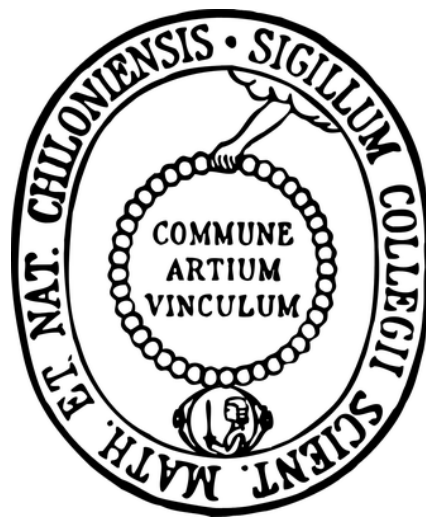


Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der N-SMase- Signaltransduktion



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

vorgelegt von
Malte Puchert
Kiel
2011

Referent: Professor Dr. Dieter Adam

Koreferent: Professor Dr. Dr. Thomas C. G. Bosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 11. 2011

Zum Druck genehmigt: 22. 11. 2011

gez. Professor Dr. Lutz Kipp, Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Tumor Nekrose Faktor-Signaltransduktion	1
1.2 Die Sphingomyelinasen	3
1.2.1 Neutrale Sphingomyelinasen	5
1.3 TNF-induzierte N-SMase-Signaltransduktion	8
1.4 Embryonic Ectoderm Development	9
1.5 Integrine und integrinassoziierte Moleküle als mögliche Bestandteile der N-SMase-Signaltransduktion	10
1.6 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien und Geräte	13
2.1.2 Antikörper, siRNAs, cDNA-Klone und Primer	17
2.1.3 Vektoren	20
2.1.4 Medien für Bakterien und Hefen	21
2.1.5 Zelllinien, Hefe- und Bakterienstämme	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Generierung von chemisch kompetenten Bakterien	25
2.2.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	25
2.2.3 Plasmidisolation aus Bakterien	26
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.5 Klonierung von cDNA-Sequenzen in Expressionsvektoren	27
2.2.6 Das Prinzip des Yeast Two-Hybrid-Systems	28
2.2.7 Transformation von Hefezellen und Selektion auf Agarplatten	29
2.2.8 Plasmidisolation aus Hefezellen	30
2.2.9 DNA-Sequenzierung	31
2.2.10 Nukleofektion von Jurkat-Zellen	31
2.2.11 Calcium-Phosphat-Transfektion	32

2.2.12	Zellyse und BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.2.13	Isolierung von Membran-, Zytosol- und Nukleusfraktionen aus Jurkat-Zellen	33
2.2.14	Koimmunpräzipitation	33
2.2.15	SDS-PAGE und Western Blot	34
2.2.16	Immunfluoreszenzen	35
2.2.17	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	37
2.2.18	N-SMase-Aktivitätsmessungen	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	EED ist das letzte noch fehlende Glied im Signalweg vom TNF-R1 zur nSMase2	38
3.1.1	FAN und RACK1 sind keine direkten Bindungspartner der nSMase2	38
3.1.2	TNF induziert die Translokation von überexprimiertem EED ins Zytoplasma und an die Zellmembran	39
3.1.3	TNF induziert die Translokation von endogenem EED ins Zytoplasma und an die Zellmembran	40
3.1.4	EED-Translokation wird durch die N-SMase-Aktivierungsdomäne vermittelt	44
3.1.5	TNF induziert Kolokalisation von EED und nSMase2 in EED/nSMase2-überexprimierenden Zellen	44
3.1.6	TNF induziert Kolokalisation von endogenem EED und endogener nSMase2	46
3.1.7	TNF induziert Kolokalisation von endogenem EED und endogenem RACK1	48
3.1.8	EED kann mit RACK1 und nSMase2 koimmunpräzipitiert werden und ist ein Bestandteil des TNF-R1-Komplexes	50
3.1.9	EED wird für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 benötigt	51
3.1.10	Überexpression von konstitutiv membrangebundenem EED und EED-Einzeldomänen ist nicht ausreichend für die Aktivierung der nSMase2	53
3.2	Integrin-beta-Untereinheiten sind Komponenten der TNF-induzierten nSMase2-Signaltransduktion	55

3.2.1	ITGB1, ITGB2, ITGB5 und ITGB7 sind membranständige Komponenten von Jurkat-Zellen	55
3.2.2	Integrine sind an der TNF-induzierten Aktivierung der nSMase2 beteiligt	57
3.3	Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern der nSMase2	60
3.3.1	Yeast Two-Hybrid Screen mit der vollständigen nSMase2 als Köderprotein	60
3.3.1.1	Die erhaltenen Beuteproteine des Yeast Two-Hybrid Screens mit der vollständigen nSMase2	61
3.3.2	Yeast Two-Hybrid Screens mit Einzeldomänen der nSMase2 als Köderproteine	63
3.3.2.1	Yeast Two-Hybrid Screen mit der regulatorischen Domäne der nSMase2 als Köderprotein	63
3.3.2.2	Yeast Two-Hybrid Screen mit der katalytischen Domäne der nSMase2 als Köderprotein	65
3.3.2.2.1	Auswahl von interessanten Kandidaten aus dem Y2H-Screen mit der katalytischen Domäne der nSMase2 für Folgeuntersuchungen	69
3.3.2.2.2	p27BBP, LAMR1, PKC ζ , COPB1, RBBP7 und AFTPH binden im Y2H-System an die katalytische Domäne der nSMase2 und an die vollständige nSMase2	69
3.3.3	p27BBP und die nSMase2 kolokalisieren TNF-unabhängig in humanen Zellen	72
3.3.4	p27BBP und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden	76
3.3.5	p27BBP und RACK1 können koimmunpräzipitiert werden	77
3.3.6	p27BBP ist an der TNF-induzierten Aktivierung der nSMase2 beteiligt	79
3.3.7	LAMR1 und die nSMase2 kolokalisieren TNF-unabhängig in humanen Zellen	81
3.3.8	LAMR1 und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden	84
3.3.9	RACK1 kann mit LAMR1 koimmunpräzipitiert werden	85
3.3.10	LAMR1 wird nicht für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 benötigt	87

3.3.11	PKC ζ und die nSMase2 kolokalisieren TNF-unabhängig in humanen Zellen	89
3.3.12	PKC ζ und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden	92
3.3.13	PKC ζ und RACK1 können nicht koimmunpräzipitiert werden	93
3.3.14	COPB1 und die nSMase2 kolokalisieren im Bereich des Golgi-Apparats	95
3.3.15	COPB1 kann mit der nSMase2 koimmunpräzipitiert werden	98
3.3.16	COPB1 und RACK1 können nicht koimmunpräzipitiert werden	99
3.3.17	COPB1 wird nicht für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 benötigt	100
4. Diskussion		102
4.1	Ein membranassoziierter Multimolekülkomplex ist für TNF-induzierte nSMase2-Aktivierung verantwortlich	102
4.2	Die nSMase2 als mögliches Schlüsselenzym bei TNF-/Ceramidinduzierter PKC ζ -Aktivierung	104
4.3	Die nSMase2 und Adhäsionskomplexe interagieren bei teilweise gegensätzlichen Prozessen im Rahmen von Proliferationsereignissen und Krebserkrankungen	107
4.4	nSMase2-Signaltransduktion und HIV	110
5. Zusammenfassung und Ausblick		113
6. Summary and perspectives		114
7. Literaturverzeichnis		115
Danksagung		126
Lebenslauf		127
Eidesstattliche Erklärung		128
Anhang		129

Abkürzungsverzeichnis

37LRP	37 kDa laminin receptor precursor
67LR	67 kDa laminin receptor
AFTPH	Aftiphilin
aPKC	atypische Proteinkinase C
APL	anionisches Phospholipid
A-SMase	saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all-trans retinoic acid
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
CCA1 (Protein), cca1 (Gen)	confluent cell-associated 1
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CKB	creatine kinase, brain
COP1	coatmer protein complex 1
COPB1 (= β -COP)	coatmer protein complex, subunit beta 1
CPHD	hypothalamusinduzierte kombinierte Hypophysenhormondefizienz
CPIA	Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol
cPKC	klassische Proteinkinase C
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DD	Todesdomäne (death domain)
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EED	embryonic ectoderm development
EGCG	epigallocatechin-3-0-gallate
EIF6	eukaryotic translation initiation factor 6
EZH2	enhancer of zeste, homolog 2
EZM	Extrazelluläre Matrix
FADD	Fas-associated death domain
FAN	factor associated with neutral sphingomyelinase activation
Gal ⁺	Galactose-supplementiert
Glc ⁺	Glucose-supplementiert
H	Histidin-defizient
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIST3H2A	histone cluster 3, H2A
HIV	humanes Immundefizienzvirus
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IP	Immunpräzipitation
ITGB1/2/3/4/5/7	Integrin β 1/2/3/4/5/7

Abkürzungsverzeichnis

JNK	c-jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Koimmunpräzipitation
L ⁻	Leucin-defizient
LAMR1	laminin receptor 1
LB	lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharide
L-SMase	lysosomale Sphingomyelinase
LT	Lymphotoxin
MA-nSMase	mitochondrienassoziierte Sphingomyelinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF-κB	nuclear factor kappa B
NP-40	Nonidet P-40
NSD	Neutrale-Sphingomyelinase-Aktivierungsdomäne
N-SMase	neutrale Sphingomyelinase
nSMase1/2/3	neutrale Sphingomyelinase 1/2/3
nSMase2CD	katalytische Domäne der nSMase2
nSMase2RD	regulatorische Domäne der nSMase2
OD	optische Dichte
p27BBP	p27 beta-4 integrin-binding protein
p38MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween®
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGK1	phosphoglycerate kinase 1
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PKCα, PKCε, PKCλ, PKCζ	Proteinkinase C α, ε, λ, ζ
PRC	polycomb repressive complex
pro-aSMase	Vorstufe der sauren Sphingomyelinasen
RA	Raffinose
RACK1	receptor for activated C kinase 1
RB	retinoblastoma
RBBP7	retinoblastoma binding protein 7
RIP	receptor interacting protein
RNase	Ribonuklease
RPM	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
S6K	ribosomal S6 kinase
SCE	Sorbitol-Citrat-EDTA
SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SMPD1/2/3/4 (Protein), smpd1/2/3/4 (Gen)	Sphingomyelinphosphodiesterase 1/2/3/4
SOB, SOC	Super Optimal Broth, SOB with catabolite repression

Abkürzungsverzeichnis

S-SMase	sekretorische Sphingomyelinase
SUZ12	suppressor of zeste 12
SYK	spleen tyrosine kinase
TACE	tumor necrosis factor- α converting enzyme
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N' N'-Tetramethylethylendiamin
TNE	Tris-NP-40-EDTA
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R1/2	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1/2
TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1
TRADD	TNF-R-associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U ⁻	Uracil-defizient
uPA	urokinase plasminogen activator
USP14	ubiquitin specific peptidase 14
UV	ultraviolett
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
W ⁻	Tryptophan-defizient
WAIT-1	WD repeat protein interacting with integrin tails-1
WB	Western Blot
WD-Repeat	Tryptophan-Aspartat-terminierte Struktur
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid
X-Gal ⁺	X-Gal-supplementiert
Y2H	Yeast Two-Hybrid

1. Einleitung

1.1 Tumor Nekrose Faktor-Signaltransduktion

Die Tumor Nekrose Faktor-Familie umfasst eine Gruppe von Zytokinen, deren prominentestes Mitglied ursprünglich als Krebszellen tötendes Molekül bekannt wurde (Aggarwal, 2003). Fast ein Jahrhundert vor der Identifizierung des humanen Tumor Nekrose Faktors beobachtete der deutsche Arzt Paul von Bruns spontane Rückbildungen von menschlichen Tumoren nach bakteriellen Infektionen (Bruns, 1887). Einige Jahre später gelang es William Coley, den gleichen Effekt zu erzielen, indem er Patienten ein Gemisch aus verschiedenen Bakterien, das „Coley’s Toxin“, verabreichte. Diese Therapie führte allerdings nicht selten zum Tod durch Fieber oder Sepsis (Coley, 1893, 1896). Erst im Jahr 1944 konnten Shear et al. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) als Auslöser der krebstötenden Phänomene identifizieren und weitere 19 Jahre danach postulierten O’Malley et al. die Existenz eines durch LPS aktivierbaren „tumornekrotisierenden Faktors“ im Blutserum (Aggarwal, 2003). Wenig später wurde Lymphotoxin (LT), ein Tumorzellen tötendes Protein aus Lymphozyten, beschrieben (Williams et al., 1968) und 1984 konnte der humane Tumor Nekrose Faktor (TNF) erstmals kloniert werden (Pennica et al., 1984). Aufgrund der dreißigprozentigen Sequenzhomologie von TNF und LT wurde TNF fortan auch als Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und LT als TNF- β bezeichnet. Die Beschreibung von TNF und LT legte den Grundstein für die Analyse der TNF-Superfamilie, die bislang 19 bekannte Mitglieder mit 29 korrespondierenden Rezeptoren umfasst (Aggarwal, 2003).

Der namensgebende Tumor Nekrose Faktor α und seine vielfältigen Aufgaben sind bisher am besten untersucht. Zu seinen Funktionen zählt einerseits die Initiation von Zelldifferenzierung und -proliferation sowie andererseits von Apoptose. Die ursprünglich beobachtete Tumorzellen abtötende Eigenschaft beruht also nicht auf klassischer (unprogrammierter) Nekrose (Locksley et al., 2001), so dass TNF eigentlich einen „Tumor Apoptose Faktor“ darstellt.

TNF wird vor allem von hämatopoietischen Zellen wie Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und Monozyten sezerniert und ist ein wichtiger Regulator des Immunsystems (Locksley et al., 2001). Das Zytokin ist an der Morphogeneseregulation sekundärer lymphatischer Organe (Lymphknoten, Milz etc.) beteiligt, lässt B-Lymphozyten proliferieren und unterstützt die Funktion zytotoxischer Effektorzellen bei der Erkennung und Zerstörung

Einleitung

virusbefallener Zellen (Aggarwal, 2003). TNF spielt eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung pathogener Prokaryonten, wie Listerien und Mykobakterien, durch Makrophagen (Gardam et al., 2003).

Eine TNF-Überproduktion kann andererseits aber auch zu teilweise lebensgefährlichen Entzündungsreaktionen bis hin zum septischen Schock führen. Zudem ist TNF an verschiedenen Autoimmun- und Allergierkrankungen wie Morbus Crohn, Psoriasis und Asthma beteiligt (Aggarwal et al., 2002). Ein Einsatz von TNF als Krebstherapeutikum ist aufgrund seiner potentiellen systemischen Toxizität also nicht indiziert.

Das Zytokin wird von der sezernierenden Zelle als Pro-TNF hergestellt, ein in der Plasmamembran lokalisiertes Transmembranprotein von 26 kDa. Durch proteolytische Spaltung mittels TACE (tumor necrosis factor- α converting enzyme) wird das 17 kDa große reife TNF gebildet, welches sich zu Homotrimeren von 51 kDa zusammenfügt und schließlich von der Zelle freigesetzt wird (Moss et al, 1997; Tang et al., 1996).

Für die Übermittlung der TNF-induzierten Prozesse ins Innere der jeweiligen Zielzellen sind zwei plasmamembrandurchspannende Rezeptoren von 55 und 75 kDa verantwortlich, der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und der TNF-R2. Der Großteil der TNF-abhängigen Signaltransduktionskaskaden wird durch die Bindung von TNF an TNF-R1 initiiert. Von den beschriebenen proteinbindenden Domänen in der zytoplasmatischen Region des TNF-R1 ist die ca. 80 Aminosäuren lange Todesdomäne (DD, death domain) für die Mehrheit der bislang beschriebenen Funktionen zuständig (Wajant, 2003).

Durch die Bindungen des ebenfalls Todesdomänen beinhaltenden Interaktionspartners TRADD (TNF-R-associated death domain) an die DD des TNF-R1 und von FADD (Fas-associated death domain) an TRADD kommt es zur Rekrutierung und Spaltung/Aktivierung der Procaspase 8 und somit zur Apoptose (Aggarwal, 2003). Ein weiteres durch die Todesdomäne des TNF-R1 aktiviertes, an der Initiation von Zelltod beteiligtes Enzym ist die saure Sphingomyelinase (s. Kapitel 1.2), während die TNF-induzierte Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase (s. Kapitel 1.3) durch eine gesonderte Domäne des TNF-R1 vermittelt wird (Adam et al., 1996; s. Abb.1).

Es wurde beobachtet, dass der aktivierte TNF-R1-Komplex innerhalb von Minuten durch die Bildung clathrinbeschichteter Vesikel endozytiert werden kann. TRADD, FADD, Caspase 8 und die saure Sphingomyelinase wurden bereits als Bestandteile solcher TNF-Rezeptosomen beschrieben (Schneider-Brachert et al., 2004).

Die Einleitung von Entzündungsreaktionen nach TNF-Bindung an den TNF-R1 funktioniert durch TRADD-vermittelte Rekrutierung von verschiedenen Adaptorproteinen wie TRAF2

Einleitung

(TNF receptor-associated factor 2) oder RIP (receptor interacting protein) zum TNF-Rezeptor. Dadurch kommt es zur Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Wajant et al., 2003; Aggarwal, 2003; s. Abb.1).

