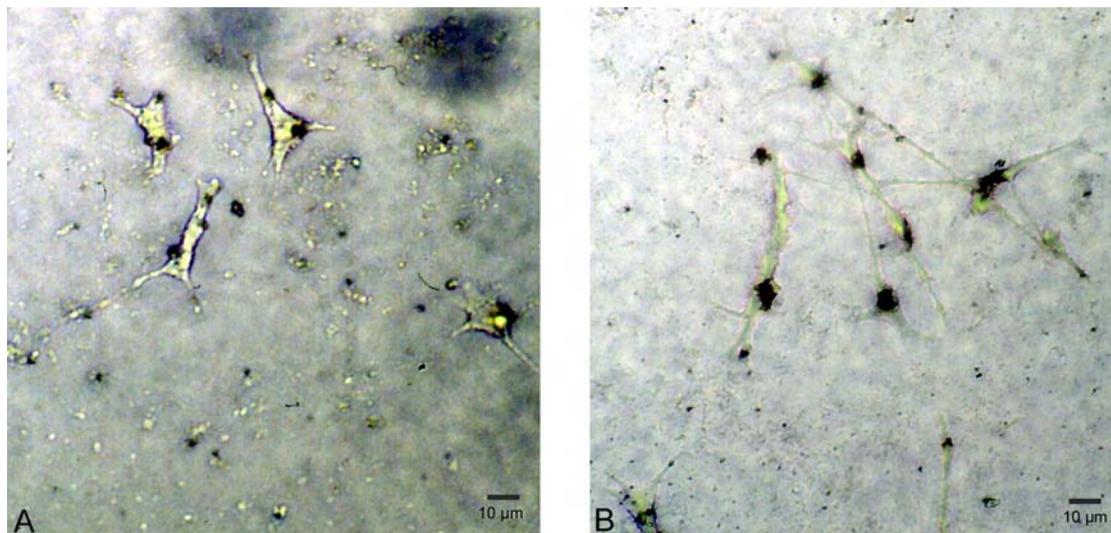


Abbildung 51: EF FAN WT inkubiert mit SA- β -Gal Puffer

EF FAN WT wurden untransfiziert (A) bzw. mit NSM-myc transfiziert (B) und nach Fixierung für 16 h bei 37°C mit SA- β -Gal-Puffer bei pH 6 inkubiert.

Die neutrale Sphingomyelinase-überexprimierenden EF FAN WT nahmen nach Transfektion eine deutlich lang gestrecktere Form an, allerdings ist weder in den transfizierten (Abbildung 51 (B)) noch in den untransfizierten Zellen (Abbildung 51 (A)) eine Blaufärbung und damit eine seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität zu erkennen. Genau wie die WT Zellen zeigen auch die EF FAN KO (Abbildung 52) eine veränderte Morphologie, aber keine Blaufärbung nach der Inkubation und damit auch keine seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität.

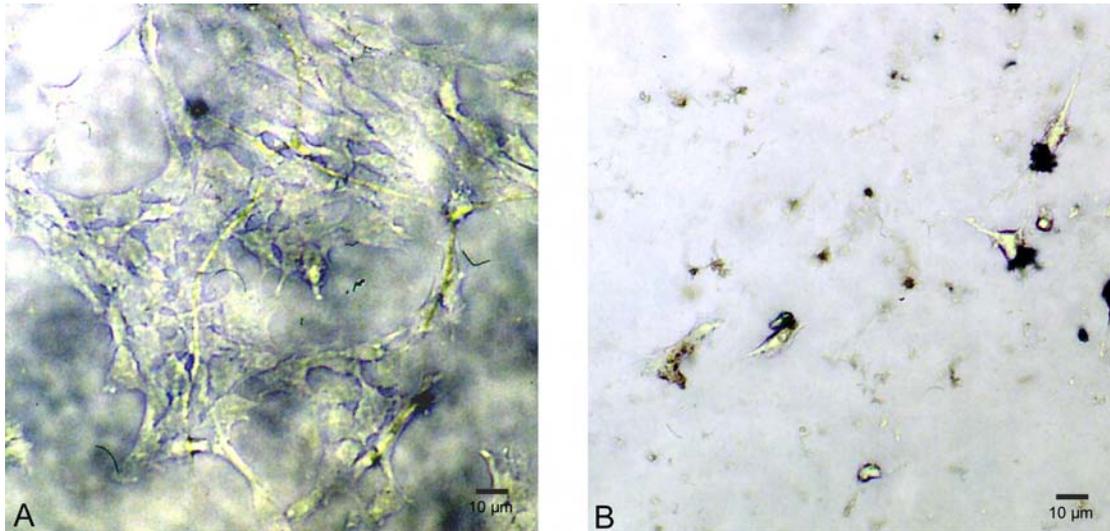


Abbildung 52: EF FAN KO inkubiert mit SA-β-Gal-Puffer

Die Durchführung erfolgte wie bei Abbildung 51, als Zellen wurden EF FAN KO verwendet.

4.7.2 Sowohl mit nSMase 2 transfizierte als auch untransfizierte EF FAN WT und EF FAN KO zeigen eine lysosomale β-Galaktosidase-Aktivität

Zur Kontrolle der seneszenz-assoziierten β-Galaktosidaseaktivität wurden die EF FAN WT und EF FAN KO sowohl untransfiziert als auch mit der überexprimierten neutralen Sphingomyelinase 2 auf die Aktivität der lysosomalen β-Galaktosidase getestet. Diese Überprüfung fand im gleichen Puffersystem wie die seneszenz-assoziierte β-Galaktosidaseaktivität statt, allerdings bei pH 4,0. Es zeigt sich bei den EF FAN WT (Abbildung 53) und bei den EF FAN KO (Abbildung 54) sowohl bei den untransfizierten als auch bei den überexprimierenden Zellen eine deutliche Blaufärbung nach der 16-stündigen Inkubation. Dies zeigt eine lysosomale β-Galaktosidaseaktivität bei beiden Zelltypen, die auch nach der Überexpression der nSMase 2 nicht abnimmt.

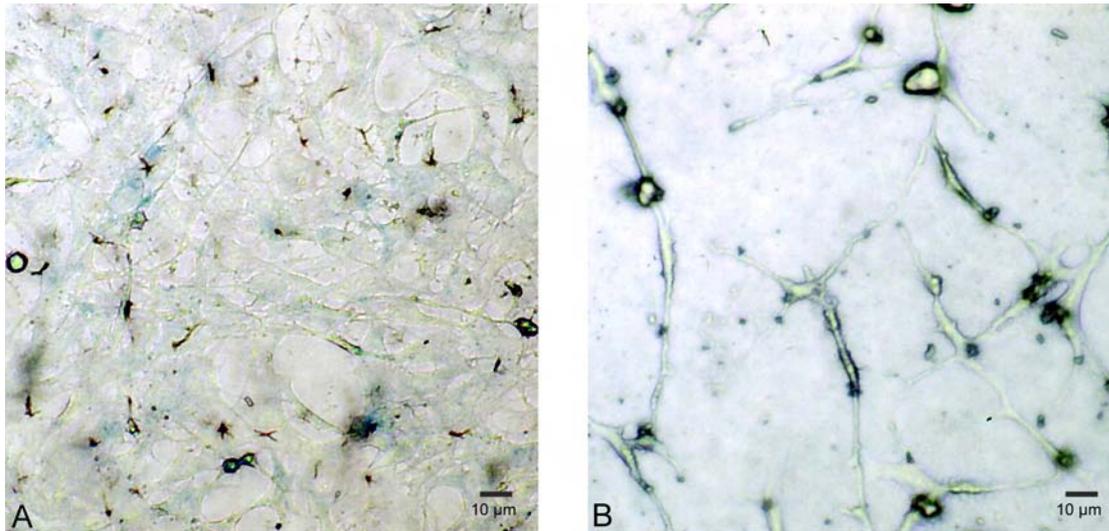


Abbildung 53: EF FAN WT inkubiert mit lysosomaler β -Galaktosidase Aktivitätspuffer

EF FAN WT wurden untransfiziert (A) bzw. mit NSM-myc transfiziert (B) und nach Fixierung für 16 h bei 37°C mit lysosomaler-Galaktosidase-Aktivitätspuffer bei pH 4 inkubiert.

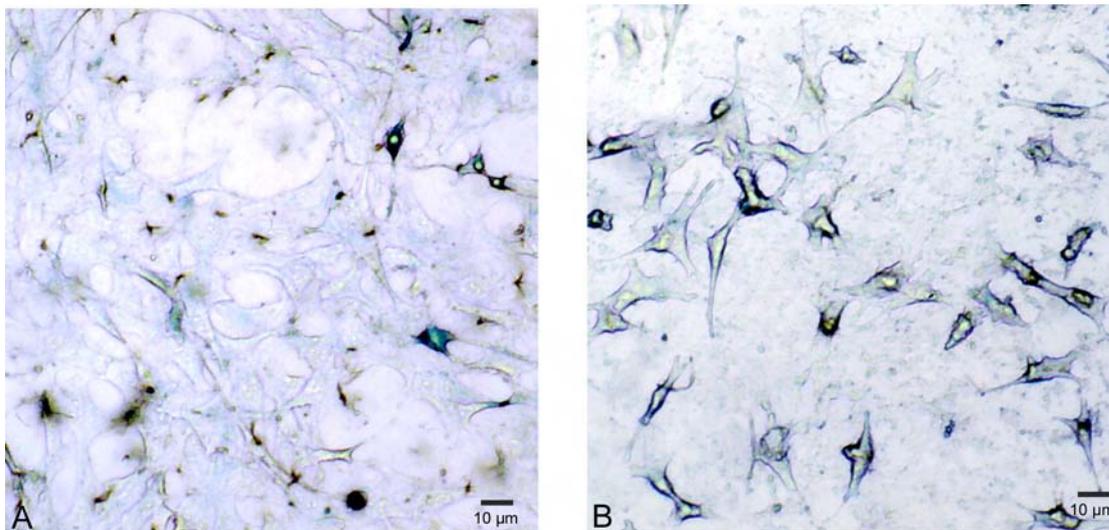


Abbildung 54: EF FAN KO inkubiert mit lysosomaler β -Galaktosidase Aktivitätspuffer

Die Durchführung erfolgte analog von Abbildung 53, nur mit EF FAN KO als Zelllinie.