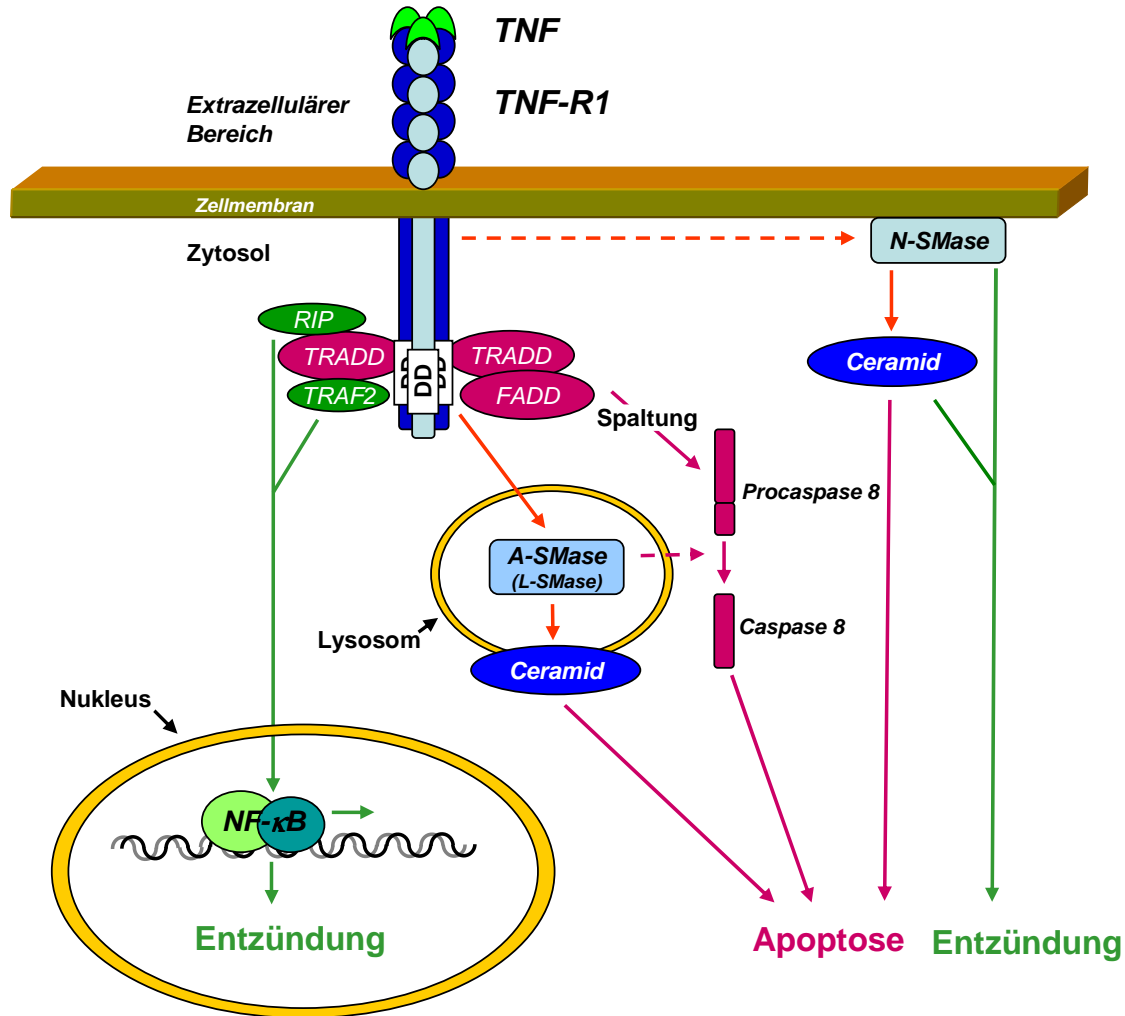


Abb.1 : Signaltransduktion durch Bindung von TNF an TNF-R1. Erläuterungen sind Kapitel 1.1, 1.2 und 1.2.1 zu entnehmen.

1.2 Die Sphingomyelinasen

Sphingomyelinasen (SMasen) gehören zu den Phosphodiesterasen aus der Gruppe der Typ-C-Phospholipasen, welche Sphingomyelin (SM) zu Phosphocholin und Ceramid hydrolysieren (s. Abb. 2). Stressinduzierte und zytokinvermittelte Ceramidproduktion wird zum größten Anteil durch SMasen bewerkstelligt (Clarke et al., 2011a).

Sphingomyeline sind membrangebundene Phospholipide. Sphingolipide werden mit verschiedenen humanen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht, wie beispielsweise

Einleitung

neurologische, metabolische und Krebserkrankungen sowie Immundefekte (Zeidan und Hannun, 2007). Bei Ceramiden handelt es sich um aus Sphingosin und einer Fettsäure bestehende sekundäre Botenstoffe, die an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt sind. Dazu zählen Entzündungsreaktionen, Zellwachstumsarrest, Zelldifferenzierung, -alterung, -migration und -adhäsion sowie Zelltod. (Hannun und Obeid, 2008). Ceramide binden unter anderem an Proteinkinase C ζ , um einen proapoptotischen Komplex zu bilden (Wang et al., 2005).

Es gibt drei Klassen von Sphingomyelinasen, die anhand des pH-Optimums ihrer Enzymaktivität unterschieden werden: saure, neutrale und alkalische SMasen. Beim Menschen sind bislang fünf Gene beschrieben worden, die für eine alkalische, zwei saure (A-SMasen) und drei neutrale Sphingomyelinasen (N-SMasen) kodieren (Schissel et al., 1998; Clarke et al., 2011a).

Die alkalische SMase ist vor allem im basischen Milieu des Dünndarms aktiv (Duan et al., 1995). Das A-SMase-Gen *smpd1* (sphingomyelin phosphodiesterase 1) kodiert für das Protein pro-aSMase, welches zu zwei unterschiedlichen A-SMasen heranreift, der endo- bzw. lysosomalen L-SMase und der sekretorischen S-SMase (Schissel et al., 1998). A-SMase-Defizienz führt unter anderem zum Niemann-Pick-Syndrom, bei dem es zu Organdefekten durch Sphingomyelinanreicherungen kommt (Clarke et al., 2011a). Neutrale SMase-Aktivität wurde initial in Niemann-Pick-Patienten entdeckt, die trotz A-SMase-Defekt Sphingomyelin bei neutralem pH umsetzen konnten (Schneider und Kennedy, 1967).

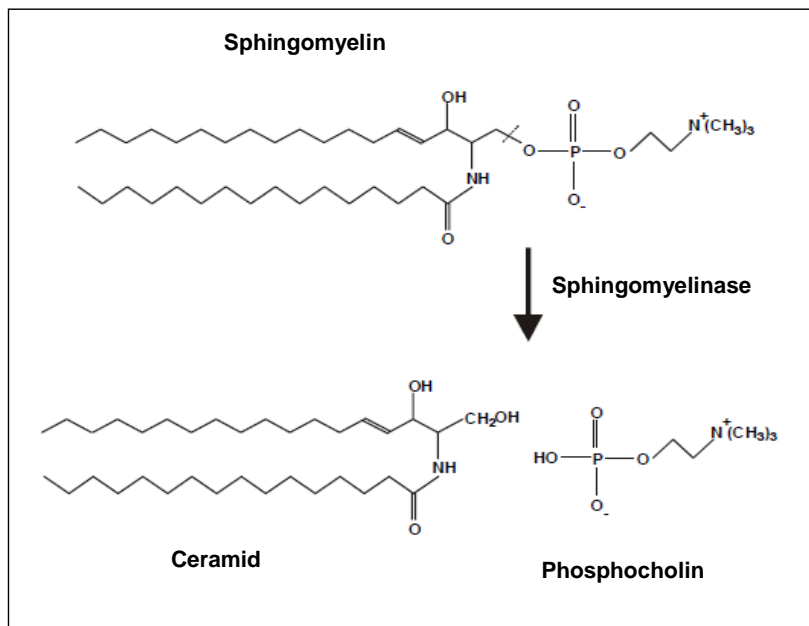


Abb. 2: Spaltung von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin. Verändert nach Zumbansen, 2001

1.2.1 Neutrale Sphingomyelinasen

Neutrale Sphingomyelinasen stellen eine ubiquitär benötigte Enzymgruppe dar, die über das Tierreich hinaus auch bei Pilzen und sogar bei Prokaryonten nachzuweisen sind. Auf molekularer Ebene sind die verschiedenen N-SMasen allerdings wenig homolog (Yamada et al., 1988; Clarke et al, 2011a). Obwohl neutrale SMase-Aktivität in menschlichen Geweben bereits seit den sechziger Jahren bekannt ist (Schneider und Kennedy, 1967), konnte erst 30 Jahre später die erste N-SMase aus Säugern kloniert werden (Tomiuk et al., 1998). Die Mg^{2+} -abhängige neutrale Sphingomyelinase 1 (nSMase1), auch Sphingomyelinphosphodiesterase 2 (SMPD2) genannt, zeigte *in vitro* SMase-Aktivität, stellte sich aber *in vivo* als lyso-PAF-Phospholipase heraus, die unter physiologischen Bedingungen lyso-PAF anstelle von Sphingomyelin als Substrat umsetzt (Sawai et al., 1999).

Zwei Jahre nach der nSMase1 wurde eine weitere Mg^{2+} -abhängige neutrale SMase kloniert, die nSMase2 oder SMPD3. Das *smpd3*-Gen kodiert sowohl in der Maus als auch im Menschen für ein Protein von 655 Aminosäuren und 71 kDa. Die nSMase2 besteht aus einer für N-SMasen charakteristischen C-terminalen katalytischen Domäne und einer kollagenähnlichen regulatorischen Domäne mit zwei N-terminalen membranassoziierten hydrophoben Segmenten (Hofmann et al., 2000; s. Abb. 3).

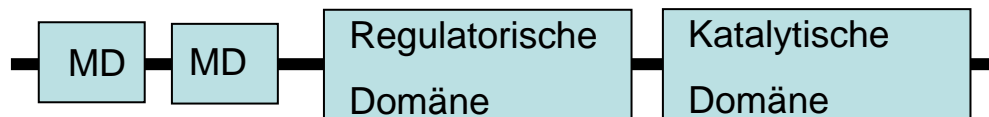


Abb. 3: Domänenstruktur der nSMase2. MD: membranassoziierte Domäne

Dieses Enzym stellte sich als echte Sphingomyelinase ohne lyso-PAF-Affinität heraus, die unter pH-neutralen Bedingungen (pH-Optimum: 7,4) *in vitro* und *in vivo* Sphingomyelin hydrolysiert. Sie entspricht somit der biochemisch charakterisierten N-SMase (Marchesini et al., 2003, Clarke et al., 2006).

Die nSMase2-Knockout-Maus zeichnet sich unter anderem durch schwere Wachstums- und Knochenbildungsstörungen aus. Außerdem zeigt sie verzögerte Geschlechtsreife aufgrund einer hypothalamusinduzierten kombinierten Hypophysenhormondefizienz (CPHD). Die nSMase2 wird in dem Zusammenhang als essentiell für die korrekte Funktion der hypothalamischen neurosekretorischen Nervenzellen betrachtet (Stoffel et al., 2005).

Einleitung

Durch Experimente mit menschlichen neuronalen Zellen wurde die nSMase2 zudem mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht. Die Verringerung der nSMase2-Expression durch RNA-Interferenz verhinderte in Zellkultur die zytotoxischen Auswirkungen der (bei Alzheimer-Patienten im Gehirn abgelagerten) β -Amyloide. Zudem nahm deren Bildung und Sekretion durch pharmakologische nSMase2-Inhibition deutlich ab (Clarke et al., 2006).

Aufgrund ihrer hohen Expression in Zellen des Zentralen Nervensystems wurde die nSMase2 ursprünglich im Gehirn identifiziert und darauf in diversen anderen Zelltypen, zunächst intrazellulär im Bereich des Golgi-Apparats. (Hofmann et al., 2000, Stoffel et al., 2005, Gassert et al, 2009). Das Enzym ist außerdem im Zytoplasma endosomenassoziiert und an der Zellmembran lokalisiert. Dank ihrer N-terminalen hydrophoben Domänen, die sich fest in der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran verankern können, ist die sphingomyelinhaltige Zellmembran wahrscheinlich die wichtigste Wirkungsstätte der nSMase2. (Clarke et al., 2006; Milhas et al., 2009). Entsprechend wurden eine zunehmende nSMase2-Akkumulation an der Zellmembran und gesteigerte nSMase2-Expression beobachtet, wenn MCF-7-Brustkrebszellen von subkonfluentem Wachstum in ein konfluentes Stadium übergangen. Die nSMase2 stellte sich in diesem Zusammenhang als Vermittler von Kontaktinhibition und Zellzyklusarrest in der G₀-Phase heraus (Marchesini et al., 2004). Schon vor der Identifizierung der humanen nSMase2 wurde die korrespondierende cDNA der Ratte als cca1 (confluent cell-associated 1) isoliert und ebenfalls als essentiell für Kontaktinhibition in 3Y1-Zellen beschrieben (Hayashi et al., 1997). Eine Interaktion der membranassoziierten nSMase2 mit Adhäsionsmolekülen wie Integrinen und deren Signalwegen war dadurch naheliegend (s. Kapitel 1.5).

N-SMasen werden durch anionische Phospholipide (APLs) wie z.B. Phosphatidylserin aktiviert. Darüber hinaus wurde TNF als wichtiger externer N-SMase-Aktivator identifiziert (Clarke et al., 2011a). TNF-abhängige Aktivierung der nSMase2 ist unter anderem an Entzündungsprozessen beteiligt (s. Abb.1) und führt in diesem Zusammenhang zur Expression von Adhäsionsmolekülen (s. Kapitel 1.5). p38MAPK (p38 mitogen activated protein kinase) agiert dabei als Regulator der TNF-stimulierten nSMase2-Aktivierung (Clarke et al., 2007).

nSMase2-Aktivierung wurde außerdem mit TNF-vermittelter Apoptose in Verbindung gebracht (s. Abb.1). Mit dem nSMase2-Inhibitor GW4869 konnten in MCF-7-Zellen verschiedene Stadien der TNF-induzierten Apoptose wie Chromatinkondensierung, Caspasen-Aktivierung und die Bildung apoptotischer Körperchen inhibiert werden. Dadurch wurde die

Einleitung

Rate des Zelltods nach TNF-Stimulation gesenkt (Luberto et al., 2002). nSMase2-Überexpression erhöhte auch die stauroporin- und ceramidinduzierte Zelltodrate in Oligodendromzellen, und Herunterregulation der nSMase2 mittels siRNA blockierte komplett die H₂O₂-induzierte Apoptose in Endothelzellen der Aorta. Zudem konnten in primären Leberzellen die basale und Interleukin-1 β -induzierte Phosphorylierung der für Stresssignalweiterleitung wichtigen c-Jun-Kinasen (JNK) durch nSMase2-Überexpression erhöht werden (Clarke et al., 2006).

Außer durch TNF und APLs kann die nSMase2 durch uPA (urokinase plasminogen activator) aktiviert werden. In diesem Zusammenhang ist sie an Mitose und Überlebens-Signalwegen beteiligt (Maupas-Schwalm et al., 2009).

Die nSMase2 wird bei Virusinfektionen von Lymphozyten verstärkt aktiviert. Nach Infizierung mit dem Masernvirus wurden durch die nSMase2 in Jurkat- und primären T-Zellen größere Ceramidmengen im Zellmembranbereich gebildet. Durch RNA-Interferenz mit nSMase2-siRNA konnte dieser Effekt inhibiert werden (Gassert et al., 2009). Ferner wurde eine gesteigerte N-SMase-Aktivität durch gp120, ein Hüllprotein des humanen Immundefizienzvirus, beschrieben (Jana et al., 2004).

Inzwischen ist eine dritte humane N-SMase entdeckt worden. Die nSMase3 (bzw. SMPD4) zeigt kaum Homologie zu anderen Enzymen der N-SMase-Familie. Sie ist weder an der Zellmembran noch im zytosolischen Bereich identifiziert worden, sondern scheint stattdessen auf das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat beschränkt zu sein. Die nSMase3 wurde initial als weitere echte N-SMase beschrieben (Krut et al., 2006). Neueste Studien widersprechen jedoch dieser These, denn in MCF-7- und HEK-Zellen (embryonale Niere) konnten weder *in vitro*- noch *in vivo*-N-SMase-Aktivität der nSMase3 festgestellt werden. Zudem beruhte die N-SMase-Aktivierung durch TNF in den untersuchten Zellen auf der Aktivität der nSMase2 und nicht der nSMase3. Die nSMase3 scheint demnach nicht direkt an der Hydrolyse des plasmamembrangebundenen Sphingomyelins beteiligt zu sein (Clarke et al., 2011b). Eine vierte neutrale Säugetier-SMase ist die mitochondrienassoziierte N-SMase (MA-nSMase), die dem Namen entsprechend mitochondrienspezifisch lokalisiert und im Menschen bislang unbeschrieben ist (Clarke et al., 2011a).

1.3 TNF-induzierte N-SMase-Signaltransduktion

N-SMase-Aktivierung durch TNF wird, anders als die A-SMase-Aktivierung, nicht über die Todesdomänen des TNF-R1, sondern über eine gesonderte intrazelluläre Sequenz, die Neutrale-Sphingomyelinase-Aktivierungsdomäne (NSD) vermittelt (s. Abb. 4). Unter den zytoplasmatischen TNF-R1-Domänen stellte sich die NSD als essentiell und ausreichend für die TNF-vermittelte N-SMase-Aktivierung heraus. Sie besteht aus 11 Aminosäuren und befindet sich an Position 309-319 des Rezeptors (Adam et al., 1996).

Mittels Yeast Two-Hybrid-System (Y2H) konnte ein Protein identifiziert werden, das auch in humanen Zellen spezifisch an die NSD des TNF-Rezeptors bindet. Das Molekül fungiert als Vermittler der TNF-induzierten N-SMase-Aktivierung und wurde daher FAN, für „factor associated with neutral SMase activation“, genannt (Adam-Klages et al., 1996).

FAN erwies sich als essentiell für die N-SMase-Aktivierung durch TNF. Dementsprechend zeigten Thymozyten aus FAN-Knockout-Mäusen erwartungsgemäß nur die basale, aber keine TNF-induzierte N-SMase-Aktivierung. Die Wundheilung nach epithelialen Verletzungen ist bei diesen Tieren verlangsamt und ihre Fibroblasten weisen vergrößerte Lysosomen auf (Kreder et al., 1999; Möhlig et al., 2007). Zudem sind wesentliche TNF-induzierte inflammatorische Prozesse wie Interleukin-6-Expression und Neutrophilen-Rekrutierung zu Entzündungsherden bei FAN-defizienten Mäusen beeinträchtigt. Es ist entsprechend wahrscheinlich, dass die TNF-induzierte N-SMase-Aktivierung an diesen Prozessen beteiligt ist und dass die beschriebenen Symptome der Mäuse auf die Unterbrechung der Signalkaskade zurückzuführen sind (Montfort et al., 2009).

FAN gehört zu den WD-Repeat-Proteinen. WD-Repeats sind von Tryptophan (W) und Aspartat (D) terminierte Strukturen aus etwa 40 Aminosäuren, die sich zu propellerartigen Motiven formen und beispielsweise der Bindung an andere Proteine dienen (Smith et al., 1999). Ein Y2H-Screen mit FAN als Köderprotein erbrachte ein zweites WD-Repeat-Protein als direkten FAN-Bindungspartner: RACK1 (receptor for activated C kinase 1), das aus sieben WD-Repeats mit einem Molekulargewicht von insgesamt 36 kDa besteht, stellte sich als weitere Komponente der N-SMase-Signaltransduktion in Säugerzellen heraus und ist ebenfalls an der TNF-induzierten N-SMase-Aktivierung beteiligt (Tcherkasowa et al., 2002).

RACK1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das an zahlreichen intrazellulären Prozessen beteiligt und als Bestandteil von eukaryontischen Ribosomen beschrieben worden ist (Nilsson et al., 2004). Das Protein liegt jedoch nicht nur frei zytoplasmatisch vor, sondern auch an der Plasmamembran, wo es einerseits mit FAN interagiert und zudem aktivierte Mitglieder der

Einleitung

cPKCs (klassische Proteinkinase C) rekrutiert, um deren vorzeitige Degradierung zu verhindern. TNF-induzierte cPKC-Translokation funktioniert allerdings RACK1-unabhängig und ist daher wohl keine Folge der N-SMase-Signaltransduktion (Möhlig et al., 2007).

Der Ablauf der N-SMase-Aktivierung stromabwärts der TNF-R1·FAN·RACK1-Kaskade und die darin involvierten Komponenten waren bislang unbekannt (s. Abb. 4).

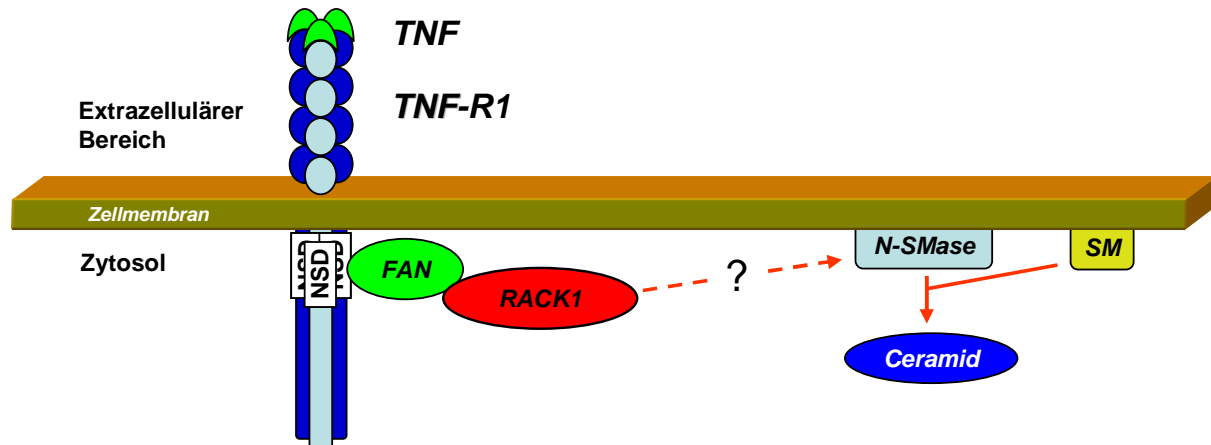


Abb. 4: N-SMase-Aktivierung durch Bindung von TNF an TNF-R1. N-SMase-Aktivierung durch TNF wird über eine Signalkaskade vermittelt, bei der FAN konstitutiv an die NSD des TNF-R1 und RACK1 an FAN bindet. Der weitere Verlauf der Signalkaskade zwischen RACK1 und der N-SMase war jedoch bislang unbekannt.

1.4 Embryonic Ectoderm Development

Unter den bekannten N-SMasen stellt die nSMase2 die wesentliche, eventuell sogar einzige, durch TNF aktivierbare N-SMase beim Menschen dar (Clarke et al., 2006; 2011b). Um Interaktionspartner dieses Enzyms zu finden, wurde im Vorfeld zu dieser Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie der CAU Kiel, ein Yeast Two-Hybrid Screen mit einer verkürzten Variante der nSMase2 als Köderprotein durchgeführt. Dieser ergab als potentiellen Bindungspartner das Protein EED (embryonic ectoderm development).

EED ist ein WD-Repeat-Protein, das wie RACK1 aus 7 WD-Repeats besteht (Peytavi et al., 1999). Weitere arbeitsgruppeninterne Y2H-Studien mit verschiedenen Deletionsmutanten von EED, nSMase2 und RACK1 ergaben, dass EED mit seinen drei N-terminalen WD-Repeats sowohl an die nSMase2 über deren katalytische Domäne als auch an RACK1 über dessen vier

C-terminale WD-Repeats binden kann. Dadurch wurde EED zu einem viel versprechenden Kandidaten für ein weiteres Mitglied der TNF-aktivierten nSMase2-Signalkaskade.

Humanes EED existiert in vier bekannten, aus derselben mRNA translatierten Isoformen und gehört zur Familie der Polycomb-Group-Proteine (Kuzmichev et al., 2004). Diese bilden chromatinmodifizierende Komplexe mit transkriptionsunterdrückender Wirkung. Man unterscheidet zwei Komplexgruppen, den polycomb repressive complex 1 (PRC1) und PRC2. EED ist neben EZH2 (enhancer of zeste, homolog 2) und SUZ12 (suppressor of zeste 12) ein fester Bestandteil des PRC2 (Simon et al., 2009). PRC2-vermittelte Transkriptionssuppression ist unter anderem essentiell für korrekte Fötalentwicklung, EED-Knockout-Mäuse sind entsprechend embryonal letal (Sauvageau et al., 2008).

Polycomb-Group-Proteine wie EED sind überwiegend nukleär lokalisiert. EED und EZH2 bilden jedoch auch im Zytoplasma Komplexe zur Kontrolle der Aktin-Polymerisation, beispielsweise im Rahmen von Antigen-Rezeptor-Signalweiterleitungen bei T-Zellen (Su et al., 2005). Außerdem ist EED in Integrin-Signaltransduktion involviert. Humanes EED wurde ursprünglich unter dem Synonym WAIT-1 (WD repeat protein interacting with integrin tails-1) bekannt, da es an die β 7-Untereinheit von Integrinen binden kann (Rietzler et al., 1998). Integrinaktivierung bewirkt in Jurkat- und HeLa-Zellen eine ausgeprägte Translokation von nukleärem EED an die Plasmamembran. Ein ähnlicher Translokationsprozess wurde durch DNA-Injektion für das HIV-Protein Nef bewirkt, welches EED ebenso wie RACK1 im Zytoplasma bindet (Witte et al., 2004; Gallina et al., 2001).

1.5 Integrine und integrinassoziierte Moleküle als mögliche Bestandteile der N-SMase-Signaltransduktion

Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle, die bei Metazoen die Anhaftung an die extrazelluläre Matrix (EZM), Zellmigration, -wachstum, -differenzierung sowie Apoptose kontrollieren und dadurch essentiell für die Ontogenese sind. Als Bestandteile von immunologischen Synapsen zwischen Zellen des Immunsystems sind Integrine einerseits an Immunität und Entzündungsprozessen beteiligt, andererseits aber auch an Krankheitsbildern wie Thrombosen, Autoimmunität und Neoplasie. Integrine sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit, die aus je einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem zytosolischen Schwanz bestehen (Hynes, 2002).

Einleitung

Integrin-Signaltransduktion kann in zwei Richtungen erfolgen. Beim „Inside-Out-Signalling“ binden intrazelluläre Aktivatoren wie Talin oder Kindlin an die zytosolische Domäne der Integrin- β -Untereinheit. Die daraus resultierende Integrin-Konformationsänderung führt zu gesteigerter Bindungsaffinität an extrazelluläre Liganden wie Fibrinogen, Fibronectin oder Kollagen. Dadurch können Adhäsionskräfte verstärkt, integrinabhängige Zellmigration gesteuert und die EZM remodelliert werden. Beim „Outside-In-Signalling“ fungieren Integrine als klassische Transmembranrezeptoren, die durch extrazelluläre Ligandenbindung Signale zur Kontrolle von Zellpolarität und Zellschicksal übermitteln (Shattil et al., 2010).

Integrine, im untersuchten Fall Integrin $\alpha v \beta 3$, werden für nSMase2-Aktivierung durch uPA benötigt (Maupas-Schwalm et al., 2009). Mehrere Studien weisen auch auf einen Zusammenhang von Integrienen und damit assoziierten Molekülen mit der TNF-abhängigen nSMase2-Aktivierung hin.

Die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) sind als Liganden für Integrine ($\alpha 4 \beta 1$ bzw. $\alpha L \beta 2$) an Adhäsions- und Migrationsprozessen von Leukozyten bei Entzündungen beteiligt (Barreiro et al., 2002). Durch nSMase2-Herunterregulation wurde die TNF-stimulierte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 drastisch vermindert (Clarke et al., 2007). TNF kann außerdem Integrine aktivieren und dadurch eine verstärkte Zelladhäsion bewirken, beispielsweise durch Aktivierung von ITGB2 (Integrin $\beta 2$) bei Neutrophilen (Bouaouina et al., 2004). Durch RNA-Interferenz mit nSMase2-siRNA konnte die TNF-induzierte Adhäsionssteigerung deutlich reduziert werden (Clarke et al., 2007).

ITGB1, ITGB2 und ITGB5 sind ebenso wie die nSMase2 direkt an TNF-vermittelter Apoptose beteiligt und p38MAPK reguliert sowohl TNF-induzierte nSMase2-Aktivierung als auch Downstreameffekte von ITGB1 und ITGB2 (Avdi et al, 2001; Chen et al., 2007; Clarke et al., 2007; Sato et al., 2005; Ramgolam et al., 2010). Dieselben Integrin- β -Untereinheiten (1, 2 und 5) binden zudem an die nSMase2-Signalwegskomponente RACK1 (Liliental et al., 1998), während das potentiell nSMase2-bindende EED mit Integrin $\beta 7$ interagiert (Liliental et al., 1998; Rietzler et al., 1998). ITGB1, ITGB2, ITGB5 und ITGB7 sind dementsprechend besonders wahrscheinlich als mögliche stabilisierende/aktivierende Komponenten der nSMase2-Signaltransduktion.

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der bislang unvollständig beschriebene N-SMase-Signaltransduktionsweg molekular und funktionell näher charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck sollten mittels Hefe-2-Hybridssystem mit der vollständigen nSMase2 sowie mit ihrer regulatorischen und der katalytischen Domäne als Köderproteine mögliche neue Komponenten der Signalkaskade ermittelt und die Interaktionen in der Hefe kontrolliert werden. Interessante Kandidaten sollten mittels Kolokalisationsstudien, Koimmunpräzipitationen und N-SMase-Aktivitätsuntersuchungen als Bestandteile der TNF-abhängigen N-SMase-Signaltransduktion in humanen Zellen untersucht und gegebenenfalls verifiziert werden.

Das Polycomb-Group-Protein EED konnte in der Hefe bereits im Vorfeld als möglicher Interaktionspartner von sowohl der neutralen Sphingomyelinase 2 als auch der Signalwegskomponente RACK1 identifiziert werden. Es sollte daher ebenfalls überprüft werden, ob, wie und unter welchen Bedingungen EED an der TNF-induzierten nSMase2-Aktivierungskaskade beteiligt ist.

Integrine sollten als weitere potentielle Kandidaten mittels Immunfluoreszenz- und RNA-Interferenzstudien ebenfalls auf eine Funktion im N-SMase-Signaltransduktionsweg überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Tabelle 1: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material:	Firma:
6-Kavitäten-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
12-Kavitäten-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Kavitäten-Platte	Nunc, Wiesbaden
Amersham TM Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Cryo-Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Menzel, Braunschweig
Einweg-Skalpelle Nr. 10, 11	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Filtropur S 0,22 µm-Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
gestopfte Pipettenspitzen (10 µL/100 µL/1000 µL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ImmunoSelect® Adhesion Slides	Squarix, Marl
µMACS TM Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mundschutz	Dahlhausen & Co., Köln
Nitrozellulosemembran	Biometra, Göttingen
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Petrischalen (100 mm/200 mm)	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen (10 µL/100 µL/200 µL/1000 µL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plastik-Zellschaber	Corning, Schiphol-Rijk, Netherlands
Reaktionsgefäße (0,5 mL/1,5 mL/2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzbodenröhrchen mit Schraubdeckel (15 mL/50 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
sterile Pipetten (1 mL/5 mL/10 mL/25 mL/50 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Steritop® 0,22 µm Vakuum-Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Whatman-Filterpapier	Whatman, Dassel
Zellkulturflaschen (650 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (100 mm)	BD, Heidelberg

Material und Methoden

Tabelle 2: verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits:

Chemikalie:	Firma:
10 x Trypsin/EDTA in 10 x PBS	Biochrom, Berlin
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Albumin bovine Fraktion V, pH 7,0 (BSA)	SERVA, Heidelberg
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Aminosäuren, Uracil	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	PAA Laboratories, Cölbe
Adenosintriphosphat (ATP)	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bacto Agar, Bacto Trypton, Bacto Hefe-Extrakt, Difco® Yeast Nitrogen Base w/o amino acids	BD, Heidelberg
Big Dye® Terminator Sequenzier-Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bis-Acrylamid (40% w/v)	SERVA, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Circle Grow®	Q-BIOgene, Heidelberg
Chloroform	Sigma, Taufkirchen
Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (CPIA)	Invitrogen, Darmstadt
Click RPMI 1640 Zellkulturmedium	AppliChem, Darmstadt
Complete® Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem, San Diego, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMEM High Glucose mit 4,5 g/L Glc; mit oder ohne L-Glutamin/25 mM HEPES	Invitrogen, Darmstadt
DNA Standard GeneRuler™ 100bp	Fermentas, St. Leon-Roth
dNTP-Mischung	Bioline, Luckenwalde
Dye Ex™ 2.0 Spin Columns Kit	Qiagen, Hilden
Enhanced Chemiluminescence Reagents (Amersham™ ECL Western Blotting Detection Reagents)	GE Healthcare, München
Enhanced Chemiluminescence Reagents Plus (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Reagents)	GE Healthcare, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Gibco® DMEM Zellkulturmedium	Invitrogen, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Immersionsöl	CARL ZEISS, Oberkochen
Kaliumchlorid, weitere Salze	Merck, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA Laboratories, Cölbe