4.8 INTERAKTIONEN VON FAN UND DER nSMASE 2

4.8.1 Überexprimierte nSMase 2 und überexprimiertes FAN interagieren nicht

Nachdem für das Protein FAN gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von FAN nach TNF Stimulation die Aktivität der nSMase 2 steigert (Adam-Klages et al., 1996; Adam-Klages et al., 1998), sollte nun untersucht werden, ob FAN und nSMase2 direkt miteinander interagieren.

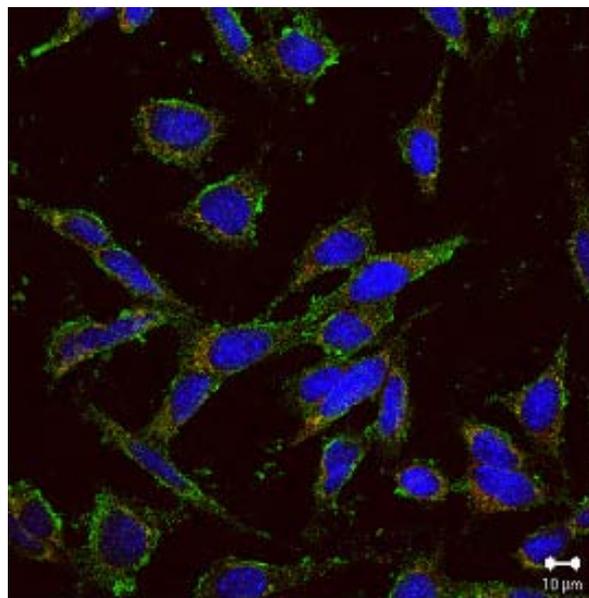


Abbildung 55: EF FAN WT: Darstellung der überexprimierten Proteine FAN und nSMase 2 durch spezifische Antikörper

3,5 x 10⁴ Zellen der EF FAN WT wurden auf CS ausgesät, adhären gelassen und mit einem NSM-myc und FAN Konstrukt transfiziert. Am nächsten Tag wurde FAN mit einem spezifischen Antikörper gegen FAN (1:100, 4°C über Nacht) und einem FITC gekoppelten Zweitantikörper (α -Ziege-FITC (grüne Fluoreszenz) 1:200, 1 h 37°C) und die NSM-myc mit einem spezifischen Antikörper gegen myc (1:200, RT, 1h) und einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (α -Maus IgG TRITC (rote Fluoreszenz) 1:200, 1 h, 37°C). Die Kerne wurden zur besseren Erkennung mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gefärbt.

Nach Transfektion der EF FAN WT mit der NSM-myc und Anfärben der Proteine FAN (grün) und nSMase2 (rot) wurde auf Kolokalisation der beiden Proteine getestet (Abbildung 55). Sowohl FAN als auch die nSMase 2 zeigen eine zytosolische Verteilung, wobei die Proteine „nebeneinander“ existieren und keinerlei Kolokalisation erkennbar ist.

4.8.2 Der α -FAN Antikörper von Santa Cruz erkennt nur überexprimiertes FAN

Nachdem in der Immunfluoreszenz in den EF FAN WT überexprimiertes FAN und die überexprimierte nSMase 2 keine Kolokalisation zeigten, sollte überprüft werden, ob der verwendete Antikörper α -FAN dafür sensitiv genug war um im Western-Blot endogenes FAN nachzuweisen.

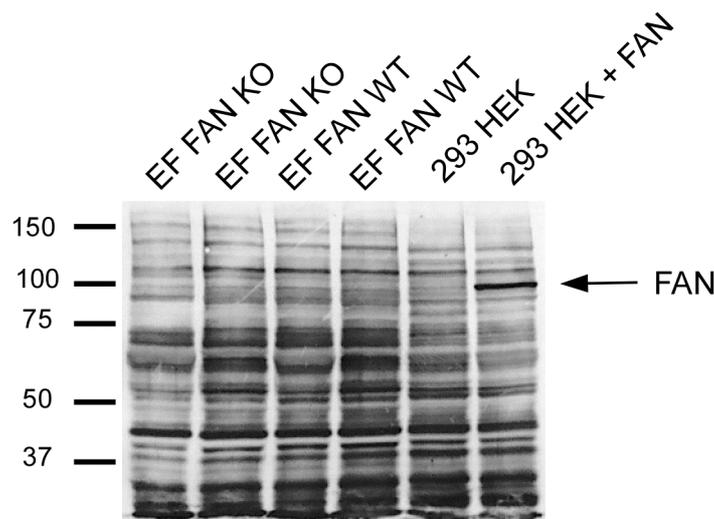


Abbildung 56: Western-Blot: α -FAN

EF FAN WT, EF FAN KO, 293 HEK und 293 HEK Zellen, die transient mit einem Konstrukt für FAN transfiziert wurden, wurden lysiert, gleiche Mengen Protein über SDS-PAGE getrennt und über Western-Blot auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde mit einem α -FAN Antikörper (1:200, 1 h RT) inkubiert.

Nach Auftrennen der Lysate aus EF FAN WT, EF FAN KO, HEK 293 und mit einem FAN-Konstrukt transfizierten 293 HEK und anschließendem Western-Blot zeigte sich nach der Inkubation mit einem α -FAN Antikörper nur beim überexprimierten FAN in den FAN überexprimierenden 293 HEK Zellen eine Bande. Auch bei den EF FAN WT im Vergleich zu den EF FAN KO war kein Unterschied bei der Bandenstärke auf der entsprechenden Höhe zu erkennen. Der α -FAN Antikörper erkennt also nur überexprimiertes FAN und ist deshalb nicht zur Darstellung von endogenem FAN geeignet, so dass mit diesem Antikörper keine Immunfluoreszenzuntersuchungen der Interaktion von nSMase2 und FAN möglich sind. In Abbildung 55 wurde das FAN überexprimiert, die IF lieferte also valide Daten.

4.8.3 nSMase 2 lässt sich nach Immunpräzipitation vom volle-Länge-FAN nicht darstellen

Nach den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz, die keine Kolo-kalisation der nSMase2 mit FAN zeigten, sollte dieses Ergebnis in einer Ko-Immunpräzipitation überprüft werden.

Für die Untersuchung der direkten Interaktion von FAN und nSMase2 wurden NSM-myc und entweder volle-Länge-FAN-FLAG oder ein Konstrukt, das nur die PH und die BEACH-Domäne von FAN enthielt (PB-FLAG) (Abbildung 41) in 293 HEK Zellen überexprimiert.

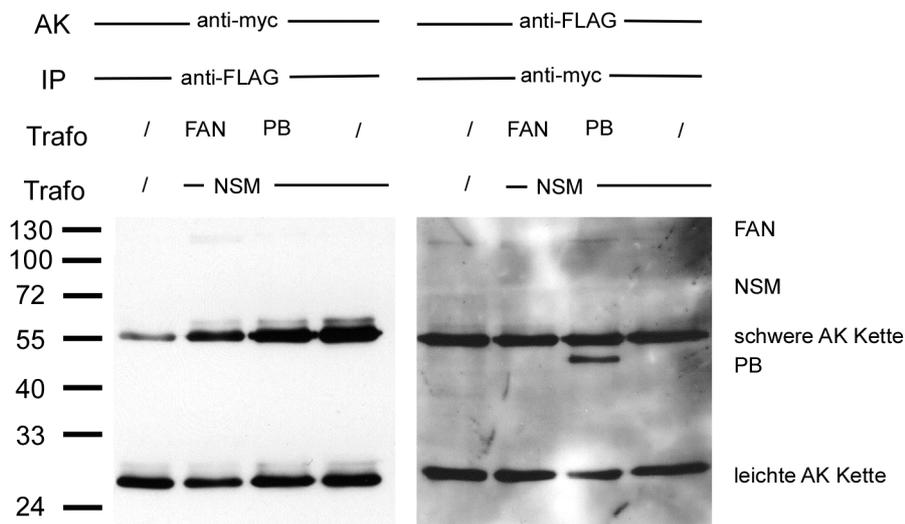


Abbildung 57: Ko-Immunpräzipitation von FAN, FAN-Konstrukt und nSMase 2

293 HEK Zellen wurden kotransfiziert mit NSM-myc und FAN-FLAG bzw. PB-FLAG. Nach Fällung der nSMase 2 mit myc-Antikörper bzw. FAN-FLAG oder PB-FLAG mit FLAG-Antikörper (jeweils 1 mg Protein und 2 µg Antikörper) wurden nach Trennung über SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot die nSMase 2 mit dem anti-FLAG Antikörper inkubiert, die FLAG-Fällungen mit einem anti-myc Antikörper.

Nach Fällung von FAN-FLAG oder PB-FLAG mit dem anti-FLAG Antikörper konnte keine Kopräzipitation der nSMase 2 durch den anti-myc Antikörper gezeigt werden.