Material und Methoden

Leupeptin	Merck, Darmstadt
Lyticase	Sigma, Taufkirchen
M9-Minimalsalze, 5 x	Sigma, Taufkirchen
MACSelect™ K ^k – Transfected Cell Selection Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Frema Reform, Lüneburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Minimal SD Agar Base, Minimal SD Agar Base Ga/RA	Clontech, Mountain View, USA
μMACS™ Protein G MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA, Heidelberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
NP-40 Detergenz	Thermo Fisher Scientific, Bonn
NucleoSpin® Extract II	Macherey & Nagel, Düren
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom, Berlin
PEG 4000	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
Pepstatin	Merck, Darmstadt
PeqGOLD® Universal-Agarose	Peqlab, Erlangen
Pierce® BCA Protein Assay Reagenz A	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Pierce® BCA Protein Assay Reagenz B	Thermo Fisher Scientific, Bonn
proLong® Gold Antifade-Reagenz mit DAPI	Invitrogen, Darmstadt
QIAprep® Spin Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Fermentas, St. Leon-Roth
Salmon-Sperm-DNA	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl) 37% (v/v)	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA, Heidelberg
RNase A	Qiagen, Hilden
RPMI 1640	Invitrogen, Darmstadt
T4-DNA-Ligase, 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	Invitrogen, Darmstadt
TNF (2 mg/mL)	BASF Bioresearch, Ludwigshafen
Transfektions-Kit (Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V)	LONZA, Basel, Schweiz
Tri Dye™ 1 kb DNA Ladder	Biolabs, Ipswich, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Material und Methoden

Wasserstoffperoxid 30% (v/v)	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Biomol, Hamburg

Tabelle 3: verwendete Geräte

Gerät:	Firma:
3130 Genetic Analyzer	Hitachi, Wiesbaden
Agarose-Gelelektrophoresekammern HORIZON 58, HORIZON 11·14	Gibco, Gaithersburg, USA
Autoklav CS	Webeco, Selmsdorf
Brutschrank Model 3336	Forma Scientific, Waltham, USA
Cytofuge 2	IRIS Sample Processing, Berlin
Eismaschine Scotsman® AF100	Scotsman Ice Systems, Pogliano Milanese, Italien
Entwicklermaschine CP 1000	AGFA, Düsseldorf
Feinwaage A120S	Sartorius, Göttingen
Gelgießvorrichtung	Biometra, Göttingen
große Kühlzentrifuge 6K10	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Hochgeschwindigkeitszentrifuge Avanti J-25 I, Rotor JA-10 / JA-25.50	Beckmann Coulter, USA
inverses Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Göttingen
kleine Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
konfokales Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer mit Heizplatte RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Magnetständer OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Multimixer Luckham Multimixer MM1	Sternkopf Laborausrüster
NanoDrop® Spectrometer ND-1000	PeqLab, Erlangen
Neubauer Zellzählkammer (0,1 mm Tiefe)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Amaxa® Nucleofector® II	LONZA, Basel, Schweiz
PCR-Maschine Thermocycler triothermoblock T3000	Biometra, Göttingen
pH-Elektrode pH325	WTW, Weilheim
Photometer Infinite M200	Tecan Trading, Männedorf, Schweiz
Pipettenständer	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Hamburg
Protein- <i>blotting</i> Kammer Mini Protean II™	Bio-Rad, München
Röntgenkassette IEC 60406	MS Laborgeräte, Heidelberg
Schütteltisch WT12	Biometra, Göttingen
SDS-PAGE-Kammer Mini Protean IITM	Bio-Rad, München
Spannungsquelle PowerPac 300	Bio-Rad, München
sterile Werkbank LaminAir HA2472GS	Heraeus, Osterode
Tischzentrifuge 1080491	Kisker Biotech, Steinfurt
UV-Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage APX-1502	Denver Instrument, Göttingen
Wasserbad (groß) 1003	Gewerkschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad (klein) C1	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasserfilteranlage Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Wasserkocher	Petra® electric, Burgau
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Osterode

2.1.2 Antikörper, siRNAs, cDNA-Klone und Primer

Tabelle 4: verwendete Antikörper

Zielprotein/-spezies:	Firma / Artikelnummer:	Herkunft (Spezies)
Aktin	Santa Cruz, Heidelberg / sc-1615	Ziege, polyklonal
β-COP (COPB1)	Abcam, Cambridge (GB) / ab2899	Kaninchen, polyklonal
EED	Abcam, Cambridge (GB) / ab4469	Kaninchen, polyklonal
EED	Santa Cruz, Heidelberg / sc-28701	Kaninchen, polyklonal
EED	Millipore, Schwalbach / 05-1320	Maus, monoklonal
EIF6/p27BBP	BD, Heidelberg / 611120	Maus, monoklonal

Material und Methoden

FLAG	Sigma, Taufkirchen / F1804	Maus, monoklonal
H-2K ^K (FITC-markiert)	Miltenyi, Bergisch Gladbach / 130-091-986	Maus, monoklonal
Histon H3	Abcam, Cambridge (GB) / ab1791	Kaninchen, polyklonal
ITGB1 (CD18)	BD, Heidelberg / 610467	Maus, monoklonal
ITGB2	Origene, Darmstadt / TA300794	Kaninchen, monoklonal
ITGB5	Abnova, Heidelberg / H00003693-M01	Maus, monoklonal
ITGB7	Abnova, Heidelberg / H00003695-B01	Maus, polyklonal
Kaninchen (Peroxidase-markiert)	Jackson, Suffolk (GB) / 115-035-114	Ziege, polyklonal
Kaninchen (Alexa Fluor 488)	Molecular Probes, Darmstadt / A-21206	Esel, polyklonal
Kaninchen (Alexa Fluor 555)	Molecular Probes, Darmstadt / A-31572	Esel, polyklonal
LAMR1	Santa Cruz, Heidelberg / sc-20979	Kaninchen, polyklonal
LAMR1	Enzo, Lörrach / ALX-804-620	Maus, monoklonal
Maus (Peroxidase-markiert)	Jackson, Suffolk (GB) / 115-035-146	Ziege, polyklonal
Maus (Alexa Fluor 488)	Molecular Probes, Darmstadt / A-21202	Esel, polyklonal
Maus (Alexa Fluor 546)	Molecular Probes, Darmstadt / A-11003	Ziege, polyklonal
myc (C-myc)	Santa Cruz, Heidelberg / sc-789	Kaninchen, polyklonal
nSMase2 (SMPD3)	Santa Cruz, Heidelberg / sc-166637	Maus, monoklonal
nSMase2 (SMPD3)	Santa Cruz, Heidelberg / sc-67305	Kaninchen, polyklonal
nSMase2 (SMPD3)	Santa Cruz, Heidelberg / sc-67692	Ziege, polyklonal
PKC ζ - C24E6	Cell Signaling, Frankfurt a. M. / 9368	Kaninchen, monoklonal
PKC ζ	Cell Signaling, Frankfurt a. M. / 9372	Kaninchen, polyklonal
Pan-Cadherin	Abcam, Cambridge (GB) / ab16505	Kaninchen, polyklonal
RACK1	Santa Cruz, Heidelberg / sc-17754	Maus, monoklonal
Tubulin (α)	Abcam, Cambridge (GB) / ab7291	Maus, monoklonal
Ziege (Peroxidase-markiert)	Jackson, Suffolk (GB) / 115-035-108	Maus, polyklonal

Material und Methoden

Ziege (Alexa Fluor 555)	Molecular Probes, Darmstadt / A-21432	Esel, polyklonal
-------------------------	---------------------------------------	------------------

Tabelle 5: verwendete siRNAs

Gen:	Firma / Artikelnummer:	siRNA-ID:	Sorte:
COPB1	Ambion, Darmstadt / 4427038	s3373	Silencer Select® Validated
EED (EED-siRNA_1)	Ambion, Darmstadt / AM16807	115461	Silencer® Pre-designed
EED (EED-siRNA_2)	Ambion, Darmstadt / AM16807	115462	Silencer® Pre-designed
EIF6/p27BBP	Ambion, Darmstadt / 4390824	s7586	Silencer Select® Validated
ITGB1 (ITGB1-siRNA_1)	Ambion, Darmstadt / AM16807	288624	Silencer® Pre-designed
I ITGB1 (ITGB1-siRNA_2)	Ambion, Darmstadt / AM16807	288622	Silencer® Pre-designed
ITGB1 (ITGB1-siRNA_3)	Ambion, Darmstadt / AM16807	112293	Silencer® Pre-designed
ITGB2 (ITGB2-siRNA_1)	Ambion, Darmstadt / AM16807	105999	Silencer® Pre-designed
ITGB2 (ITGB2-siRNA_2)	Ambion, Darmstadt / AM16807	8238	Silencer® Pre-designed
ITGB2 (ITGB2-siRNA_3)	Ambion, Darmstadt / AM16807	114036	Silencer® Pre-designed
ITGB5	Santa Cruz, Heidelberg / sc-35680	-----	Mischung aus 3 spezifischen siRNAs
ITGB7	Santa Cruz, Heidelberg / sc-35682	-----	Mischung aus 3 spezifischen siRNAs
LAMR1 (LAMR1-siRNA_1)	Ambion, Darmstadt / 4392420	s8089	Silencer Select® Pre-designed
LAMR1 (LAMR1-siRNA_2)	Ambion, Darmstadt / 4392420	s8090	Silencer Select® Pre-designed
Negativkontroll-siRNA	Ambion, Darmstadt / AM4611	-----	Silencer® Negative Control 1
PKC ζ (PKC ζ -siRNA_1)	Ambion, Darmstadt / AM16807	242362	Silencer® Pre-designed
PKC ζ (PKC ζ -siRNA_2)	Ambion, Darmstadt / AM16807	242363	Silencer® Pre-designed
PKC ζ (PKC ζ -siRNA_3)	Ambion, Darmstadt / AM16807	142298	Silencer® Pre-designed

Tabelle 6: Humane cDNA-Klone von Origene, Darmstadt:

Gen:	Artikelnummer:	Vektor:
ITGB5	SC118751	pCMV6-XL5
ITGB7	SC119589	pCMV6-XL5

Tabelle 7: verwendete Sequenzier-Primer

Name:	Sequenz:	Anwendung:
Lex202.forward	TTC GTC AGC AGA CGT TC	Sequenzierung der MCS des Vektors plex202
Seq_pB42AD	CCT GAC TGG CTG AAA TCG AAT GGT	Sequenzierung der MCS des Vektors pB42AD
pB42AD_rev	GCA AGG TAG ACA AGC CGA	
N-CMV-30	AAT GTC GTA ATA ACC CCG CCC CGT TGA CGC	Sequenzierung der MCS des Vektors pFLAG-CMV2
C-CMV-24	TAT TAG GAC AAG GCT GGT GGG CAC	
V1.5	GGA CTT TCC AAA ATG TCG	Sequenzierung der MCS des Vektors pCMV6-XL5
XL39	ATT AGG ACA AGG CTG GTG GG	

2.1.3 Vektoren

plex202 und pB42AD:

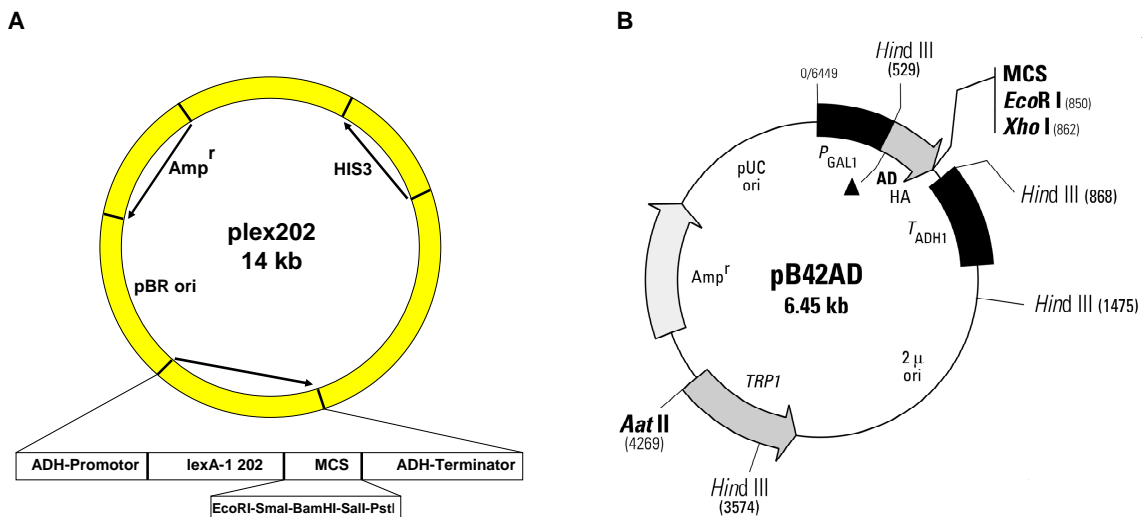


Abb. 5: Vektor-Karten von plex202 und pB42AD. Diese Vektoren wurden für Yeast Two-Hybrid-Experimente verwendet. plex202 (A) war in der Arbeitsgruppe D. Adam vorhanden. pB42AD (B) stammt von BD, Heidelberg (Quelle: Technisches Datenblatt MATCHMAKER LexA, BD Clontech).

pFLAG-CMV2 und pcDNA3.1 myc-HIS:

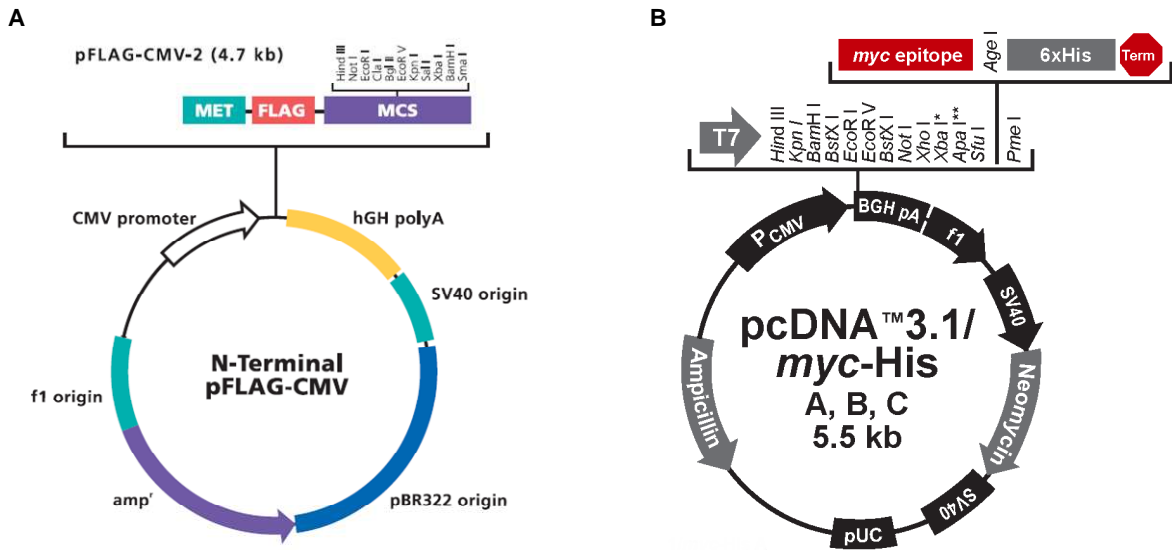


Abb. 6: Vektor-Karten von pFLAG-CMV2 und pcDNA3.1 myc-HIS. Diese Vektoren von Sigma, Taufkirchen (A) bzw. Invitrogen, Darmstadt (B) wurden für transiente Überexpressionen von FLAG- bzw. myc-gebundenen Proteinen verwendet (Quellen: pFLAG-CMV-2 (A): technisches Datenblatt von Sigma; pcDNA3.1 myc-His (B): technisches Datenblatt von Invitrogen)

2.1.4 Medien für Bakterien und Hefen

10 x-Aminosäuren-Stammlösung:

Aminosäure	10 x-Konzentration (mg/L)
L-Adenin-Hemisulfat	200
L-Arginin HCl	200
L-Isoleucin	300
L-Lysin HCl	300
L-Methionin	200
L-Phenylalanin	500
L-Threonin	2000
L-Tyrosin	300
L-Valin	1500

Weitere Stammlösungen:

- Histidin-Stammlösung (H): L-Histidin-HCl-Monohydrat 2,46 g/L
- Leucin-Stammlösung (L): L-Leucin 7,26 g/L
- Tryptophan-Stammlösung (W): L-Tryptophan 4,84 g/L

Material und Methoden

- Uracil-Stammlösung (U): L-Uracil 200 mg/L
 - 10x-Salzstammlösung: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 70g/L
 - NaH_2PO_4 30g/L
- Einstellen auf pH 7, autoklavieren

Alle Stammlösungen wurden mit 0,22 μL Filtropur- oder Steritop-Sterilfilter sterilisiert.

Die nachfolgenden Medien wurden jeweils mit Milli-Q- H_2O angesetzt.

LB-Agarplatten:

Agar	20 g/L
Trypton	10 g/L
Hefe-Extrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
Ampicillin (1 mg/mL)	0,1 % (v/v)

Ampicillin wurde nach Autoklavieren und Abkühlung der übrigen gemischten Komponenten hinzugefügt.

M9-Minimal-Agarplatten:

5 x M9-Minimalsalze	11,28 g/L
Agar	20 g/L
10x-Aminosäuren-Stammlösung	10 % (v/v)
Ampicillin (1 mg/mL)	0,1 % (v/v)
Thiamin 1 M	0,1 % (v/v)
MgSO_4 1 M	0,2 % (v/v)
Glucose 1 M	2 % (v/v)
Uracil-Stammlösung	0,83 % (v/v)
Histidin-Stammlösung	0,83 % (v/v)
Leucin-Stammlösung	0,83 % (v/v)

5x M9-Minimalsalze und Agar wurden in Milli-Q- H_2O gelöst, bei 121 °C für 20 Min. autoklaviert und auf 55°C abgekühlt, bevor die übrigen Komponenten addiert und die Platten gegossen wurden.

Material und Methoden

Flüssig-Hefemedium:

Yeast Nitrogen Base	6,7 g/L
10x-Aminosäuren-Stammlösung	10 % (v/v)
Glucose 1 M	2 % (v/v)
Uracil- und Aminosäuren- Stammlösungen, jeweils	0,83 % (v/v)

Die in Milli-Q-H₂O gelöste Yeast Nitrogen Base wurde bei 121 °C für 20 Min. autoklaviert und auf 55°C abgekühlt, bevor die übrigen Komponenten addiert wurden. Je nach Selektion wurden verschiedene Stammlösungen (Uracil, Histidin, Tryptophan oder Leucin) hinzugefügt.

Glucose-Hefe-Selektionsplatten (U⁻, U^H, U^HW⁻):

Minimal SD Agar Base	46,7 g/L
10x-Aminosäuren-Stammlösung	10 % (v/v)
U ⁻ , H ⁻ , W ⁻ , L-Stammlösungen, jeweils	0,83 % (v/v)

Die in Milli-Q-H₂O gelöste Minimal SD Agar Base wurde bei 121 °C für 20 Min. autoklaviert und auf 55°C abgekühlt, bevor die übrigen Komponenten addiert wurden. Je nach Selektion wurden verschiedene Stammlösungen (Uracil, Histidin, Tryptophan oder Leucin) hinzugefügt.

U^HW^L Gal⁺ X-Gal⁺-Hefe-Selektionsplatten:

Minimal SD Agar Base Gal/RA	54 g/L
10x-Salzstammlösung	10 % (v/v)
10x-Aminosäuren-Stammlösung	10 % (v/v)
X-Gal/DMF (20mg/ml)	0,4 % (v/v)
Milli-Q-H ₂ O	Restvolumen

Das in Milli-Q-H₂O gelöste Minimal SD Agar Base Gal/RA wurde bei 121 °C für 20 Min. autoklaviert und auf 55°C abgekühlt, bevor die übrigen Komponenten addiert und die Platten gegossen wurden. Bei U^HW^L Glc⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten wurde Minimal SD Agar Base (46.7 g/L) anstelle von Minimal SD Agar Base Gal/RA verwendet und zusätzlich Leucin-Stammlösung (0,83 % (v/v)) hinzugefügt.

2.1.5 Zelllinien, Hefe- und Bakterienstämme

Die Zelllinien Jurkat (humane leukämische T-Lymphozyten), HeLa (humaner Gebärmutterhalskrebs), HEK-293 und 293T (humane embryonale Niere) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas (USA) bezogen. Die murinen Prä-B-Zelllinien 70Z/3TR55 Δ 212-308/346 und 70Z/3TR55 Δ 308-340 sind stabil mit TNF-R1-Deletionskonstrukten transfizierte Derivate der originalen 70Z/3-Zellen von ATCC (Adam et al., 1996). Jurkat- und 70Z/3-Zellen wurden in Click RPMI 1640-Medium, HeLa-Zellen in RPMI 1640-Medium und HEK-293- sowie 293T-Zellen in DMEM-High-Glucose-Medium gehalten. Alle Medien wurden mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 50 μ g/mL Penicillin und μ g/mL Streptomycin supplementiert.

Primäre B-Lymphozyten und aktivierte primäre T-Lymphozyten aus humanem Blut wurden von der Arbeitsgruppe Sabine Adam-Klages, Institut für Immunologie der CAU Kiel, zur Verfügung gestellt.

Der für Y2H-Studien verwendete Hefe-Stamm JK103 (ursprünglich entwickelt von Gyuris et al., 1993) ist Träger des Reporter-Plasmids pOP8-lacZ, welches einen LEXA-Operator mit LacZ- und LEU2-Gen, ein Ampicillin-Resistenzgen und das Gen URA3 für Uracil-Synthese beinhaltet. Auf Histidin- oder Tryptophan-defizienten Selektionsmedien können diese Zellen jedoch nur wachsen, wenn entsprechende Gene für die Produktion der jeweiligen Aminosäure(n) zusätzlich in die Hefen transformiert wurden.

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1-Blue stammt von Stratagene, Heidelberg. *E. coli* KC8-Bakterien (Clontech, Mountain View, USA) zeichnen sich durch Auxotrophie für Leucin, Tryptophan und Histidin aus. Sie eignen sich daher für die Isolation von Beuteplasmiden bei Y2H-Screens, indem auf eine durch das jeweilige Plasmid kodierte Aminosäure (in diesem Fall Histidin) selektiert wird.

2.2 Methoden

2.2.1 Generierung von chemisch kompetenten Bakterien

E. coli XL1-Blue- oder KC8-Bakterien wurden auf LB- bzw. M9-Agarplatten ausgestrichen und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10–12 gewachsene Kolonien in 250 mL SOB-Medium (2% (v/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄) angeimpft und bei 18°C unter intensivem Schütteln (250 RPM) bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 inkubiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis und zehnminütiger Zentrifugation bei 4°C und 2500 x g wurde das Sediment in 20 mL TB-Puffer (250 mM KCl, 15 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 55 mM MnCl₂, pH 6,7) resuspendiert. Auf die eisgekühlten Bakterien wurde DMSO tropfenweise und unter ständigem Schwenken hinzugegeben, bis eine DMSO-Konzentration von 7% (v/v) erreicht war. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden Portionen von je 100 µL abgefüllt, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

E. coli XL1-Blue- oder KC8-Bakterien wurden transformiert, um Plasmide zu vervielfältigen. Initial wurden chemisch kompetente, zuvor bei -80°C gelagerte Bakterien für 25 Minuten auf Eis aufgetaut. Je 100 µL der Bakteriensuspension wurden mit 10 µL Plasmidlösung (mindestens 0,1 ng DNA) in einem eisgekühlten Reaktionsgefäß gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien samt Plasmiden einem Hitzeschock ausgesetzt, indem das jeweilige Reaktionsgefäß für 45–50 Sekunden in ein Wasserbad von 42°C transferiert und anschließend wieder auf Eis abgekühlt wurde. Zu den Bakterien wurde je 1 mL SOC-Medium (0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) ohne Antibiotika hinzugegeben und die Suspension für eine Stunde bei 37°C unter stetigem Schütteln (250 RPM) inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin durch fünfminütige Zentrifugation bei 700 x g sedimentiert und in 100 µL des Überstands resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen auf ampicillinhaltigen LB- (XL1-Blue) oder mit Ampicillin und Aminosäuren supplementierten M9-Agarplatten (KC8) ausplattiert, auf denen nur erfolgreich transformierte Bakterien wachsen konnten. Nach

24-stündiger Inkubation der Platten bei 37°C war entsprechendes Kolonienwachstum zu verzeichnen.

2.2.3 Plasmidisolation aus Bakterien

Plasmide wurden aus Bakterien mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit oder dem QIAprep® Spin Maxiprep Kit von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. DNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop® Spectrometer ND-1000 von PeqLab gemessen.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch elektrophoretische Migration in 0,7-prozentigem (für Fragmente von 5 – 15 Kilobasen) bis zweiprozentigem (für Fragmente kleiner als 2 KB) Agarosegel in TAE-Puffer (40 mM Tris (pH 7,4), 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) nach ihrer Größe aufgetrennt und die Fragmentgrößen durch den DNA Standard GeneRuler™ von Fermentas bestimmt. DNA-Proben wurden mit 10 x Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin, 100 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und migrierten im Gel bei 10 Volt pro 1 cm Gellänge. Die aufgetrennte DNA wurde nach 15-minütiger Inkubation des Gels in Ethidiumbromidlösung (4 µg/mL) unter UV-Licht (312nm) detektiert und mittels eines Geldokumentationssystems von Intas fotografiert.

2.2.5 Klonierung von cDNA-Sequenzen in Expressionsvektoren

Zur Umklonierung wurden cDNA-Sequenzen mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (EcoRI und XhoI beim pB42AD-Vektor, EcoRI und SalI beim plex202-Vektor) aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten und der jeweilige Zielvektor linearisiert. Der Ansatz für einen Restriktionsverdau bestand aus:

- 0,5–2 µg DNA
- 1 µL Restriktionsendonuklease 1 (10 U/µL, Fermentas)
- 1 µL Restriktionsendonuklease 2 (10 U/µL, Fermentas)
- 2 – 4 µL 10 x-Restriktionspuffer (Fermentas)
- ad 20 µL nukleasefreies H₂O

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die geschnittenen Fragmente anschließend durch Gelelektrophorese in 1-2-prozentigen Agarosegelen aufgetrennt (s. Kapitel 2.2.4). Die der jeweiligen cDNA- bzw. Zielvektor-Sequenz entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das extrahierte cDNA-Insert wurde daraufhin durch 16-stündige Inkubation bei 14°C mit T4-DNA-Ligase in den Zielvektor ligiert. Der Ansatz für eine Ligation bestand aus:

- 200 ng Expressionsvektor
- 400 ng cDNA-Insert
- 2 µL T4-DNA-Ligase (Invitrogen)
- 2 µL 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (Invitrogen)
- ad 20 µL nukleasefreies H₂O

Im Anschluss an die Ligation wurde der Ansatz in *E. coli* XL1-Blue-Bakterien transformiert (s. Kapitel 2.2.2) und die Plasmide aus den transformierten Bakterien isoliert (s. Kapitel 2.2.3). Die erfolgreiche Umklonierung wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

2.2.6 Das Prinzip des Yeast Two-Hybrid-Systems

Das Y2H-System wird verwendet, um direkte Interaktionen zweier Proteine *in vivo* nachzuweisen.

Einzelne Domänen von Transkriptionsfaktoren können separat in der gleichen Zelle exprimiert werden. Der jeweilige Transkriptionsfaktor wird nur dann aktiv und bindet an den dazugehörigen Promotor, wenn die Einzeldomänen aneinander binden bzw. als Teil eines gemeinsamen Komplexes vorliegen. Beim Y2H-System nach Brent et al. (1985) werden in Hefezellen zwei verschiedene Fusionsproteine exprimiert. Das erste Fusionsprotein besteht aus dem Köderprotein, das auf Interaktion mit anderen Proteinen analysiert werden soll, und aus der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors LexA. Das zweite Fusionsprotein setzt sich aus dem Beuteprotein, also einem potentiellen Interaktionspartner des Köderproteins, und der Aktivierungsdomäne von LexA zusammen. Während das Beute-Fusionsprotein konstitutiv exprimiert wird, kommt es nur nach Stimulation mit Galactose zur Expression des Köderfusionsproteins. Wenn nach Expression beider Fusionsproteine das Beute- mit dem Köderprotein interagiert, gelangen die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors in direkte Nähe zueinander. Auf diese Weise wird LexA aktiv und kann Reportergene aktivieren. Für Interaktionsstudien werden Hefen des *Saccharomyces cerevisiae*-Stamms JK103 mit Expressionsvektoren transformiert, welche für die zu untersuchenden Proteine kodieren. Jeweils einer der Vektoren enthält die Beuteprotein-cDNA mit daran gebundener Sequenz für die DNA-Bindedomäne von LexA, der andere Vektor enthält die Köderproteinsequenz, welche wiederum an die LexA-Aktivierungsdomäne ligiert wurde. Aufgrund des HIS3- und des TRP1-Gens auf den verwendeten Vektoren pB24AD und plex202 können erfolgreich kotransformierte Hefen auf Histidin- und Tryptophan-defizientem Medium wachsen. Die verwendeten Hefen enthalten zusätzlich das pOP8-LacZ-Plasmid, auf dem sich die durch LexA aktivierbaren Reportergene LacZ und LEU2 befinden. Zusätzlich ist das Gen URA3 für Uracil-Synthese Bestandteil von pOP8-LacZ. Somit kann durch Selektion in Uracil-defizientem Medium sichergestellt werden, dass nur Hefen heranwachsen, die Träger des pOP8-LacZ-Plasmids sind. Bei Aktivierung und Rekrutierung von LexA an den LexA-Operator durch Beute-Köder-Interaktion werden also die Reportergene lacZ und LEU2 transkribiert, wodurch die Zellen β -Galactosidase exprimieren und Leucin herstellen können. Mittels der β -Galactosidase können die Hefezellen nach Stimulation mit Galactose supplementiertes X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-beta-D-Galactosid) zu blau gefärbtem 5-Brom-4-chlorindigo umsetzen. Bei Beute-Köder-Interaktion kommt es also zum Wachstum

von blauen Kolonien auf Galactose-supplementiertem Uracil-Histidin-Tryptophan-Leucin-defizientem Medium.

2.2.7 Transformation von Hefezellen und Selektion auf Agarplatten

Im Rahmen der Y2H-Studien wurden JK103-Hefezellen jeweils mit den Beute- und Köderproteinsequenz-beinhaltenen Expressionsvektoren pB42AD (+ Beute-cDNA) und plex202 (+ Köder-cDNA) transformiert. Hefezellen wurden in Uracil-defizientem (U) Flüssig-Hefemedium (50 mL/Transformationsansatz) bei 30°C unter ständigem Schütteln (225 RPM) bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch zweimaliges Waschen in je 50 mL sterilem Milli-Q-H₂O von Medienresten befreit (Zentrifugationen bei 900 x g für 5 Minuten) und in 500 µL 1 x TE/Lithiumacetat (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,5), 100 mM Lithiumacetat (pH 7,5)) resuspendiert. 100 µL Hefesuspension wurden mit je 3 µg Beute- und Köderplasmid-DNA sowie 150 µg steriler Salmon-Sperm-DNA versetzt und anschließend mit 400 µL von 40% (v/v) PEG/1 x TE/ Lithiumacetat und 15 µL DMSO gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation unter moderatem Schütteln bei 30°C wurden die Zellen zur Aufnahme der DNA durch 15-minütige Inkubation im Wasserbad bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und die Zellen anschließend auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺- Hefeselektionsplatten ausplattiert. Nach 48 Stunden bei 30°C bildeten nur diejenigen Hefen Kolonien, welche beide Plasmide beinhalten und somit Histidin (durch den plex202-Vektor) und Tryptophan (durch den pB42AD-Vektor) bilden konnten. Im Falle eines Y2H-Screens wurde zunächst nur das plex202-Köderplasmid in Hefen transformiert und die Zellen dementsprechend auf U⁻H⁻ Glc⁺-Hefeselektionsplatten selektiert. Darauf wurden die Hefen in einem zweiten Transformationsschritt mit je 6 µg einer Beuteplasmidmischung transformiert, die eine in pB42AD klonierte cDNA-Bank aus HeLa-Zellen beinhaltenete.

Auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺-Hefeselektionsplatten gewachsene Kolonien wurden im Falle einer Y2H-Doppeltransfektion auf U⁻H⁻W⁻L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Hefeselektionsplatten ausgestrichen und zeigten nach 3-7-tägiger Inkubation (30°C) bei Beute-Köder-Interaktion Wachstum blauer Hefen (s. Kapitel 2.2.7). Bei Y2H-Screens wurden sämtliche auf den U⁻H⁻W⁻ Glc⁺-Platten gewachsenen Kolonien in 40% (v/v) 1 x TE/60% (v/v) Glycerin resuspendiert und die Suspension in unterschiedlichen Verdünnungen auf U⁻H⁻W⁻L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Platten ausplattiert. Falsch positive Kandidaten wurden identifiziert, indem die blauen Kolonien einzeln erneut

auf U⁻H⁻W⁻L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Platten und zudem auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺ X-Gal⁺-Platten ausgestrichen wurden. Bei echter Beute-Köder-Interaktion sollten die Hefen nur auf erstgenanntem Selektionsmedium blau und auf dem letztgenannten, Glucose statt Galactose beinhaltenden Medium weiß wachsen.

2.2.8 Plasmidisolation aus Hefezellen

Um Plasmide aus Hefezellen zu isolieren, wurde jeweils eine Hefe-Kolonie in 5 mL des geeigneten Selektionsmediums bei 30°C angeimpft und unter ständigem Schütteln (225 RPM) bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase nach 24-48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1500 x g zentrifugiert und das Sediment in 500 µL SCE (1 M Sorbitol, 100 nM Citrat (pH 5,8), 10 mM EDTA, 100 mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Nach Zugabe von 40 µL Lyticase (5 U/µL in SCE) zur Aufspaltung der Zellwände wurde die Hefe-Suspension für eine Stunde bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und danach bei 1000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Sediment in 500 µL Lysepuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 20 mM EDTA, 1% (w/v) SDS) resuspendiert und für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach intensivem Vermischen der Suspension mit 500 µL CPIA (25% (v/v) Phenol, 24% (v/v) Chloroform, 1% (v/v) Isoamylalkohol) wurde das Gemisch zur Phasentrennung für fünf Minuten bei 18000 x g zentrifugiert und die wässrige obere, Plasmide enthaltende Phase samt weißer Interphase in einem frischen Reaktionsgefäß mit weiteren 500 µL CPIA vermischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wässrige obere Phase ohne Interphase mit 500 µL Chloroform vermischt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder isoliert und mit 50 µL 3 M NaOAc und 400 µL Isopropanol gemischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 30-minütiger Zentrifugation bei 20000 x g wurde der Überstand dekantiert und die präzipitierte Plasmid-DNA bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Sediment wurde in 30 µL sterilem Milli-Q-H₂O aufgenommen und zum Lösen für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden 3 µL RNase A (10 mg/mL) hinzugegeben und die Plasmidlösung bei 37°C für eine Stunde inkubiert, damit verunreinigende RNA enzymatisch verdaut werden konnte.