Nach Fällung der nSMase 2 durch den anti-myc Antikörper konnte auch beim volle-Länge-FAN keine Kopräzipitation durch Inkubation mit dem anti-FLAG Antikörper gezeigt werden. Das FAN-Konstrukt, das nur die PH und die BEACH-Domäne enthält, zeigte eine Kopräzipitation bei Fällung der

nSMase 2. Durch Fällung des PB-FLAGs konnte eine Kopräzipitation der nSmase 2 allerdings nicht nachgewiesen werden.

Als Kontrolle wurden die Blots nachträglich mit den IP Antikörpern inkubiert, die Fällung der Proteine war sichergestellt (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten aus der Ko-Immunpräzipitation zeigten also auch, dass FAN und die nSMase 2 nicht direkt mit einander interagieren.

4.8.4 Interaktionen von FAN und nSMase 2 im Hefe „Two-Hybrid“ System

4.8.4.1 Darstellung der Negativ- und Positivkontrollen für die Interaktionskontrolle von FAN und nSMase 2

Als weitere Kontrolle auf Interaktion von FAN und der nSMase2 wurden verschiedene Konstrukte in der Hefe exprimiert und auf Interaktion getestet.

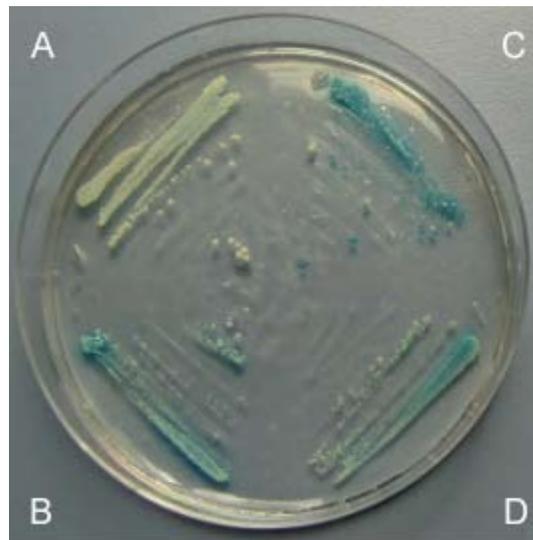


Abbildung 58: Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen für die Interaktionen von FAN und nSMase 2

Der Hefestamm JK103 wurde mit den Konstrukten plex + stu (A), pFAN + sRACK (B), p73 + sRACK (C) oder plex + sFAN (D) transfiziert, die Hefen werden auf UHW- Gal⁺ X-Gal⁺ Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wird auf Blaufärbung getestet.

Als Kontrolle der Blaufärbungen der Interaktionen im Hefe „Two-Hybrid“ System wurden verschiedene Positiv- und Negativkontrollen auf der Platte ausgestrichen.

Als Negativkontrollen dienten die Kotransfektionen vom Leervektor plex 202 (plex) und vom Leervektor 4-5 stuffer (stu) (Abbildung 58 (A)) und die Kotransfektion vom Leervektor plex 202 und von FAN im Vektor 4-5 stuffer (sFAN) (Abbildung 45 (A)) in den Hefestamm JK103 (Abbildung 58 (D)).

Als Positivkontrollen dienten die Kotransfektion von FAN im Vektor plex 202 (pFAN) (Abbildung 45 (A)) und RACK1 im Vektor 4-5 stuffer (sRACK) (Abbildung 58 (B)) und die Kotransfektion vom FAN-Konstrukt im Vektor plex 202 (p73) und RACK1 im Vektor 4-5 stuffer (sRACK) (Abbildung 58 (C)). Dabei war die Interaktion von p73 (Abbildung 45 (B)) mit sRACK (Abbildung 45 (C)) deutlich stärker als die Interaktion von pFAN mit sRACK, was sich in einer intensiveren Blaufärbung zeigte.

4.8.4.2 Im Hefe „Two-Hybrid“ System interagieren die nSMase2 und FAN nicht

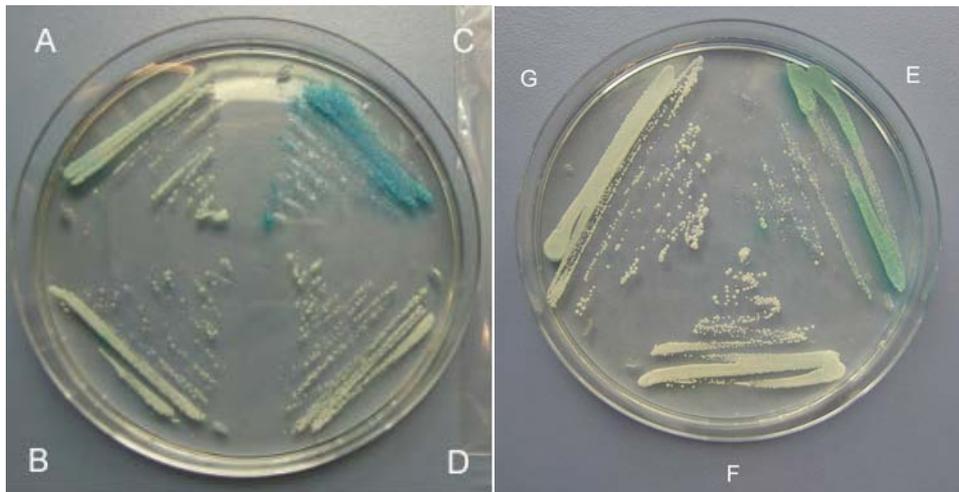


Abbildung 59: Test auf Interaktion von nSMase 2 und FAN im Hefe „Two-Hybrid“ System

Der Hefestamm JK103 wurde mit den Konstrukten pNSM + sFAN (B), pNSM + s73 (F) oder pNSM + sRACK (D) transfiziert, als Positivkontrolle diente p73 + sRACK (C + E), als Negativkontrolle pNSM+ stu (A+ G). Die Hefen wurden auf UHW- Gal⁺ X-Gal⁺ Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde auf Blaufärbung getestet.

Auch im Hefestamm JK103 sollte auf Interaktion von FAN und nSMase 2 getestet werden. Dazu wurde die Hefe kotransfiziert mit nSMase 2 im Vektor plex 202 (pNSM) und FAN im Vektor 4-5 stuffer (sFAN) (Abbildung 59 (B)). Als Negativkontrolle diente die Kotransfektion von pNSM und dem

Leervektor 4-5 stuffer (stu) (Abbildung 59 (A)), als Positivkontrolle die Kotransfektion von einem FAN Konstrukt im Vektor plex 202 (p73) und RACK1 im Vektor 4-5 stuffer (sRACK) (Abbildung 59 (C)). Zusätzlich wurde noch auf die Interaktion von nSMase 2 und RACK1 getestet durch Kotransfektion von pNSM und sRACK (Abbildung 59 (D)). Nach der Inkubation zeigt sich eine Blaufärbung nur bei der Positivkontrolle (C), alle anderen Proteine interagieren nicht.

4.9 *SUCHE NACH INTERAKTIONSPARTNERN DER nSMASE 2 IM HEFE „TWO-HYBRID“ SYSTEM*

Nachdem in der Immunfluoreszenz, bei der Ko-Immunpräzipitation und im Hefe „Two-Hybrid“ System keine Interaktion von FAN und der nSMase 2 gesehen werden konnte, sollte in einem Screen mit der nSMase 2 als Köderprotein nach weiteren Proteinen gesucht werden, die mit der nSMase 2 interagieren und als mögliche Vermittler zwischen FAN und der nSMase 2 agieren könnten.

4.9.1 Genbibliothekscreen

Nach der Transfektion des Hefestammes JK 103 mit der nSMase 2 als Köder im Vektor plex 202 und der Beute im Vektor pB42AD wurden die möglichen Hefekandidatenklone zunächst auf falsch-positive Interaktionen untersucht. Von den verbleibenden Klonen wurde die DNA gewonnen, sequenziert und die Sequenz mittels des Programms BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf bekannte Sequenzen untersucht. Die DNA Sequenzen wurden daraufhin überprüft, ob sie im Beutevektor im richtigen Leserahmen vorliegen, d.h. ob das translatierte (mit der nSMase 2 interagierende) Protein dem durch BLAST ermittelten Gen entsprach.

Tabelle 19: Hefe Screen: isolierte, potentiell mit der nSMase 2 isolierte Kandidatenklone

Benennung	positiver Klon	zugehöriges Gen
E	1-7	E7 homo sapiens eukaryotic translation initiation factor
F	1-4	F2 falscher Leserahmen
K	15-21	K16 SON DNA-binding protein
D	1-4	D1A similar to eukaryotic translation initiation factor 3 subunit
H	1-3	H1A cyclophilin 1
A	1	A1A hemagglutinin precursor

4.9.2 Cyclophilin als möglicher Interaktionspartner

Nach dem Datenbankvergleich der Sequenz des Klons H1A stellte sich als Ergebnis das Protein Cyclophilin heraus. Die Untersuchungen der Klone E7, K16, D1A wurden nicht weiterverfolgt, weil sie als direkt mit DNA interagierenden Proteine auch ohne die DNA-Bindung von LexA eine Transkription auslösen können. Der Klon A1A wies nach der Sequenzierung nur das HA-Tag des Vektors pB42AD auf und wurde deshalb nicht weiteruntersucht.

Cyclophiline sind ubiquitär exprimierte, intrazelluläre Proteine, die als erstes als intrazellulärer Rezeptor für das Immunsuppressivum Cyclosporin entdeckt wurden. Für ihre Rolle als Mediator bei der Proteinfaltung und als Chaperone wird ihnen Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase Aktivität zugeschrieben. Weiterhin gibt es Beweise, die eine Rolle der Cyclophiline als Mediatoren bei der interzellulären Kommunikation zulassen. Bis jetzt sind diese Effekte von Cyclophilin allerdings hauptsächlich in Immunzellen untersucht worden. Die Rolle von Cyclophilin bei der Signalweiterleitung des TNF-R1 wäre also ein weiterer Weg des TNF-Signalweges.