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Um die Kandidat-Klone der Y2H-Screens zu sequenzieren, wurde das Big Dye® Terminator Sequenzier-Kit von Applied Biosystems nach Herstellerangaben verwendet. Je Sequenzieransatz wurden 200 ng DNA, 1 µL Big Dye® Terminator, 2 µL 5 x Sequenzierpuffer und 5 µM Sequenzierprimer, aufgefüllt auf 20 µL mit Milli-Q-H₂O gemischt und anschließend einer PCR mit 25 Zyklen (Denaturierung: 96°C, 10 Sekunden; Primer-Anlagerung: 50°C, 5 Sekunden; Elongation: 60°C, 240 Sekunden) unterzogen. Das PCR-Produkt wurde mit dem Dye Ex™ 2.0 Spin Columns Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit dem 3130 Genetic Analyzer von Hitachi sequenziert.

2.2.10 Nukleofektion von Jurkat-Zellen

Um Jurkat-Zellen transient mit siRNAs oder Plasmiden zu transfizieren, wurde die Amaxa®-Nukleofektionsmethode unter Verwendung des Amaxa® Nucleofector® II und der Amaxa® Nucleofector® Solution V angewandt. Hierbei handelt es sich um eine optimierte Elektroporationsmethode für eukaryontische Zellen, bei der DNA-Konstrukte direkt in den Kern transferiert werden können.

Je Transfektion wurden (auf Raumtemperatur) $1-5 \times 10^6$ Zellen in 100 µL Nucleofector® Solution V aufgenommen und anschließend behutsam mit 2 µg DNA oder 50 pmol siRNA gemischt. Die Suspension wurde daraufhin in eine zertifizierte Küvette überführt und diese in die Küvettenhalterung des Nucleofector® II eingeführt. Die Elektroporation wurde durch Starten des für Jurkat-Zellen optimierten Nucleofector®-Programms X-001 eingeleitet. Nach erfolgter Nukleofektion wurde die Probe in der Küvette für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter Ausspülung mit 500 µL Zellmedium in vorgelegtes und auf 37°C vorgewärmtes Medium überführt. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach 48 – 72 Stunden im 37°C/5% (v/v) CO₂-Inkubator wurden die Zellen auf erfolgreiche Expressionsinhibition bzw. Überexpression hin überprüft oder Folgeuntersuchungen durchgeführt.

2.2.11 Calcium-Phosphat-Transfektion

Zur Überexpression von Proteinen in HEK 293- oder 293T-Zellen wurden cDNA-Expressionsvektoren mit der Calcium-Phosphat-Methode in die Zellen transfiziert.

Zu diesem Zweck wurden pro Transfektion $1,5 \times 10^6$ Zellen in 10 mL HEPES-freiem DMEM-Zellkulturmedium (mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 50 µg/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin) in einer 100 mm Zellkulturschale verteilt und zum Adhärenzieren für 20 Stunden im 37°C/5% CO₂-Brutschrank inkubiert. Das Calcium-Phosphat-DNA-Reagenz wurde vorbereitet, indem je 5 µg cDNA-Plasmid mit 440 µL sterilem Milli-Q-H₂O und 50 µL 2,5 M CaCl₂ gemischt und diese Lösung tropfenweise und unter stetigem Schütteln auf je 500 µL 2 x HBS gegeben wurde. Dadurch bildeten sich Plasmid-enthaltende Calcium-Phosphat-Kristalle, die später für die Transfektion von den Zellen phagozytiert werden sollten. Zu diesem Zweck wurde das Calcium-Phosphat-DNA-Reagenz tropfenweise und unter leichtem Schütteln der Zellkulturplatte gleichmäßig auf den adhärenzierten Zellen (im Medium) verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden im 37°C/5% CO₂-Brutschrank inkubiert, bevor die Transfektion überprüft oder Folgeuntersuchungen durchgeführt wurden.

2.2.12 Zellyse und BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Um Proteine aus humanen Zellen zu extrahieren, wurden die Zellen mit TNE-Lysepuffer (50 mM Tris (pH 8,0), 1% (v/v) NP-40, 2 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM NaF, 0,04% (v/v) Boehringer Complete® Protease-Inhibitor-Cocktail (hergestellt aus einer Complete®-Tablette in 2 mL H₂O)) oder IP-Lysepuffer (150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)) lysiert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen, danach mit Lysepuffer gemischt und für 10–30 Minuten unter Schütteln auf Eis inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Proteine enthaltende Überstand abgenommen und direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten wurden Pierce® BCA Protein Assay Reagenzien nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.13 Isolierung von Membran-, Zytosol- und Nukleusfraktionen aus Jurkat-Zellen

Um TNF-bedingte intrazelluläre Verteilungsunterschiede von EED zu verifizieren, wurden Membran-, zytoplasmatische und nukleäre Proteine in unbehandelten und für 3 Minuten mit TNF stimulierten Zellen voneinander getrennt und isoliert. Dafür wurden das ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit und das ProteoJET™ Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit von Thermo Scientific nach Herstellerangaben verwendet. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch Detektion von Cadherin, Tubulin und Histon als charakteristische membranständige, zytosolische bzw. nukleäre Proteine im Western Blot überprüft. Aktin-Detektion diente jeweils als Ladekontrolle.

2.2.14 Koimmunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation (IP) kann ein bestimmtes Protein aus einem komplexen Gemisch, beispielsweise einem Zelllysat, mittels eines spezifischen Antikörpers und eines antikörperbindenden Proteins wie Protein G isoliert und angereichert werden. Bei der Koimmunpräzipitation (Ko-IP) werden Proteinbindungen nachgewiesen, indem ein an das immunpräzipitierte Molekül bindendes Protein durch Western Blot im Immunpräzipitat detektiert wird. In dieser Arbeit wurden Immunpräzipitationen im Magnetfeld mit paramagnetischen Protein G-gebundenen μ MACS™ Mikrokügelchen, μ MACS™ Separierungs-Säulen und einem magnetischen Säulenständer (OctoMACS™ Separator) durchgeführt.

Vor der eigentlichen IP wurden Zellen mit einem IP-Lysepuffer lysiert und die Proteinkonzentration mittels BCA gemessen (s. Kapitel 2.2.4).

Pro Einzel-IP wurden jeweils 200-500 μ g Gesamtprotein verwendet und mit IP-Lysepuffer auf 500 μ L aufgefüllt. Anschließend wurden 2 μ g monoklonaler bzw. 4 μ g polyklonaler, an das zu präzipitierende Protein bindender Antikörper und 50 μ L Protein G-Mikrokügelchen mit dem Lysat vermischt und für mindestens 45 Minuten auf Eis inkubiert. Bei Negativkontroll-IPs wurde kein Antikörper verwendet. Für jede IP wurde eine Separierungs-Säule im Magnetfeld des Säulenständers platziert und mit je 200 μ L IP-Lysepuffer gespült. Das vorbereitete IP-Lysat wurde darauf in eine Säule pipettiert, so dass die Protein G-gebundenen Mikrokügelchen mitsamt assoziiertem Antikörper und dem jeweiligen Zielprotein im Magnetfeld festgehalten wurden, während das restliche Lysat aus der Säule

fließen konnte. Verbliebene Lysatreste wurden in mehreren Waschschritten aus der Säule gespült. Zunächst wurde dreimal mit je 200 μL IP-Lyse-Puffer gewaschen, darauf folgte ein Spülschritt mit 200 μL Hochsalz-Waschpuffer (500 mM NaCl, 1% (w/v) NP-40, 50 mM Tris/HCl (pH 8.0)), ein weiterer mit 200 μL IP-Lysepuffer und ein abschließender Waschschriff mit 200 μL Niedrigsalz-Waschpuffer (1% (w/v) NP-40, 50 mM Tris/HCl (pH 8.0)), um im Western Blot störende Salzreste zu eliminieren.

Um das präzipitierte Protein von den Protein G-Mikrokügelchen zu lösen und zu sammeln, wurden je 20 μL von 95°C heißem Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 50 mM DTT, 1% (w/v) SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin) in die Säulen pipettiert und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden weitere 50 μL heißer Elutionspuffer dazugegeben und das aus der Säule tropfende Eluat mit einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

Das eluierte Immunpräzipitat wurde bei -20°C eingefroren oder direkt verwendet. Durch Western Blot-Analysen konnten das jeweils präzipitierte Protein sowie daran bindende Moleküle im Immunpräzipitat nachgewiesen werden.

2.2.15 SDS-PAGE und Western Blot

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) angewendet. Dabei bilden die Proteine durch Bindung an SDS negativ geladene Komplexe, welche in einem elektrischen Feld mit einer ihrer Größe/Ladung entsprechenden Geschwindigkeit zum positiven Pol wandern.

Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 125 mM Tris (pH 6,8), 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen (durch 4:1 Mischung von Zelllysat und fünffach konzentriertem Probenpuffer) und für 5 Minuten durch Erhitzen bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben und ein Proteingrößenstandard (Page RulerTM Prestained Protein Ladder) auf ein 7,5-12-prozentiges Polyacrylamidgel in einer mit SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01% (w/v) SDS) gefüllten Elektrophoresekammer aufgetragen und bei 25 mA Stromstärke elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, indem sie für 60 Minuten bei konstanter Spannung von 100 V in einer mit Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) gefüllten Western-Blot-Kammer vom Gel in die Membran migrierten. Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBST (PBS mit 0,1% (v/v) Tween® 20) für je zehn Minuten

wurden unspezifische Antikörperbindestellen durch 60-minütige Inkubation der Membran in Blockierungspuffer (5% (v/v) Magermilchpulver oder BSA in PBST) blockiert. Daraufhin wurde die Membran für 16 Stunden bei 4°C in Blockierungslösung inkubiert, die mit dem primären, gegen das jeweilige Zielprotein gerichteten Antikörper gemischt wurde. Die Verdünnung der Antikörper richtete sich nach den Herstellerangaben. Nach Entfernung von ungebundenen Antikörpern durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBST wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem 1:10000 in Blockierungspuffer verdünnten, Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Ungebundene Sekundärantikörper wurden daraufhin ebenfalls durch dreimaliges Waschen mit PBST ausgespült. Die Antikörper-gebundenen, Peroxidase-konjugierten Proteine wurden schließlich mittels ECL-Chemolumineszenz-Reagenzien nach Herstellerangaben detektiert und das Signal auf AmershamTM Hyperfilm übertragen.

2.2.16 Immunfluoreszenzen

Um intrazelluläre Proteinverteilungsmuster zu detektieren oder Expressionsinhibitionen bzw. die Überexpression von Proteinen zu überprüfen, wurde die Immunfluoreszenzmethode verwendet. Dabei wurden die Zellen zunächst mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit Aceton/Ethanol permeabilisiert. Anschließend wurden die Zielproteine entweder mit direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern (direkte Immunfluoreszenz) oder mit unmarkierten Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern (indirekte Immunfluoreszenz) sichtbar gemacht.

Suspensionszellen wie Jurkat-Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS vom Zellmedium befreit. Anschließend wurden je 5×10^5 Zellen in 300 μ L 37°C warmem PBS auf ImmunoSelect® Adhäsions-Objektträgern verteilt, auf denen auch normalerweise nicht adhären Zellen haften. Damit die Zellen auf der Oberfläche adhärten, wurden die Objektträger für 15 Minuten im 37°C/5% CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das PBS vorsichtig dekantiert und je nach Versuchsziel durch vorgewärmtes Medium mit oder ohne TNF (100 ng/mL) ersetzt. Um TNF-induzierte Reaktionen der Zellen zu stoppen, wurden die Objektträger nach Ablauf der erwünschten Inkubationszeiten in eiskaltes PBS überführt. Es folgten jeweils zwei weitere fünfminütige Waschschrte in eiskaltem PBS, bevor je 300 μ L eiskaltes PFA (3% (w/v) in PBS, pH 7,2) auf die Zellen pipettiert wurden.

Material und Methoden

Die Objektträger mit PFA wurden zur Fixierung der Zellen für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend dreifach für je 10 Minuten mit PBS gewaschen.

Bei den in Kapitel 3.1 beschriebenen Immunfluoreszenzen wurden Suspensionszellen - alternativ zur direkten Adhäsion auf Adhäsions-Objektträgern - auf unbeschichtete Objektträger zytofugiert. TNF-Stimulierungen und deren Abstoppen unter Zugabe von eiskaltem PBS im Überfluss sowie PFA-Fixierung und die anschließenden Waschschrte wurden dabei in Reaktionsgefäßen durchgeführt, bevor die Zellen mit der Cytofuge 2 (IRIS Sample Processing) für 5 Minuten bei 850 RPM auf Objektträger zentrifugiert und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

Sowohl auf Objektträger adhärenzte als auch zytofugierte fixierte Zellen wurden durch fünfminütige Inkubation der Objektträger in Aceton/Ethanol (1 : 1) bei -20°C permeabilisiert und erneut drei mal für je 10 Minuten in PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen wurden die Zellen für mindestens eine Stunde mit Blockierungslösung (1% (w/v) BSA in PBS) bei Raumtemperatur präinkubiert, bevor je 100 µL der gegen die Zielproteine gerichteten, in Blockierungslösung verdünnten Antikörper auf die Zellen pipettiert wurden. Die Verdünnung richtete sich jeweils nach den Herstellerangaben der verwendeten Antikörper. Um Antikörperbindungen zu ermöglichen, wurden die Objektträger für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden drei weitere zehnminütige Waschschrte mit PBS vorgenommen und die Zellen bei direkter Immunfluoreszenz mit je 20 µL proLong® Gold Antifade-Reagenz mit DAPI und 18 x 18 mm-Deckgläschen eingebettet. Bei indirekter Immunfluoreszenz folgte auf die Waschschrte eine einstündige Inkubation der Zellen bei 37°C mit gegen die Primäntikörper gerichteten fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor-Sekundäntikörpern (je 1 : 200 verdünnt in Blockierungslösung). Nach drei weiteren PBS-Waschschrten wurden die Zellen ebenfalls bei gleichzeitiger DAPI-Färbung eingebettet.

Immunfluoreszenzen mit adhärenzten Zellen wie HeLa- und 293T-Zellen wurden nach dem gleichen Prinzip, aber nicht direkt auf Objektträgern, durchgeführt. Je $1,5 \times 10^5$ Zellen in 1000 µL Medium wurden auf (zuvor für 30 Minuten mit HCl angeätzte, danach gewaschene und sterilisierte) runde Deckgläschen in 12-Kavitäten-Platten pipettiert. Die Zellen konnten nun für 20 Stunden im 37°C/5% CO₂-Inkubator an das Deckgläschen adhären und ihre natürliche, ausgestreckte Form annehmen. Anschließende TNF-Stimulationen und deren Abstopfung auf Eis unter Zugabe von eiskaltem PBS im Überfluss erfolgten ebenso in der 12-Kavitäten-Platte wie die PFA-Fixierung und direkt darauf folgende Waschschrte. Für die Permeabilisierung, alle weiteren Waschschrte und die Präinkubation in Blockierungslösung wurden die zellbewachsenen Deckgläschen in Deckgläschenständer umgelagert. Bei den

Antikörpermarkierungsschritten wurden je 50 µL der verwendeten Antikörper in Blockierungslösung (s. o.) auf Parafilm pipettiert und die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten darauf positioniert. Zur Einbettung und Zellkernfärbung wurden die Deckgläschen in gleicher Ausrichtung mit je 20 µL proLong® Gold Antifade-Reagenz mit DAPI auf unbeschichteten Objektträgern fixiert.

2.2.17 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mittels Immunfluoreszenz markierte Zellen wurden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta Version 3.2 von Zeiss sowie der korrespondierenden Software (AIM Meta und LSM Image Browser) untersucht und fotografiert. Rote, grüne und blaue Fluoreszenz wurde bei Anregungswellenlängen von 543 nm, 488 nm und 351 nm detektiert.

2.2.18 N-SMase-Aktivitätsmessungen

Um zu überprüfen, ob verschiedene Kandidatproteine an der TNF-induzierten N-SMase-Aktivierung beteiligt sind, wurden zunächst spezifische und Negativkontroll-siRNAs oder cDNA-Expressionsvektoren in Jurkat-Zellen transfiziert (s. Kapitel 2.2.10).

Die anschließenden Messungen der neutralen SMase-Aktivität wurden von Dr. Supandi Winoto-Morbach, Institut für Immunologie der CAU Kiel, wie zuvor beschrieben (Neumeyer et al., 2006) durchgeführt. Bei dieser Methode wurden Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen lysiert. Anschließend wurde die Aktivität der nSMase2 im Lysat durch Inkubation mit [N-methyl-¹⁴C]-Sphingomyelin als Substrat und Nachweis des bei neutralem pH durch die nSMase2 gebildeten [¹⁴C]-Phosphocholin im Szintillationszähler gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 EED ist das letzte noch fehlende Glied im Signalweg vom TNF-R1 zur nSMase2

3.1.1 FAN und RACK1 sind keine direkten Bindungspartner der nSMase2

In einem früher durchgeführten Yeast Two-Hybrid Screen mit FAN als Köderprotein war RACK1 eines der identifizierten Beuteproteine, und es hatte sich herausgestellt, dass die TNF-R1·FAN·RACK1-Kaskade zur TNF-stimulierten N-SMase-Aktivierung führt (Tcherkasowa et al., 2002). Weder in der Studie von Tcherkasowa et al. noch in einem unabhängigen, früheren Y2H-Screen im Vorfeld zu dieser Doktorarbeit mit RACK1 als Köderprotein (unveröffentlichte Daten) hatte sich die nSMase2 unter den isolierten Beuteproteinen befunden.

Vor der weiteren Analyse von EED und der Suche nach anderen nSMase2-Interaktionspartnern sollte daher abschließend überprüft werden, ob die nSMase2 direkt an FAN oder RACK1 binden kann. Zu diesem Zweck wurden Y2H-Doppeltransformationen mit der nSMase2-cDNA im plex202-Vektor und der FAN- bzw. RACK1-cDNA im pB42AD-Vektor - sowie umgekehrt - durchgeführt (die cDNAs kodierten jeweils für die vollständigen Proteine). Erfolgreiche Kotransformationen wurden durch Selektion auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺-Platten überprüft.

Nach Selektionsausstrich der transformierten Kolonien auf U⁻H⁻W⁻ Gal⁺ X-Gal⁺- Platten kam es in keinem Fall zu einem Wachstum blauer Hefen (s. Tabelle 8). FAN und RACK1 binden im Yeast Two-Hybrid-System also erwartungsgemäß nicht direkt an die nSMase2. Somit bedarf es in der TNF-abhängigen nSMase2-Signalkaskade mindestens eines Bindeglieds zwischen dem TNF-R1·FAN·RACK1-Komplex und der nSMase2. Das Polycomb-Group-Protein EED konnte in einer früheren Y2H-Studie sowohl an RACK1 als auch an die nSMase2 binden. Es stellt somit einen viel versprechenden Kandidaten für ein verbindendes Molekül zwischen diesen Proteinen dar.

Ergebnisse

Tabelle 8: die vollständige nSMase2 interagiert im Y2H-System weder mit FAN noch mit RACK1

	pB42AD.FAN ₃₋₉₁₇	pB42AD.RACK1 ₁₋₃₁₇	plex.FAN ₃₋₉₁₇	plex.RACK1 ₁₋₃₁₇
plex.nSMase2 ₁₋₆₅₅	-	-	/	/
pB42AD.nSMase2 ₁₋₆₅₅	/	/	-	-

Der im jeweiligen Konstrukt kodierte Aminosäurenbereich ist angegeben.

3.1.2 TNF induziert die Translokation von überexprimiertem EED ins Zytoplasma und an die Zellmembran

Die nSMase2 und RACK1 wurden ursprünglich als an der Plasmamembran und im zytoplasmatischen Raum lokalisierte Proteine identifiziert, während Polycomb-Group-Proteine als überwiegend nukleär lokalisierte Moleküle bekannt sind (Tcherkasowa et al., 2002; Su et al., 2005). Um zu beurteilen, ob eine direkte Interaktion von EED und nSMase2 auch *in vivo* räumlich möglich ist, sollte die intrazelluläre Verteilung von EED in verschiedenen Zellen analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die Lokalisation von überexprimiertem EED per Immunfluoreszenz untersucht. Es wurde der Expressionsvektor pFLAG-CMV2 mit an die FLAG-Sequenz ligierter vollständiger EED-cDNA-Sequenz (Aminosäuren 2-441) verwendet. Mit diesem Konstrukt wurden Jurkat-T-Lymphozyten mittels Amaxa-Nukleofektion transient transfiziert. Um einen möglichen Einfluss von TNF auf die EED-Proteinverteilung zu erfassen, wurden die transfizierten Zellen für 0, 1,5, 3 und 10 Minuten mit 100 ng/mL TNF in CLICK RPMI-Medium inkubiert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzversuche mit den Zellen durchgeführt und das an FLAG fusionierte EED mit einem Maus-anti-FLAG-Antikörper (Sigma) und fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus-Zweitantikörper (Molecular Probes, grün) nachgewiesen. Als bildgebendes Verfahren diente die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Es stellte sich heraus, dass überexprimiertes EED in unbehandelten Zellen größtenteils im Zellkern und nur geringfügig im Zytoplasma oder an der Membran lokalisiert war. Schon nach 90-sekündiger TNF-Stimulation war FLAG-EED jedoch wesentlich prominenter im extranukleären Raum zu erkennen und nach dreiminütiger Inkubation war ein noch größerer Anteil des Proteins ins Zytoplasma und an die Plasmamembran transloziert. Der zytosolische EED-Gehalt war auch nach zehn Minuten TNF noch gleich

bleibend hoch (s. Abb. 7A). Die Immunfluoreszenzversuche mit den transfizierten Zellen wurden mit einem Anti-EED-Antikörper (Abcam) zur direkten Erkennung des Zielproteins wiederholt und ergaben identische Ergebnisse (s. Abb. 7B).

3.1.3 TNF induziert die Translokation von endogenem EED ins Zytoplasma und an die Zellmembran

Es sollte im Folgenden überprüft werden, ob die beobachtete TNF-induzierte EED-Translokation in transfizierten Jurkat-T-Zellen einen durch die Überexpression und die entsprechend übernatürlich großen Proteinmengen verursachten Effekt darstellt. Deshalb wurden zwei verschiedene Kaninchen-anti-EED-Antikörper auf ihre Fähigkeit hin untersucht, endogenes EED in Jurkat-Zellen per Immunfluoreszenz sichtbar zu machen. Als fluoreszenzgekoppelter Zweitantikörper diente jeweils ein Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen Antikörper (grün). Sowohl durch den EED-Antikörper von Abcam als auch durch den von Santa Cruz konnte in untransfizierten und unbehandelten Jurkat-Zellen ein für EED typisches, überwiegend nukleäres Proteinverteilungsmuster dargestellt werden. Das Signal war jedoch mit dem Abcam-Antikörper wesentlich stärker, weshalb dieser für die folgenden Kollokalisationsstudien verwendet wurde (vgl. Abb. 7C und D, 0' TNF).

Endogenes EED translozierte in Jurkat-Zellen nach 1,5-minütiger TNF-Stimulation ebenso aus dem Kern ins Zytoplasma wie das überexprimierte EED. Die größten zytosolischen Proteinmengen konnten auch in diesem Fall nach drei- bis zehnminütiger TNF-Stimulation beobachtet werden (s. Abb. 7C, D).

Die TNF-bedingte EED-Translokation sollte mit Hilfe einer weiteren Methode verifiziert werden. Unbehandelte und drei Minuten in TNF-haltigem Medium inkubierte Jurkat-Zellen wurden mit ProteoJET-Extraktionskits von Fermentas in Zytoplasma-, Membran- und Nukleus-Fractionen unterteilt. Die EED-Mengen wurden durch Western-Blot mit einem monoklonalen Maus-anti-EED-Antikörper (Millipore) ermittelt. Gleiche Proteinlademengen wurden durch Aktin-Detektion kontrolliert und die Reinheit der Fractionen wurde durch die Detektion von Tubulin, Cadherin und Histon als charakteristische zytosolische, membranständige bzw. nukleäre Komponenten überprüft. In Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzstudien nahm die EED-Menge nach TNF-Stimulation im Zytoplasma und an der Membran zu und entsprechend in der Zellkernfraction ab (s. Abb. 7E).

Ergebnisse

Um zu ermitteln, ob TNF die Translokation von EED nicht nur in „Laborzelllinien“, sondern auch in primären menschlichen Lymphozyten induziert, wurden EED-Immunfluoreszenzen mit aktivierten primären T- und B-Zellen durchgeführt, die zuvor aus humanem Blut extrahiert worden waren. Im Fall der primären T-Zellen konnte nach 1,5, 3 und 10 Minuten Inkubation mit TNF ein ähnlicher (lediglich etwas geringer ausgeprägter) EED-Translokationsprozess beobachtet werden wie in den Jurkat-T-Zellen (s. Abb. 8A). Somit konnte die *in-vivo*-Relevanz des TNF-Einflusses auf EED auch direkt im humanen System verifiziert werden. In den primären B-Zellen war EED hingegen bereits konstitutiv und in großen Mengen zytoplasmatisch lokalisiert. Eine Veränderung durch TNF fand entsprechend nicht statt (s. Abb. 8B).

EED-Translokation durch Integrinaktivierung wurde außer in Jurkat-T-Zellen in geringerem Ausmaß auch in adhärennten HeLa-Zellen nachgewiesen (Witte et al., 2004). Deshalb sollten TNF-bedingte EED-Verteilungsunterschiede durch Wiederholung der Immunfluoreszenzversuche auch bei dieser Zelllinie untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass auch in HeLa-Zellen nach 1,5-10-minütiger TNF-Stimulation mehr EED im zytoplasmatischen Kompartiment zu verzeichnen war als bei der unbehandelten Kontrolle. Der Effekt war jedoch weniger deutlich ausgeprägt. EED war auch ohne TNF-Stimulation außerhalb des Zellkerns nachzuweisen und die (dennoch überwiegende) nukleäre EED-Menge nahm durch TNF-Inkubation nur geringfügig ab (s. Abb. 8C).

Als weitere adhärennte Zelllinie wurden 293T-Zellen in gleicher Weise auf EED-Translokation durch TNF überprüft. Auch bei diesen Zellen war EED überwiegend im Zellkern und deutlich geringer im Zytoplasma verteilt. Eine prägnante Änderung der EED-Verteilung durch verschieden lange TNF-Inkubationen konnte hier jedoch nicht beobachtet werden (s. Abb. 8D). EED-Überexpression durch Calcium-Phosphat-Transfektion in 293T-Zellen erbrachte bei der Immunfluoreszenz zwar erwartungsgemäß stärkere Signale in der Fluoreszenzmikroskopie, aber auch in diesem Fall veränderte TNF das EED-Verteilungsmuster nicht in deutlich erkennbarem Ausmaß (s. Abb. 8E). Eine TNF-abhängige N-SMase-Aktivierung war in 293T-Zellen allerdings bislang auch nicht beschrieben worden.

Ergebnisse

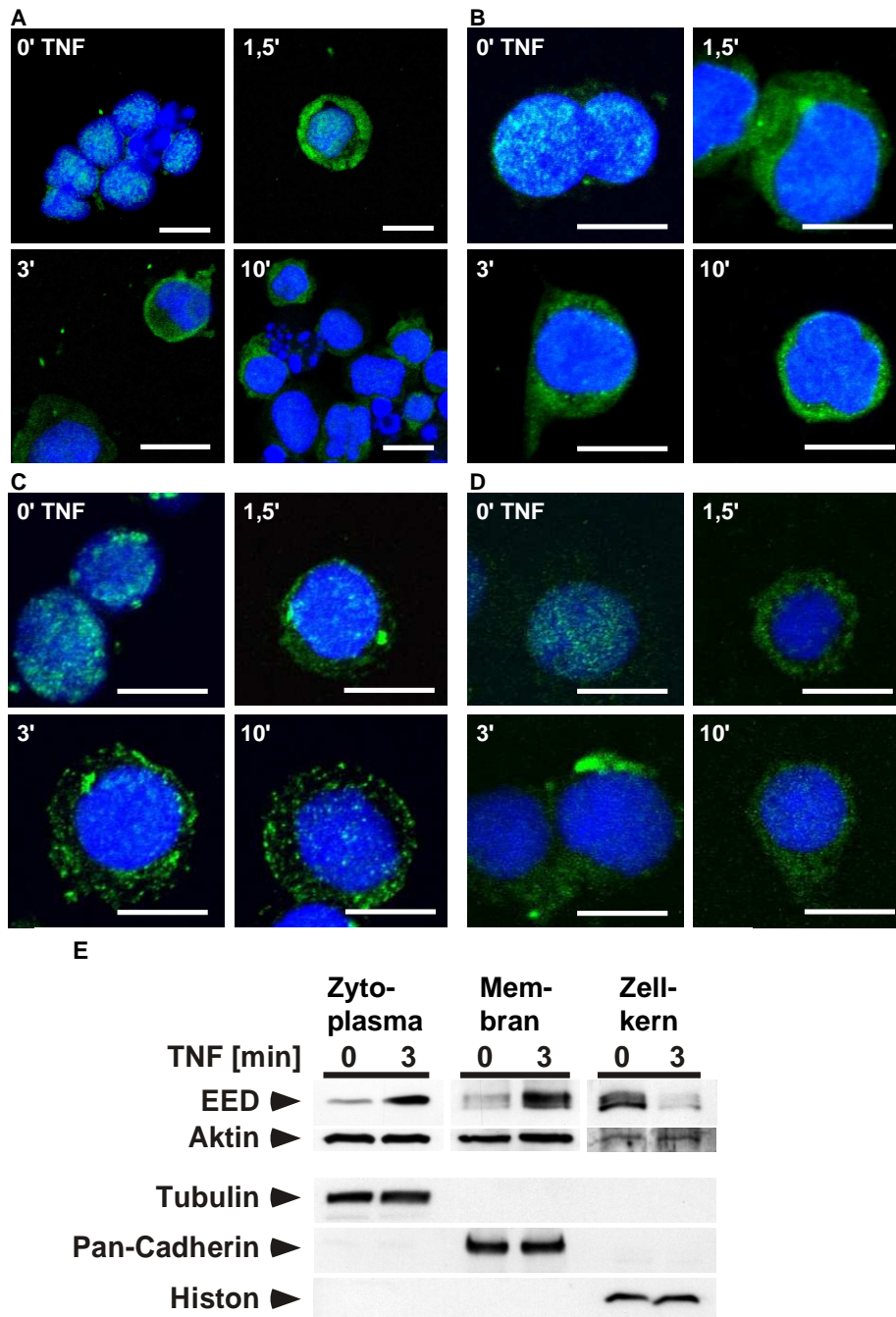


Abb. 7: EED transloziert bei Jurkat-Zellen nach TNF-Stimulation aus dem Zellkern ins Zytoplasma und an die Plasmamembran. A-D: Immunfluoreszenzen nach 0, 1,5, 3 und 10 min. TNF-Stimulation (100 ng/mL). A: Detektion von überexprimiertem EED durch Maus-anti-FLAG-Antikörper (Sigma) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) in pFLAG-CMV2.EED₂₋₄₄₁-transfizierten Jurkat-Zellen B: Detektion von überexprimiertem EED durch Kaninchen-anti-EED-Antikörper (Abcam) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) in FLAG-EED-transfizierten Jurkat-Zellen. C, D: Detektion von endogenem EED durch Kaninchen-anti-EED-Antikörper von Abcam (C) bzw. von Santa Cruz (D) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) in untransfizierten Jurkat-Zellen. A-D: Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 µm). E: EED-Detektion in isolierten Zytoplasma-, Membran- und Nukleus-Fractionen von 0 und 3 min. TNF-stimulierten Jurkat-Zellen durch Maus-anti-EED-Antikörper (Millipore). Multiple EED-Banden sind auf das Vorhandensein verschiedener EED-Isoformen zurückzuführen (Kuzmichev et al., 2004). Aktin-Detektion dient als Ladekontrolle, die Reinheit der Fractionen wurde durch Nachweis von fraktionsspezifischen Proteinen mit Tubulin-, Pan-Cadherin- und Histon-Antikörpern sichergestellt.