Zur Kontrolle der Interaktion wurde Hefe erneut mit pNSM und dem Plasmid H1A transformiert. Hier zeigt sich keine Blaufärbung (Abbildung 60 (D)), die Blaufärbung des Screens hat also auf unspezifischen Interaktion beruht. Die fehlende Blaufärbung in Abbildung 60 (E) erklärt sich durch Kontamination der Hefe mit Bakterien, die den pH Wert der Hefe-Platte so verändern, dass die Blaufärbung nicht sichtbar wird. Auch mit pFAN ist

beim Klon keine Interaktion zu beobachten (Abbildung 60 (B)), Cyclophilin ist also nicht das fehlende Bindeglied zwischen der nSMase 2 und FAN. Es wurde also noch kein Bindungspartner für die nSMase 2 gefunden, der Screen muss mit weiteren Hefen wiederholt werden.



Abbildung 60: Hefe „Two-Hybrid“ Screen:

Der Hefestamm JK103 wurde mit den Konstrukten, pFAN + H1A (B) oder pNSM + H1A (D) transfiziert. Als Positivkontrolle diente p73+ sRACK (A), als Negativkontrolle plex + H1A (C). Als weitere Kontrolle diente die aus dem Screen gewonnene Hefe (E). Die Hefen wurden auf UHW- Gal⁺ X-Gal⁺ Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde auf Blaufärbung getestet.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Tumor Nekrose Faktor (TNF) vermittelten, aber Todesdomäne-unabhängigen Signalwege des 55 kDa TNF-Rezeptors näher zu charakterisieren. Dabei wurde besonders die Signalweiterleitung der WD-Repeat Proteine FAN und RACK1 berücksichtigt.

FAN und RACK1 interagieren direkt mit einander (Tcherkasowa et al., 2002), auch für RACK1 und die Proteine Kinase C β II wurde eine direkte Interaktion nach Aktivierung der PKC gezeigt (Ron et al., 1994). Somit stellte sich die Frage der Aktivierung der PKC nach TNF Stimulierung und ob dies FAN abhängig passiert.

Weiterhin wurde von der Arbeitsgruppe Adam (Adam-Klages et al., 1996; Adam et al., 1996) gezeigt, das FAN einen Einfluss auf die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase 2 (nSMase 2) hat. Diese Signalweiterleitung über die neutrale Sphingomyelinase Domäne (NSD) am TNF-Rezeptor 1 sollte daraufhin untersucht werden, ob FAN und die nSMase 2 direkt miteinander interagieren.

5.1 *UNTERSUCHUNG DER TNF ABHÄNGIGEN TRANSLOKATION DER PKC UND DER DAMIT VERBUNDENEN KOLOKALISATION VON RACK1*

5.1.1 Untersuchung der Translokation von PKC

Nach den bisher veröffentlichten Daten zur Translokation der PKC nach Stimulation mit PMA ist eine Translokation der PKC- α und PKC- β -II aus dem Zytosol an die Membran zu erwarten, für die PKC- β -I wird nach Stimulation eine Orientierung aus dem Zytosol in Richtung Endoplasmatisches Retikulum erwartet.

In den hier gezeigten Daten der murinen Fibroblasten zeigt sich nach PMA Stimulation weder bei der endogen PKC- α (4.1.3) eine Translokation an die

Membran, noch bei der endogenen PKC- β -II (4.1.1). Auch die endogene PKC- β -I (4.1.2) zeigt keine räumliche Veränderung ihrer Verteilung nach Stimulation mit PMA. Und auch bei den endogenen cPKCs ist nach Stimulation keine Veränderung der Verteilung zu erkennen (4.1.4). Dies legt die Vermutung nahe, dass die mengenmäßige Verteilung der PKC in den murinen Fibroblasten zu gering ist, als dass mit Antikörpern eine Umverteilung nach Stimulation detektiert werden kann. Diese Daten stimmen mit den Daten von Goodnight (Goodnight et al., 1995) überein, die in NIH 3T3 Fibroblasten zeigen konnte, dass in diesen murinen Fibroblasten nur die PKC- α eine für eine Detektion ausreichende Expression aufweist. In anderen Veröffentlichungen, die eine Umverteilung der endogenen PKCs nach Stimulation zeigen konnte, wurde in anderen Zellsystemen gearbeitet (Kiley et al., 1995; Ron et al., 1999a).

Der Wechsel im Zellsystem von den murinen Fibroblasten zu den murinen NK-Zellen zeigte auch keine Translokation der PKC- β -II an die Membran, dies lässt sich allerdings durch die Form der NK-Zellen und das kaum vorhandene Zytosol erklären.

Nach Überexpression der PKC- β -II als EGFP Konstrukt wurde nach PMA Stimulation eine deutliche Translokation der PKC- β -II-EGFP aus dem Zytosol an die Membran gesehen. Diese Umverteilung ist, wie erwartet, sowohl bei den EF FAN WT, als auch bei den EF FAN KO und den MCHS Zellen zu beobachten. Durch die Translokation der überexprimierten PKC- β -II-EGFP nach PMA Stimulation zeigt sich, dass in den murinen Fibroblasten generell eine Translokation der PKC- β -II zu sehen ist, die endogene PKC- β -II nur durch Antikörper nicht darstellbar ist.

5.1.2 Translokation der PKC nach TNF Stimulation

In den Zellen sind verschiedene Isoenzyme der PKC aktiv, diese unterschiedlichen PKCs haben eine verschiedene Verteilung und übernehmen unterschiedliche Aufgaben in der Zelle. Für die PKC- β -II ist eine Rolle bei der Proliferation und bei der Kontraktion der Zelle beschrieben worden. Auch für das Zytokin TNF ist eine Rolle beim Zellwachstum und

Zelldifferenzierung beschrieben worden. Die veränderte Verteilung, die RACK1 nach Überexpression des TNF-Rezeptors 1 in COS-1 Zellen zeigt (Tcherkasowa et al., 2002) zeigt eine Lokalisation von RACK1 an der Plasmamembran. Dies lässt, für RACK1 als mit der PKC interagierendes Protein, die Vermutung zu, dass auch TNF einen Einfluss auf die Aktivierung der PKC, insbesondere der PKC- β -II hat. Allerdings ist diese Aktivierung in den murinen Fibroblasten FAN WT und FAN KO nicht erkennbar. Weder die PKC- β -II als direkter Interaktionspartner von RACK1 noch die anderen konventionellen PKCs α oder β -I oder auch die gesamten konventionellen PKCs zeigen nach TNF Stimulation weder endogen noch überexprimiert eine Translokation in den murinen Fibroblasten. Allerdings ist von der Gruppe um Krönke gezeigt worden, dass TNF nur in manchen Zellsystemen einen Einfluss auf die PKC hat, in der humanen nicht-malignen Fibroblastenzelllinie CCD18 wurde auch kein Einfluss von TNF gesehen (Schütze et al., 1990). Murine Natürliche Killerzellen als anderer Zelltyp eignen sich auf Grund ihrer Größe und Form nicht als anderes Zellsystem. Hier bietet sich eine Untersuchung der TNF Aktivierung der PKC in anderen Zelltypen der FAN-defizienten Mäuse an.

Da die Gruppe um Adam einen Einfluss von RACK1 auf die Aktivierung der nSMase zeigen konnte (Tcherkasowa et al., 2002), könnte RACK1 auch nur wichtig sein für die TNF-Signalweiterleitung der nSMase und keinen Einfluss auf die PKC Aktivierung durch TNF haben. Hier sind weitere Untersuchungen nötig.

5.1.3 Untersuchung der Kollokalisierung von PKC und RACK1

Bei den Untersuchungen der verschiedenen Arbeitsgruppen, die die Kollokalisierung von Protein Kinase C nach Aktivierung durch PMA und der damit verbundenen Translokationen und RACK1 zeigen konnten, wurden diese Versuche in verschiedenen Zellsystemen durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Gordon arbeitet in CHO Zellen (Ron et al., 1999a) und zeigte die Kollokalisierung von RACK1 mit der aktivierten PKC.

Die Gruppe um Mochly-Rosen arbeitete in Herzmyozyten um die durch C₂-Region-Peptide verhinderte Translokation der PKC- β (Ron et al., 1995a), oder die Bindespezifität von RACK1 an die V5-Region der PKC- β -II (Stebbins et al., 2001) zu zeigen. Auch die Gruppe um Yarwood diskutiert eine zelltypabhängige Verteilung von RACK1 (McCahill et al., 2002). In der Veröffentlichung, die die Kollokalisierung von FAN und RACK1 zeigt (Tcherkasowa et al., 2002), wurde in COS-1 Zellen gearbeitet, auch wurde hier das RACK1 als myc-getaggtetes Konstrukt überexprimiert und mit einem myc-Antikörper detektiert.

In den hier gezeigten murinen Fibroblasten ist keine Kollokalisierung von RACK1 und PKC- β -II zu erkennen, weder in unstimulierten Zellen noch nach Stimulation mit PMA und der dadurch erfolgten Aktivierung der PKC- β -II. Auch nach der Überexpression der PKC- β -II als EGFP Konstrukt ist nach Aktivierung der PKC durch PMA keine Kollokalisierung zu erkennen, auch nicht mit überexprimiertem RACK1. Überexprimiertes RACK1 zeigt allerdings im Vergleich zum endogenen RACK1 eine andere Verteilung (4.1.8), wobei man hier auch eine unterschiedliche Epitoperkennung durch die verschiedenen Antikörper diskutieren kann.

Auch die Gruppe um Hannun zeigte in HEK 293 Zellen eine Translokation der PKC- β -II ohne gleichzeitige Translokation von RACK1, allerdings zum juxt nukleären Kompartiment und nicht an die Plasmamembran (Becker et al., 2004).

Die nicht vorhandene Kollokalisierung von RACK1 und der PKC- β -II nach Stimulation mit TNF ist ein weiteres Indiz dafür, dass in den murinen Fibroblasten keine Aktivierung der PKC nach TNF Stimulation stattfindet, da für RACK1 die Stabilisierung der aktivierten PKC beschrieben worden ist.

5.2 INTERAKTIONEN VON FAN UND RACK1

Die Gruppe um Adam konnte nach der Identifikation von RACK1 als Bindepartner von FAN zeigen, dass für die Interaktionen der beiden Proteine die WD-Repeats der Proteine verantwortlich sind (Tcherkasowa et al., 2002).

Dies lässt sich durch die Interaktion von RACK1 mit dem WD-FLAG Konstrukt der Tong Gruppe (4.5.1) bestätigen. Aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten geht weiterhin hervor, dass das siebte WD-Repeat von RACK1 für die Interaktion von FAN mit RACK1 wichtig sind, zusammenfassend mit den vorherigen Daten der Arbeitsgruppe stellen sich also WD 5-7 von RACK1 für die Interaktion mit FAN als wichtig heraus. Durch Deletion von WD7 beim RACK1 konnte auch die Assoziation von RACK1 mit sich unterbunden werden. Diese Dimerisierung von RACK1 ist z.B. wichtig für die Aktivität des NMDA-Rezeptors (Thornton et al., 2004).

Allerdings zeigte auch das FAN-Konstrukt PH-BEACH-FLAG eine Interaktion mit RACK1. PH-Domänen interagieren nicht nur mit Phosphatidylinositol, sondern brauchen für ihre subzelluläre Lokalisation sowohl Phosphatidylinositol als auch Nicht-Phosphatidylinositol-Komponenten. So ist für eine PH-Domäne schon früher eine Interaktionen mit der β Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins beschrieben worden (Touhara et al., 1994).

2001 wurde die Interaktion des Ras GTPase-Aktivierenden Proteins p120^{GAP}, welches eine PH-Domäne enthält, mit RACK1 gezeigt, hier soll RACK1 die Funktion in Abhängigkeit zur aktivierten PKC regulieren (Koehler et al., 2001b).

Auch die Gruppe um Mochly-Rosen stellt die Vermutung auf, dass RACK1 die Protein Kinase C in räumliche Nähe zu dem Substrat bringt, welches die PH-Domäne enthält, (Rodriguez et al., 1999) und das die PKC diese Interaktionen reguliert. Bis jetzt ist FAN, das in diesem Fall für das Substrat mit der PH-Domäne in Frage kommt, allerdings nicht als Substrat der PKC identifiziert worden.

5.3 PHOSPHORYLIERUNG VON RACK1

Die Gruppe um Cartwright zeigte, dass in vitro RACK1 mit der SH2-Domäne von Src interagiert (Chang et al., 1998). Diese Interaktion ließ sich auch in vivo darstellen und wurde durch die Phosphorylierung von RACK1 noch verstärkt (Chang et al., 2001). Durch die Interaktion von RACK1 mit Src wird die Aktivität von Src herunterreguliert, das Wachstum der Zellen wird gehemmt (Chang et al., 1998).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Zugabe von Serum oder PDGF oder die Aktivierung der PKC die Phosphorylierung von RACK1 verstärkte. Hier stellt sich die Frage, ob auch TNF über Aktivierung der PKC eine Phosphorylierung von RACK1 bewirkt. Nach der Immunpräzipitation von RACK1 und der Inkubation von mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin, bzw. der Präzipitation von phosphorylierten Tyrosinen und Inkubation mit einem RACK1-Antikörper zeigte sich nach TNF Stimulation keine vermehrte Phosphorylierung von RACK1. Die Gruppe um Cartwright postulierte, dass RACK1 durch die PKC phosphoryliert wird. Somit gehen die in dieser Arbeit gezeigten Daten aus der Immunpräzipitation und den Western-Blots einher mit den Daten aus der Immunfluoreszenz, die auch keine Aktivierung der PKC durch TNF zeigen. Auffällig ist allerdings, dass die Tyrosinphosphorylierung in den Fibroblasten auch durch Vanadat nicht besonders ausgeprägt ist. Dies lässt darauf schließen, dass in diesem Zelltyp RACK1 offensichtlich nicht oder nur sehr wenige Proteinmoleküle am Tyrosin phosphoryliert werden. Dies kann ein weiterer Grund dafür sein, dass die Stimulation mit TNF keine Phosphorylierung von RACK1 über die PKC induziert. Um die Aktivierung der PKC durch TNF in den murinen Fibroblasten komplett auszuschließen, sollten in weiteren Versuchen die Phosphorylierung der Serine und Threonine von RACK1 untersucht werden.

5.4 KOLOKALISATION VON AKTIN UND RACK1

Nach Beobachtungen bei der Immunfluoreszenz, bei denen RACK1 eine fädige Anordnung zeigte, wurden in weiteren Experimenten Zellen auf Kolokalisation von RACK1 und filamentösem Aktin untersucht.

Bereits 1998 wurde von Lilienthal und Chang (Liliental et al., 1998) eine Interaktion von RACK1 und der β -Untereinheit von Integrin und damit einem Adhäsionsmolekül beschrieben. Integrine sind wichtig für die aktivierungs-abhängige Zelladhäsion und adhäsionsabhängigen Zellsignale. In weiteren Experimenten zeigte die Gruppe um O'Toole (Buensuceso et al., 2001) eine RACK1 vermittelte PKC und Integrin-abhängige Zellmigration, wobei RACK1 überexprimierende Zellen eine verminderte Migration zeigten. Weiterhin zeigten RACK1 überexprimierende Zellen vermehrte Aktinfilamente und fokale Kontakte.

In den EF FAN WT und EF FAN KO zeigte RACK1 in Membrannähe eine Kolokalisation mit Aktin, die Verteilung der Proteine ist in beiden Zelltypen ähnlich. Auffällig ist allerdings die auf die „Füße“ beschränkte Verteilung der Proteine, die an diesen Stellen die wahrscheinlichsten Kontakte zu anderen Zellen sind. RACK1 könnte hier also als Interaktionspartner von verschiedenen Proteinen (Tabelle 2) eine Plattform für die Interaktionen bilden. Unabhängig vom Protein FAN zeigen beide Zelltypen nach der Stimulation mit TNF eine morphologische Veränderung, die Zellen sehen gestreckter aus, die Kolokalisation von RACK1 und Aktin ist weniger geworden. TNF könnte also einen Einfluss auf die Interaktionsstellen der Fibroblasten zu Nachbarzellen haben, dieser Einfluss scheint aber FAN-unabhängig zu sein.

In den HeLa Zellen ist auch eine Kolokalisation von RACK1 und Aktin zu beobachten, allerdings scheinen die HeLa Zellen nicht so deutlich ausgeprägte „Füße“ zu besitzen und auch verändert die TNF Stimulation nicht die Morphologie der Zellen. In diesen Zellen scheint der Einfluss von TNF auf die Ausbildung der Zell-Zellkontakte also nicht so ausgeprägt zu sein.

5.5 *TRANSLOKATION VON RACK1 IN DEN ZELLKERN*

Die Gruppe um Ron konnte zeigen, dass nach Ethanolstimulation *in vitro* und *in vivo* RACK1 eine nukleäre Verteilung annimmt (He et al., 2002). Auch in dieser Arbeit zeigte sich bei der Stimulation mit Ethanol ein „Entkoppeln“ von RACK1 von der PKC- β -II und die aktivierungsinduzierte Translokation der PKC wurde verhindert. In der Immunfluoreszenz bei den Aufnahmen zur Translokation der PKC und RACK1 zeigte sich auch nach TNF Stimulation eine Umverteilung von RACK1 in den Kern.

Die Gruppe um Ron konnte nach Ethanolstimulation und danach erfolgter Translokation von RACK1 in den Kern eine Hochregulation von *c-fos* zeigen, wobei diese Hochregulation des Gens schon vorher bekannt war und der genaue Grund dafür noch immer unbekannt ist (He et al., 2002).

Möglicherweise bewirkt auch die Translokation von RACK1 nach TNF-Stimulation eine Hochregulation des immediate early gene (IEG) *c-fos* und damit eine schnelle Aktivierung weiterer Faktoren.

Die Translokation von RACK1 konnte nach TNF Stimulation allerdings nur in der Immunfluoreszenz gezeigt werden. Im Western-Blot war die Translokation in den Kern nach Fraktionierung der Lysate nicht darstellbar, die Gruppe um Ron konnte eine Auswertung der Zunahme von RACK1 im Kern auch nur in der Immunfluoreszenz zeigen.

Die TNF bedingte Translokation von RACK1 in den Zellkern und die damit verbundene Entkopplung von RACK1 und der PKC ist ein weiteres Indiz dafür, dass TNF in den murinen Fibroblasten keine Aktivierung der PKC bewirkt.

5.6 *DIREKTE INTERAKTION DER nSMASE 2 MIT FAN*

Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass nach TNF Stimulation eine Aktivierung der nSMase stattfindet und dass diese Aktivierung FAN abhängig ist (Adam-Klages et al., 1998), stellte sich nun die Frage, ob FAN und die nSMase 2 direkt mit einander interagieren und so weitere Signalwege des TNF-R1 verschaltet werden. Die Daten der Immunfluoreszenz, die keine Kolo-kalisation der Proteine FAN und nSMase 2 zeigen und damit eine Interaktion unwahrscheinlich machen, sind allerdings kritisch zu betrachten, da der hier verwendete Antikörper nicht besonders spezifisch für FAN ist. Da allerdings keine Interaktion zu sehen ist, ist es wahrscheinlicher, dass sie auch nicht stattfindet. Dies steht auch in Einklang mit den Daten aus den Interaktionsstudien des Hefe „Two-Hybrid“ Systems. Auch hier zeigte sich keine Interaktion des Köderproteins nSMase 2 mit dem Beuteprotein FAN. Es wurde darauf verzichtet, Deletionsmutanten der nSMase 2 herzustellen, da für das Protein noch keine Domänen bekannt sind und es insofern schwierig ist, „Schnittstellen“ festzulegen. Auch bei der Ko-Immunpräzipitation ließ sich die nSMase 2 nicht zusammen mit FAN präzipitieren. Auch die Fällung der nSMase 2 und die anschließende Detektion vom volle-Länge-FAN zeigte kein positives Ergebnis, auch hier ist also keine Interaktion der Proteine nachweisbar. Die Ko-Fällung des PH-BEACH-Konstruktes von FAN (PB-FLAG) nach Präzipitation der nSMase 2 lässt auch nicht unbedingt auf direkte Interaktion von FAN und nSMase 2 schließen, da keine Ko-Fällung der nSMase 2 mit PB-FLAG stattfindet. Für die Aktivierung der nSMase 2 nach TNF-Stimulation über FAN ist also noch ein Zwischenschritt über ein weiteres Protein nötig.

5.7 *SENESZENZ*

Nach Überexpression der nSMase 2 zeigten die murinen embryonalen Fibroblasten einen veränderten Phänotyp, der die Vermutung nahe legte, dass sich die nSMase 2 überexprimierenden Zellen seneszent verhalten. In den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ist allerdings keine Seneszenz nach Überexpression der nSMase 2 zu erkennen. Falls sich herausstellen sollte, dass nach Überexpression der nSMase 2 auch in den murinen embryonalen Fibroblasten erhöhte Ceramidspiegel vorhanden sind, stehen diese Daten im Widerspruch zu den gezeigten Daten von der Gruppe um Obeid (Venable et al., 1995). Diese konnten zeigen, dass vermehrte Seneszenz mit erhöhten Ceramidspiegeln und erhöhter Magnesium-abhängigen nSMase Aktivität einhergeht. Zu dem damaligen Zeitpunkt war die nSmase 2 allerdings noch nicht kloniert und konnte so nicht überexprimiert werden. Seneszenz in den verwendeten Wi-38 humanen diploiden Fibroblasten ließ sich durch Zugabe von externem Ceramid anregen.

Da sich in den in dieser Arbeit gezeigten Daten als Positivkontrolle nur die Expression der lysosomalen β -Galaktosidase darstellen ließ, ist hier in Zukunft zu überprüfen, ob die nSMase2 überexprimierenden Fibroblasten tatsächlich eine verminderte DNA Synthese als Zeichen der Seneszenz aufweisen. Falls sich dies als negativ herausstellt, sind für die Fibroblasten wohl nur veränderte Sphingolipidspiegel und veränderte Verhältnisse der unterschiedlichen Lipide zueinander für die morphologischen Veränderungen der Zelle nach der Überexpression der nSMase 2 zuständig.

5.8 AUSBLICK

Da TNF in murinen Fibroblasten keine Aktivierung der PKC bewirkt, sollte die Rolle von FAN in der PKC Aktivierung nach TNF Stimulation in anderen Zelltypen aus FAN WT und FAN KO Mäusen untersucht werden.

Weiterhin wurde in den embryonalen Fibroblasten die Tyrosinphosphorylierung von RACK1 nach TNF Stimulation untersucht. Falls die RACK1 Phosphorylierung auf die PKC zurückzuführen ist, sollte in weiteren Experimenten die Serin- und Threoninphosphorylierung von RACK1 untersucht werden. Dies könnte weitere Hinweise auf die Signalweiterleitung von TNF auf die PKC geben.

Die bisher gezeigten Daten zur Seneszenz nach Überexpression der nSMase 2 zeigen keinen Einfluss auf die Zellalterung. Hier sollten in weiteren Experimenten die Ergebnisse bestätigt werden.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass FAN und die nSMase 2 nicht direkt miteinander interagieren, sollten die weiteren Hefen, die eine Interaktion der nSMase 2 mit einem unbekanntem Protein zeigten, untersucht werden. Positive Kandidaten sollten dann auf Interaktion mit FAN untersucht werden. Hier sollte das Protein gefunden werden, das FAN und die nSMase 2 verbindet.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der WD-Repeat Proteine FAN und RACK1 auf die Signalweiterleitung des TNF-R1 untersucht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des CHS Proteins mit FAN, der veränderten PKC Aktivität in CHS-Zellen und der beschriebenen Interaktion von FAN und RACK1 wurde die Aktivierung der PKC und die dabei beschriebene Translokation und Kolokalisation von RACK1 untersucht.

In murinen embryonalen Fibroblasten oder murinen NK-Zellen war die Kolokalisation von RACK1 und der PKC- β -II nach Aktivierung der PKC durch PMA durch Antikörperfärbung nicht darstellbar. Die Translokation der PKC- β -II an die Plasmamembran war nach Überexpression der PKC in den Fibroblasten sichtbar, ging jedoch nicht mit einer Kolokalisation von endogenem RACK1 einher. Nach TNF Stimulation zeigte sich keine Änderung der Verteilung der PKC oder von RACK1, dies war unabhängig von der Anwesenheit von FAN. Nach TNF Stimulation zeigte sich auch keine vermehrte Phosphorylierung von RACK1, was auch zeigt, dass Stimulation mit TNF keine Aktivierung der PKC bewirkt.

Weiterhin wurde die Interaktion von RACK1 mit Aktin gezeigt, die Kolokalisation der beiden Proteine änderte sich nach TNF Stimulation, diese Veränderung war allerdings nicht FAN abhängig.

Die Kartierung der Interaktionsdomänen von FAN und RACK1 in der Ko-Immunpräzipitation und im Hefe „Two-Hybrid“ System zeigte, dass für die Interaktion WD7 vom RACK1 wichtig ist, zusammen mit den vorherigen Daten aus der Arbeitsgruppe zeigt sich damit, dass RACK1 WD5-7 für die Interaktion mit FAN wichtig sind.

Nach Überexpression der nSMase 2 in murinen embryonalen Fibroblasten zeigen diese einen veränderten Phänotyp, die Hinweise auf Seneszenz ließen sich aber in ersten Experimenten nicht bestätigen.

Im Hefe „Two-Hybrid“ System, in der Ko-Immunpräzipitation und in der Immunfluoreszenz zeigten die Proteine FAN und nSMase 2 keine direkte Interaktion, obwohl für FAN ein Einfluss auf die Aktivierung der nSMase

beschrieben worden ist. Somit sollte hier nach einem weiteren Interaktionspartner von FAN und nSMase 2 gesucht werden.

7 Summary

This thesis investigates the influence of the WD-Repeat proteins FAN (Factor associated with neutral Sphingomyelinase Activation) and RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) on TNF-Signalling. The structural resemblance of the protein CHS (Chediak-Higashi Symptom) to FAN, the mutated PKC (Protein-Kinase C) activity in CHS cells and the described interaction between RACK1 and FAN gave reason to take a closer look at the translocation and co-localization of RACK1 in murine cells after stimulation. No co-localization between RACK1 and PKC-beta II was seen in murine embryonic fibroblasts and murine NK-cells after PMA stimulation of PKC and antibody-incubation. After over-expression of PKC-beta-II-EGFP the translocation of PKC to the plasma membrane could be shown, but no co-localization of RACK1 was seen. TNF Stimulation did not seem to cause a change in the distribution of PKC or RACK1 no matter if FAN was present or not. There was no unregulated phosphorylation of RACK1 after TNF-stimulation which is another indication that TNF-stimulation does not activate the PKC in murine fibroblasts.

The interaction of RACK1 with Actin could be observed, after TNF-stimulation there is a different co-localization, this difference is not FAN dependent.

The mapping of interacting domains of FAN and RACK1 as shown in the yeast-two-hybrid system and co-immunoprecipitation revealed the importance of WD7 of RACK1. In relation to preceding experiments of the group this shows the importance of WD 5-7 for the interaction of FAN and RACK1.

Over expression of nSMase2 in murine Fibroblasts revealed a changed phenotype, but so far no hint of senescence could be observed.

Interaction studies of FAN and nsMase2 using the yeast-two-hybrid system, co-immunoprecipitation and the laser scanning microscope showed no direct interaction of these two proteins in spite of the described influence of FAN on the activation of nSMase2. The missing link in this chain has yet to be found.

8 Literatur

Abo T., Roder J.C., Abo W., Cooper M.D., & Balch C.M. (1982) Natural killer (HNK-1+) cells in Chediak-Higashi patients are present in normal numbers but are abnormal in function and morphology. *J.Clin.Invest* **70**, 193-197.

Adam D., Adam-Klages S., & Kronke M. (1995) Identification of p55 tumor necrosis factor receptor-associated proteins that couple to signaling pathways not initiated by the death domain. *J.Inflamm.* **47**, 61-66.

Adam D., Wiegmann K., Adam-Klages S., Ruff A., & Kronke M. (1996) A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J.Biol.Chem.* **271**, 14617-14622.

Adam-Klages S., Adam D., Wiegmann K., Struve S., Kolanus W., Schneider-Mergener J., & Kronke M. (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**, 937-947.

Adam-Klages S., Schwandner R., Adam D., Kreder D., Bernardo K., & Kronke M. (1998) Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J.Leukoc.Biol.* **63**, 678-682.

Ameloot P., Fiers W., De Bleser P., Ware C.F., Vandenabeele P., & Brouckaert P. (2001) Identification of tumor necrosis factor (TNF) amino acids crucial for binding to the murine p75 TNF receptor and construction of receptor-selective mutants. *J.Biol.Chem.* **276**, 37426-37430.

Baud V. & Karin M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* **11**, 372-377.

Becker K.P. & Hannun Y.A. (2004) Isoenzyme-specific translocation of protein kinase C (PKC)betaII and not PKCbetaI to a juxtannuclear subset of recycling endosomes: involvement of phospholipase D. *J.Biol.Chem.* **279**, 28251-28256.

Beutler B. & Cerami A. (1986) Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* **320**, 584-588.

Brady R.O., Kanfer J.N., Mock M.B., & Fredrickson D.S. (1966) The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **55**, 366-369.

Brandon N.J., Jovanovic J.N., Smart T.G., & Moss S.J. (2002) Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. *J.Neurosci.* **22**, 6353-6361.

Brandt D., Gimona M., Hillmann M., Haller H., & Mischak H. (2002) Protein kinase C induces actin reorganization via a Src- and Rho-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* **277**, 20903-20910.

Brent R. & Ptashne M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**, 729-736.

Buensuceso C.S., Woodside D., Huff J.L., Plopper G.E., & O'Toole T.E. (2001) The WD protein Rack1 mediates protein kinase C and integrin-dependent cell migration. *J.Cell Sci.* **114**, 1691-1698.

Chang B.Y., Chiang M., & Cartwright C.A. (2001) The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J.Biol.Chem.* **276**, 20346-20356.

Chang B.Y., Conroy K.B., Machleder E.M., & Cartwright C.A. (1998) RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. *Mol.Cell Biol.* **18**, 3245-3256.

Cox E.A., Bennin D., Doan A.T., O'Toole T., & Huttenlocher A. (2003) RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol.Biol.Cell* **14**, 658-669.

Cui S.H., Tanabe F., Terunuma H., Iwatani Y., Nunoi H., Agematsu K., Komiyama A., Nomura A., Hara T., Onodera T., Iwata T., & Ito M. (2001) A thiol proteinase inhibitor, E-64-d, corrects the abnormalities in concanavalin A cap formation and the lysosomal enzyme activity in leucocytes from patients with Chediak-Higashi syndrome by reversing the down-regulated protein kinase C activity. *Clin.Exp.Immunol.* **125**, 283-290.

De Lozanne A. (2003) The role of BEACH proteins in Dictyostelium. *Traffic.* **4**, 6-12.

Del Sal G., Manfioletti G., & Schneider C. (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9878.

Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., & . (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 9363-9367.

Dinarello C.A., Cannon J.G., Wolff S.M., Bernheim H.A., Beutler B., Cerami A., Figari I.S., Palladino M.A., Jr., & O'Connor J.V. (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J.Exp.Med.* **163**, 1433-1450.

Dorn G.W. & Mochly-Rosen D. (2002) Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu.Rev.Physiol* **64**, 407-429.

Doukas J. & Pober J.S. (1990) Lymphocyte-mediated activation of cultured endothelial cells (EC). CD4+ T cells inhibit EC class II MHC expression despite secreting IFN-gamma and increasing EC class I MHC and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J.Immunol.* **145**, 1088-1098.

Duan R.D., Nyberg L., & Nilsson A. (1995) Alkaline sphingomyelinase activity in rat gastrointestinal tract: distribution and characteristics. *Biochim.Biophys.Acta* **1259**, 49-55.

Duh E.J., Maury W.J., Folks T.M., Fauci A.S., & Rabson A.B. (1989) Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 5974-5978.

Ferlinz K., Hurwitz R., & Sandhoff K. (1991) Molecular basis of acid sphingomyelinase deficiency in a patient with Niemann-Pick disease type A. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **179**, 1187-1191.

Fields S. & Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.

Fong Y., Moldawer L.L., Marano M., Wei H., Barber A., Manogue K., Tracey K.J., Kuo G., Fischman D.A., Cerami A., & . (1989) Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins. *Am.J.Physiol* **256**, R659-R665.

Gallina A., Rossi F., & Milanesi G. (2001) Rack1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. *Virology* **283**, 7-18.

Garcia-Higuera I., Fenoglio J., Li Y., Lewis C., Panchenko M.P., Reiner O., Smith T.F., & Neer E.J. (1996) Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* **35**, 13985-13994.

Gatt S. (1976) Magnesium-dependent sphingomyelinase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **68**, 235-241.

Goodnight J.A., Mischak H., Kolch W., & Mushinski J.F. (1995) Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J.Biol.Chem.* **270**, 9991-10001.

Guillemot F., Billault A., & Auffray C. (1989) Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 4594-4598.

He D.Y., Vagts A.J., Yaka R., & Ron D. (2002) Ethanol induces gene expression via nuclear compartmentalization of receptor for activated C kinase 1. *Mol.Pharmacol.* **62**, 272-280.

Heller M. & Shapiro B. (1966) Enzymic hydrolysis of sphingomyelin by rat liver. *Biochem.J.* **98**, 763-769.

Hermanto U., Zong C.S., Li W., & Wang L.H. (2002) RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol.Cell Biol.* **22**, 2345-2365.

Hofmann K., Tomiuk S., Wolff G., & Stoffel W. (2000) Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 5895-5900.

Holler E., Kolb H.J., Moller A., Kempeni J., Liesenfeld S., Pechumer H., Lehmacher W., Ruckdeschel G., Gleixner B., Riedner C., & . (1990) Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 1011-1016.

Huwiler A., Brunner J., Hummel R., Vervoordeldonk M., Stabel S., van den B.H., & Pfeilschifter J. (1996) Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 6959-6963.

Inoue H., Nojima H., & Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Janeway Ch., Travers P., Walport M., & Shlomchik M. (2002) *Immunologie*.

Jogl G., Shen Y., Gebauer D., Li J., Wiegmann K., Kashkar H., Kronke M., & Tong L. (2002) Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *EMBO J.* **21**, 4785-4795.

Kanfer J.N., Young O.M., Shapiro D., & Brady R.O. (1966) The metabolism of sphingomyelin. I. Purification and properties of a sphingomyelin-cleaving enzyme from rat liver tissue. *J.Biol.Chem.* **241**, 1081-1084.

Karim M.A., Nagle D.L., Kandil H.H., Burger J., Moore K.J., & Spritz R.A. (1997) Mutations in the Chediak-Higashi syndrome gene (CHS1) indicate requirement for the complete 3801 amino acid CHS protein. *Hum.Mol.Genet.* **6**, 1087-1089.

Kelliher M.A., Grimm S., Ishida Y., Kuo F., Stanger B.Z., & Leder P. (1998) The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* **8**, 297-303.

Kiely P.A., Leahy M., O'gorman D., & O'connor R. (2005) RACK1-mediated Integration of Adhesion and Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) Signaling and Cell Migration Are Defective in Cells Expressing an IGF-I Receptor Mutated at Tyrosines 1250 and 1251. *J.Biol.Chem.* **280**, 7624-7633.

Kiley S.C. & Parker P.J. (1995) Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J.Cell Sci.* **108 (Pt 3)**, 1003-1016.

Kirschnek S., Paris F., Weller M., Grassme H., Ferlinz K., Riehle A., Fuks Z., Kolesnick R., & Gulbins E. (2000) CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. *J.Biol.Chem.* **275**, 27316-27323.

Koehler J.A. & Moran M.F. (2001a) RACK1, a protein kinase C scaffolding protein, interacts with the PH domain of p120GAP. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **283**, 888-895.

Koehler J.A. & Moran M.F. (2001b) Regulation of extracellular signal-regulated kinase activity by p120 RasGAP does not involve its pleckstrin homology or calcium-dependent lipid binding domains but does require these domains to regulate cell proliferation. *Cell Growth Differ.* **12**, 551-561.

Kreder D., Krut O., Adam-Klages S., Wiegmann K., Scherer G., Plitz T., Jensen J.M., Proksch E., Steinmann J., Pfeffer K., & Kronke M. (1999) Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J.* **18**, 2472-2479.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lemmon M.A. (2004) Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem.Soc.Trans.* **32**, 707-711.

Li D. & Roberts R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol.Life Sci.* **58**, 2085-2097.

Liliental J. & Chang D.D. (1998) Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J.Biol.Chem.* **273**, 2379-2383.

Lin T., Genestier L., Pinkoski M.J., Castro A., Nicholas S., Mogil R., Paris F., Fuks Z., Schuchman E.H., Kolesnick R.N., & Green D.R. (2000) Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death. *J.Biol.Chem.* **275**, 8657-8663.

Link A.J., Eng J., Schieltz D.M., Carmack E., Mize G.J., Morris D.R., Garvik B.M., & Yates J.R., III (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat.Biotechnol.* **17**, 676-682.

Lottspeich F. & Zorbas H (1998) *Bioanalytik*.

Lüschen S., Adam D., Ussat S., Kreder D., Schneider-Brachert W., Kronke M., & Adam-Klages S. (2000) Activation of ERK1/2 and cPLA(2) by the p55 TNF receptor occurs independently of FAN. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **274**, 506-512.

- Marchesini N., Luberto C., & Hannun Y.A. (2003) Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J.Biol.Chem.* **278**, 13775-13783.
- McCahill A., Warwicker J., Bolger G.B., Houslay M.D., & Yarwood S.J. (2002) The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol.Pharmacol.* **62**, 1261-1273.
- Mochly-Rosen D., Smith B.L., Chen C.H., Disatnik M.H., & Ron D. (1995) Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: a role in beta protein kinase C mediated signal transduction. *Biochem.Soc.Trans.* **23**, 596-600.
- Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., & Smith T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300.
- Newton A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* **270**, 28495-28498.
- Nicholson D.W. & Thornberry N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 299-306.
- Nilsson A. (1969) The presence of spingomyelin- and ceramide-cleaving enzymes in the small intestinal tract. *Biochim.Biophys.Acta* **176**, 339-347.
- Nilsson J., Sengupta J., Frank J., & Nissen P. (2004) Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep.* **5**, 1137-1141.
- Nyberg L., Duan R.D., Axelson J., & Nilsson A. (1996) Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. *Biochim.Biophys.Acta* **1300**, 42-48.
- Okamoto Y., Vaena d.A., & Hannun Y.A. (2003) Functional analysis of ISC1 by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **42**, 7855-7862.
- Okazaki T., Bielawska A., Domae N., Bell R.M., & Hannun Y.A. (1994) Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J.Biol.Chem.* **269**, 4070-4077.
- Osborn L., Kunkel S., & Nabel G.J. (1989) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2336-2340.
- Perou C.M., Leslie J.D., Green W., Li L., Ward D.M., & Kaplan J. (1997) The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein. *J.Biol.Chem.* **272**, 29790-29794.

- Rao B.G. & Spence M.W. (1976) Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *J.Lipid Res.* **17**, 506-515.
- Rodriguez M.M., Ron D., Touhara K., Chen C.H., & Mochly-Rosen D. (1999) RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry* **38**, 13787-13794.
- Ron D., Chen C.H., Caldwell J., Jamieson L., Orr E., & Mochly-Rosen D. (1994) Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 839-843.
- Ron D., Jiang Z., Yao L., Vagts A., Diamond I., & Gordon A. (1999a) Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIPKC. *J.Biol.Chem.* **274**, 27039-27046.
- Ron D. & Kazanietz M.G. (1999b) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13**, 1658-1676.
- Ron D., Luo J., & Mochly-Rosen D. (1995a) C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *J.Biol.Chem.* **270**, 24180-24187.
- Ron D. & Mochly-Rosen D. (1995b) An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 492-496.
- Sawai H., Domae N., Nagan N., & Hannun Y.A. (1999) Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *J.Biol.Chem.* **274**, 38131-38139.
- Schechtman D. & Mochly-Rosen D. (2002) Isozyme-specific inhibitors and activators of protein kinase C. *Methods Enzymol.* **345**, 470-489.
- Scheurich P., Thoma B., Ucer U., & Pfizenmaier K. (1987) Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *J.Immunol.* **138**, 1786-1790.
- Schütze S., Nottrott S., Pfizenmaier K., & Kronke M. (1990) Tumor necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C. *J.Immunol.* **144**, 2604-2608.
- Schütze S., Potthoff K., Machleidt T., Berkovic D., Wiegmann K., & Kronke M. (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* **71**, 765-776.
- Schwandner R., Wiegmann K., Bernardo K., Kreder D., & Kronke M. (1998) TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J.Biol.Chem.* **273**, 5916-5922.

- Sengupta J., Nilsson J., Gursky R., Spahn C.M., Nissen P., & Frank J. (2004) Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **11**, 957-962.
- Smith R.A., Kirstein M., Fiers W., & Baglioni C. (1986) Species specificity of human and murine tumor necrosis factor. A comparative study of tumor necrosis factor receptors. *J.Biol.Chem.* **261**, 14871-14874.
- Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., & Neer E.J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem.Sci.* **24**, 181-185.
- Sondek J., Bohm A., Lambright D.G., Hamm H.E., & Sigler P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* **379**, 369-374.
- Spence M.W., Byers D.M., Palmer F.B., & Cook H.W. (1989) A new Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J.Biol.Chem.* **264**, 5358-5363.
- Stebbins E.G. & Mochly-Rosen D. (2001) Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *J.Biol.Chem.* **276**, 29644-29650.
- Steele M.R., McCahill A., Thompson D.S., MacKenzie C., Isaacs N.W., Houslay M.D., & Bolger G.B. (2001) Identification of a surface on the beta-propeller protein RACK1 that interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Cell Signal.* **13**, 507-513.
- Stoffel W., Jenke B., Block B., Zumbansen M., & Koebke J. (2005) Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 4554-4559.
- Tcherkasowa A.E., Adam-Klages S., Kruse M.L., Wiegmann K., Mathieu S., Kolanus W., Kronke M., & Adam D. (2002) Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor. *J.Immunol.* **169**, 5161-5170.
- Thornton C., Tang K.C., Phamluong K., Luong K., Vagts A., Nikanjam D., Yaka R., & Ron D. (2004) Spatial and temporal regulation of RACK1 function and N-methyl-D-aspartate receptor activity through WD40 motif-mediated dimerization. *J.Biol.Chem.* **279**, 31357-31364.
- Tomiuk S., Hofmann K., Nix M., Zumbansen M., & Stoffel W. (1998) Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 3638-3643.
- Tomiuk S., Zumbansen M., & Stoffel W. (2000) Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *J.Biol.Chem.* **275**, 5710-5717.

- Touhara K., Inglese J., Pitcher J.A., Shaw G., & Lefkowitz R.J. (1994) Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J.Biol.Chem.* **269**, 10217-10220.
- Vagts A.J., He D.Y., Yaka R., & Ron D. (2003) Cellular adaptation to chronic ethanol results in altered compartmentalization and function of the scaffolding protein RACK1. *Alcohol Clin.Exp.Res.* **27**, 1599-1605.
- Venable M.E., Lee J.Y., Smyth M.J., Bielawska A., & Obeid L.M. (1995) Role of ceramide in cellular senescence. *J.Biol.Chem.* **270**, 30701-30708.
- Wall M.A., Coleman D.E., Lee E., Iniguez-Lluhi J.A., Posner B.A., Gilman A.G., & Sprang S.R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**, 1047-1058.
- Ward D.M., Griffiths G.M., Stinchcombe J.C., & Kaplan J. (2000) Analysis of the lysosomal storage disease Chediak-Higashi syndrome. *Traffic.* **1**, 816-822.
- Ward D.M., Shiflett S.L., Huynh D., Vaughn M.B., Prestwich G., & Kaplan J. (2003) Use of expression constructs to dissect the functional domains of the CHS/beige protein: identification of multiple phenotypes. *Traffic.* **4**, 403-415.
- Yaka R., Thornton C., Vagts A.J., Phamluong K., Bonci A., & Ron D. (2002) NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 5710-5715.
- Yarwood S.J., Steele M.R., Scotland G., Houslay M.D., & Bolger G.B. (1999) The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J.Biol.Chem.* **274**, 14909-14917.
- Yocum D.E., Esparza L., Dubry S., Benjamin J.B., Volz R., & Scuderi P. (1989) Characteristics of tumor necrosis factor production in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* **122**, 131-145.
- Zumbansen M. & Stoffel W. (2002) Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease. *Mol.Cell Biol.* **22**, 3633-3638.

9 Danksagung

Bei Prof. Dr. Wolfgang Blaschek möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Adam für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Dem Direktor des Instituts für Immunologie, Herrn Prof. Dr. Dietrich Kabelitz, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsraumes und für seine Unterstützung.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Sabine M., ohne sie wäre im Labor doch einiges schwieriger gewesen. Arne sei an dieser Stelle noch mal für seine Einführung in die Molekularbiologie gedankt und Lutz für seine praktischen Tipps und Späßchen im Labor. An Markus, Maren und Susann geht ein Dank für das nette Chaos im gemeinsamen Schreibraum.

Ein Dank geht auch an die Arbeitsgruppenmitglieder Heike und Susan und die anderen „Adams“ Sandra und Gudrun. Dabei danke ich Gudrun ganz besonders für ihre Hilfe mit den Mäusen.

Dr. Marie-Luise Kruse sei an dieser Stelle für die Anfertigung der LSM-Bilder gedankt, die der Arbeit doch einiges „an Farbe“ verliehen haben.

Bei allen anderen Kollegen bedanke ich mich für die angenehme Zeit am Institut, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung.

Meinen Freundinnen Imke und Astrid möchte ich für die schöne Zeit während des Studiums und der Promotion danken und dafür, dass sie mir mit ihren Promotionen mit gutem Beispiel vorangegangen sind.

Astrid und Ole danke ich für die Mails aus der nahen und sehr weiten Ferne, die mir das Sitzen vor dem Bildschirm doch einige Male sehr viel netter gestaltet haben.

Ein Dank geht auch an Lars für seine immerwiederkehrende Seitenzahlabfrage.

Imke, Sabine, Lothar und Anna danke ich für das besonders genaue und unverblünte Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, deren Unterstützung und Rückhalt ich es verdanke, dass ich jetzt diese letzten Seiten meiner Dissertation schreiben kann.

10 Lebenslauf

Name:	Eva Keller
Adresse:	Metzstraße 49 24116 Kiel
Geburtstag:	1. Juli 1974
Geburtsort:	Stade
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Ausbildung:	
New Zealand Bursary	Dezember 1991
Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Vincent-Lübeck-Schule, Stade	Juli 1994
Ausbildung zur Chemielaborantin DOW Deutschland, Inc. Stade	August 1994-Juli 1996
Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	Oktober 1996-Oktober 2000
Praktisches Jahr	Januar 2001-Dezember 2001
Approbation zur Apothekerin	Januar 2002
Beginn der Promotion im Institut für Immunologie UK S-H, Campus Kiel	Juni 2002

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer - und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.