Ergebnisse

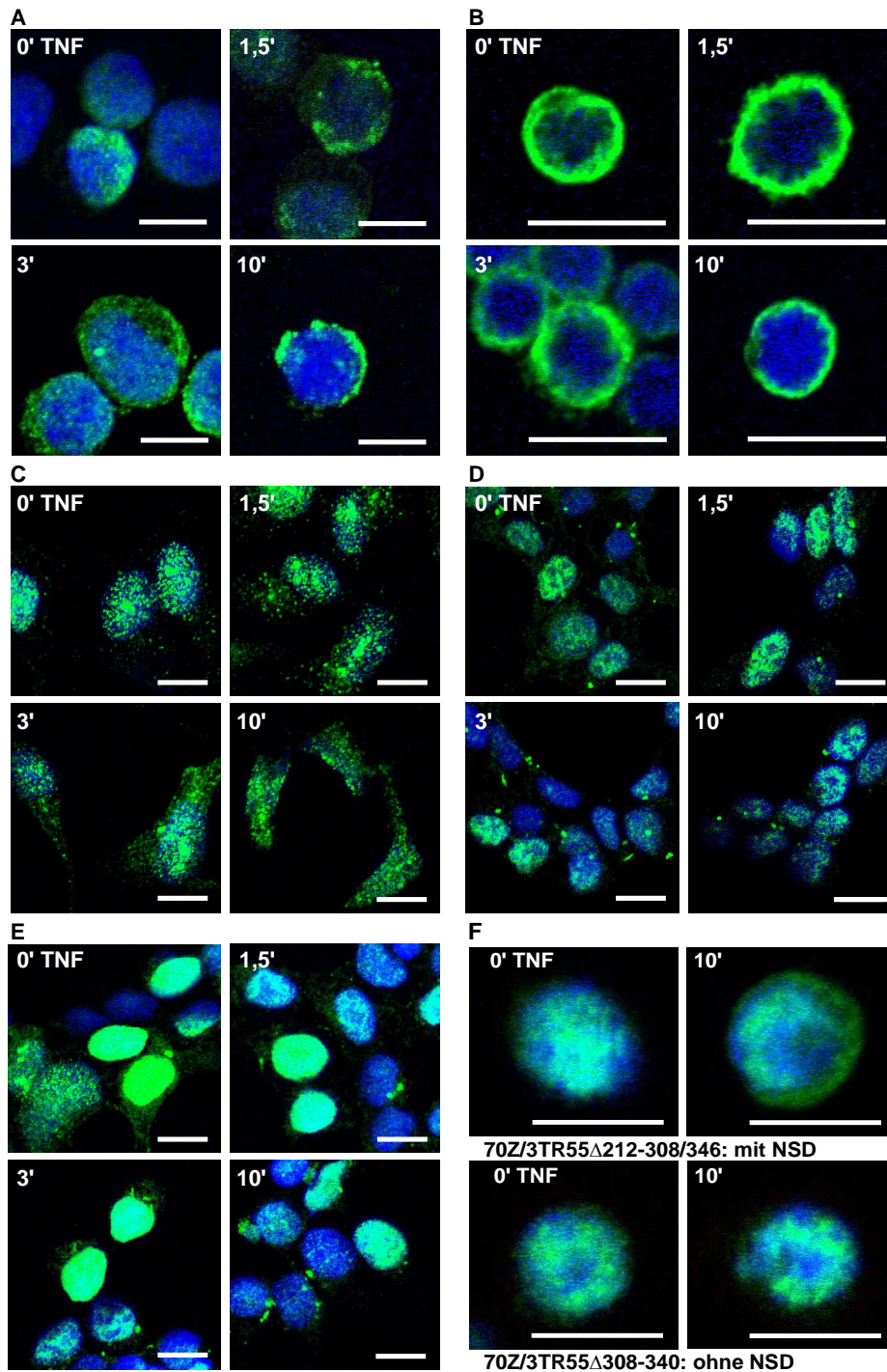


Abb. 8: Verteilung von EED in verschiedenen Zellen nach Stimulation mit TNF. Zellen wurden für 0, 1,5, 3 und 10 min. mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. EED wurde in der Immunfluoreszenz mittels Kaninchen-anti-EED-Antikörpern (Abcam) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. A: EED-Translokation durch TNF in primären aktivierten T-Zellen; B: konstitutiv zytoplasmatische EED-Verteilung in primären B-Zellen; C: EED-Translokation durch TNF in HeLa-Zellen; D: keine EED-Translokation durch TNF in 293T-Zellen; E: keine EED-Translokation durch TNF in 293T-Zellen, die 48 Stunden zuvor mit pFLAG-CMV2.EED₂₋₄₄₁ transfiziert wurden; F: EED-Translokation durch TNF in 70Z/3TR55Δ212-308/346-Prä-B-Zellen ohne NSD-Deletion im TNF-R1, aber nicht in 70Z/3TR55Δ308-340-Prä-B-Zellen mit NSD-Deletion (Maßstabsbalken: 10 μm).

3.1.4 EED-Translokation wird durch die N-SMase-Aktivierungsdomäne vermittelt

Um zu überprüfen, welche Domäne des TNF-Rezeptors für EED-Translokation verantwortlich ist, wurden 70Z/3TR55 Δ 212-308/346-Prä-B-Zellen aus der Maus analysiert, die durch eine Deletion im TNF-R1 zwar die NSD exprimieren, aber keine Signale durch die Todesdomäne übermitteln können (Adam et al., 1996). Durch Immunfluoreszenz konnte bei diesen Zellen eine teilweise EED-Translokation durch zehnmütige TNF-Stimulation detektiert werden. Bei 70Z/3TR55 Δ 308-340-Zellen, denen die NSD fehlt (Adam et al., 1996), wurde hingegen keine zytosolische EED-Zunahme durch TNF beobachtet (s. Abb. 8F). Der TNF-Einfluss auf die intrazelluläre EED-Verteilung wird also anscheinend durch die NSD und somit im Rahmen der N-SMase-Aktivierung vermittelt.

3.1.5 TNF induziert Kolokalisation von EED und nSMase2 in EED/nSMase2-überexprimierenden Zellen

Es konnte mittels Immunfluoreszenz- und Zellfraktionierungsversuchen gezeigt werden, dass EED in den meisten Zellformen überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Durch TNF-Stimulation gelangten jedoch größere EED-Mengen ins Zytoplasma und an die Membran (s. Kapitel 3.1.2, 3.1.3), wo auch die nSMase2 lokalisiert ist (Clarke et al., 2006). Ob TNF tatsächlich zu einer gesteigerten Kolokalisation der beiden Proteine führt, sollte daher ebenfalls durch Immunfluoreszenzen untersucht werden.

Es wurden zunächst wieder Jurkat-Zellen durch Amaxa-Nukleofektion mit Expressionsvektoren transfiziert, diesmal für Doppel-Überexpressionen mit an FLAG fusioniertem EED (Vektor: pFLAG-CMV2) und an myc fusionierter nSMase2 (Vektor: pCDNA3.1). Analog zu den EED-Einzeluntersuchungen wurde je ein Teil der transfizierten Zellen mit 1,5, 3 und 10 Minuten TNF stimuliert. Die beiden Proteine wurden anschließend mit Maus-anti-FLAG- (Sigma) und Kaninchen-anti-myc-Antikörper (Santa Cruz) sowie Alexa Fluor 546 Ziege-anti-Maus- und Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (jeweils von Molecular Probes) mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die überexprimierte nSMase2 an der Plasmamembran und im zytosolischen Kompartiment verteilt vorlag. Sie kolokalisierte ohne TNF-Stimulation entsprechend nur in wenigen Bereichen mit dem größtenteils kernständigen EED (s. Abb. 9A). Bereits nach 1,5-minütiger TNF-Stimulation

Ergebnisse

kam es zu einer deutlichen Steigerung der Kolokalisation im Zytosol und an der Membran (s. Abb. 9B) und nach dreiminütigem TNF-Einfluss kolokalisierten die überexprimierten Proteine nahezu vollständig (s. Abb. 9C). Auch nach zehn Minuten war noch keine Kolokalisationsabnahme zu verzeichnen (s. Abb. 9D).

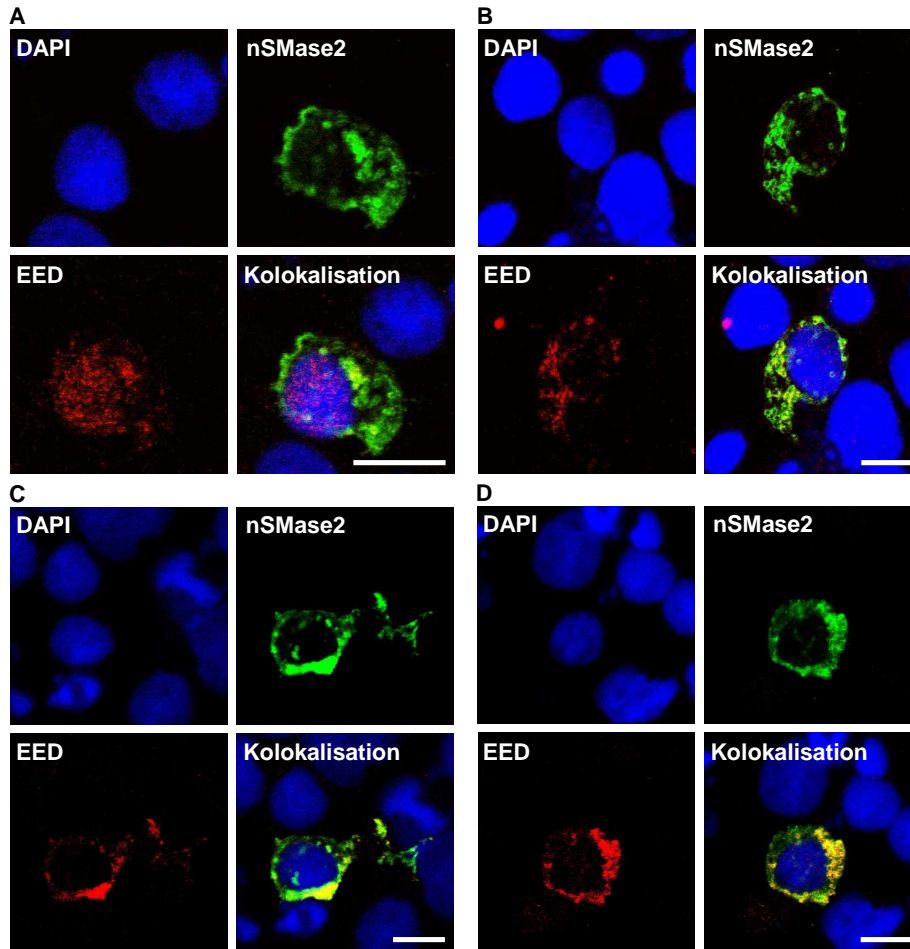


Abb. 9: myc-nSMase2 und FLAG-EED kolokalisieren in Jurkat-Zellen verstärkt nach TNF-Stimulation. Jurkat-Zellen wurden mit pCDNA3.1.myc-nSMase2₁₋₆₅₅ und pFLAG-CMV2.EED₂₋₄₄₁ transfiziert und 48 Stunden danach für 0 min. (A), 1,5 min. (B), 3 min. (C) und 10 min. (D) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Kaninchen-anti-myc-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) und mittels Maus-anti-FLAG-Antikörpern (Sigma) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 546 Ziege-anti-Maus-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von myc-nSMase2 (grün) und FLAG-EED (rot) ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 µm).

3.1.6 TNF induziert Kolokalisation von endogenem EED und endogener nSMase2

Die beobachtete TNF-bedingte Kolokalisationssteigerung von EED und nSMase2 durch TNF sollte mit Antikörpern gegen die endogenen Proteine in untransfizierten Jurkat-Zellen verifiziert werden. Dazu wurden zunächst ein Ziege- und ein Kaninchen-anti-nSMase2-Antikörper (beide von Santa Cruz) in der Immunfluoreszenz getestet. Der Ziege-anti-nSMase2-Antikörper wurde bereits in einer unabhängigen Studie verwendet, um zu demonstrieren, dass die endogene nSMase2 in Neutrophilen überwiegend im Bereich der Plasmamembran lokalisiert ist (Sitrin et al., 2011). In den Immunfluoreszenzen mit Jurkat-Zellen zeigten beide verwendeten Antikörper ein identisches Proteinverteilungsmuster der nSMase2 im Zytoplasma und an der Zellmembran wie der myc-Antikörper bei überexprimierten Zellen (s. Abb. 9A, 10A, E). Eine TNF-induzierte nSMase2-Translokation war nicht zu verzeichnen (s. Abb. 10A-E). Für die folgenden Kolokalisationsstudien wurden der Ziege-anti-nSMase2-Antikörper mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörper (rot) und der Kaninchen-anti-EED-Antikörper von Abcam mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (grün) verwendet.

Das Kolokalisationsmuster der endogenen Proteine war identisch mit dem der überexprimierten aus Kapitel 3.1.5. Auch endogenes EED translozierte bereits nach 90 Sekunden vom Zellkern ins Zytoplasma und kolokalisierte dort mit der nSMase2 (s. Abb. 10A, B). Das größte Kolokalisationsausmaß war nach drei Minuten erreicht (s. Abb. 10C) und blieb auch nach zehnminütiger TNF-Inkubation bestehen (s. Abb. 10D).

Ergebnisse

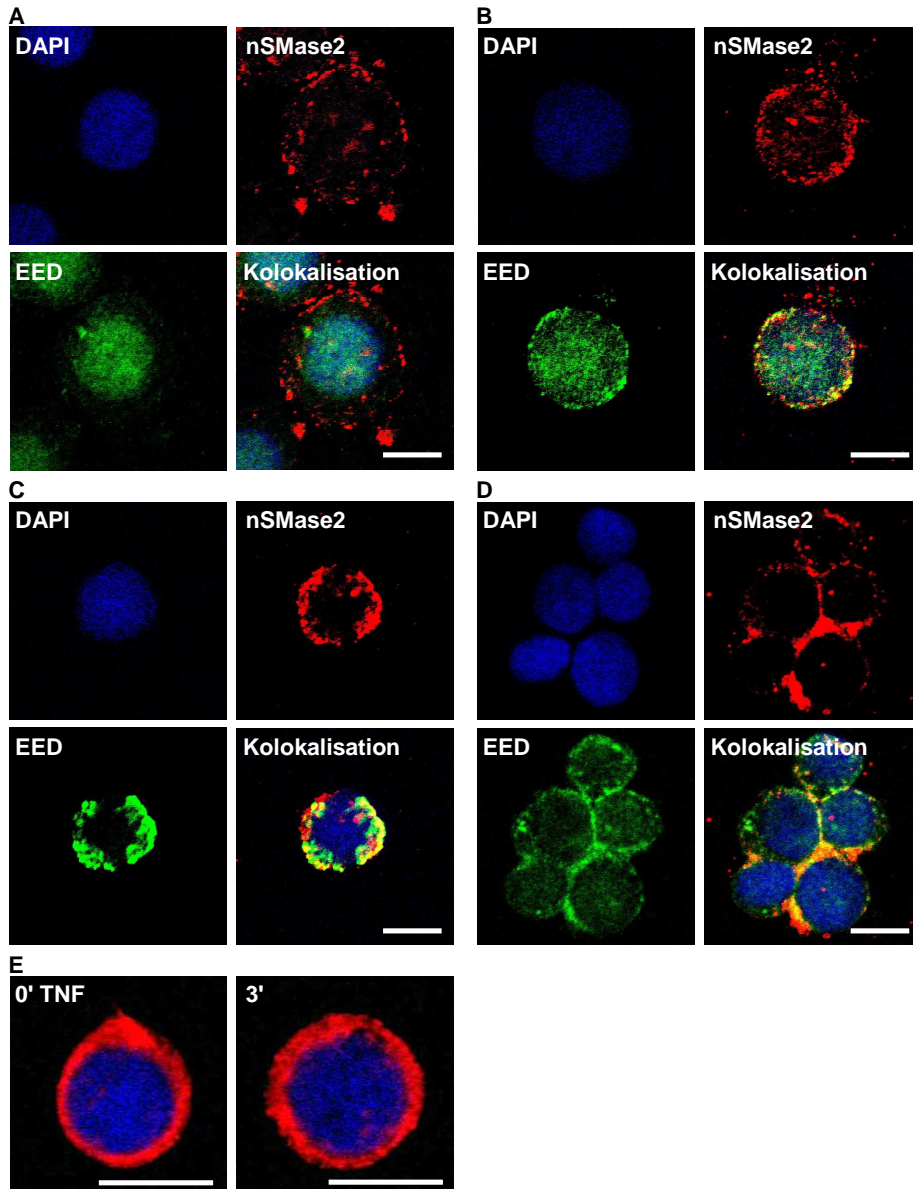


Abb. 10: endogene nSMase2 und endogenes EED kolokalisieren in Jurkat-Zellen verstärkt nach TNF-Stimulation. A-D: Jurkat-Zellen wurden für 0 (A), 1,5 (B), 3 (C) und 10 min. (D) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Ziege-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) und mittels Kaninchen-anti-EED-Antikörpern (Abcam) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Kolokalisation von nSMase2 und EED ist als gelbe Färbung erkennbar. E: Die endogene nSMase2-Verteilung in Jurkat-Zellen, detektiert durch einen weiteren Kaninchen-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot), bleibt nach TNF-Stimulation für 0 und 3 min. unverändert. A-E: Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 µm).

3.1.7 TNF induziert Kolokalisation von endogenem EED und endogenem RACK1

Um ein Bindeglied zwischen nSMase2 und RACK1 bei der TNF-vermittelten nSMase2-Aktivierung darzustellen, muss EED auch mit RACK1 interagieren. Ob dies der Fall ist, wurde daher ebenfalls per Immunfluoreszenz in untransfizierten Jurkat-Zellen untersucht. Zur endogenen RACK1-Detektion diente ein monoklonaler Maus-anti-RACK1-Antikörper (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 546 Ziege-anti-Maus-Zweitantikörper (rot). EED und RACK1 kolokalisierten bereits ohne TNF-Einfluss im Bereich des kernnahen Zytoplasmas (s. Abb. 11A), die Kolokalisation konnte durch TNF allerdings auf weitere Zytosolbereiche und die Plasmamembran ausgeweitet werden (s. Abb. 11B).

Das größte Kolokalisationsausmaß war auch in diesem Fall nach drei- bis zehnminütiger TNF-Stimulation erreicht (s. Abb. 11C, D).

EED ist also nach TNF-Stimulation in identischen intrazellulären Bereichen zu beobachten wie die nSMase2 und RACK1. Da die nSMase2 und RACK1 nicht direkt miteinander interagieren (s. Kapitel 3.1.1), könnte EED im Rahmen der TNF-induzierten nSMase2-Signalkaskade somit das gesuchte Bindeglied zwischen diesen Molekülen darstellen.

Ergebnisse

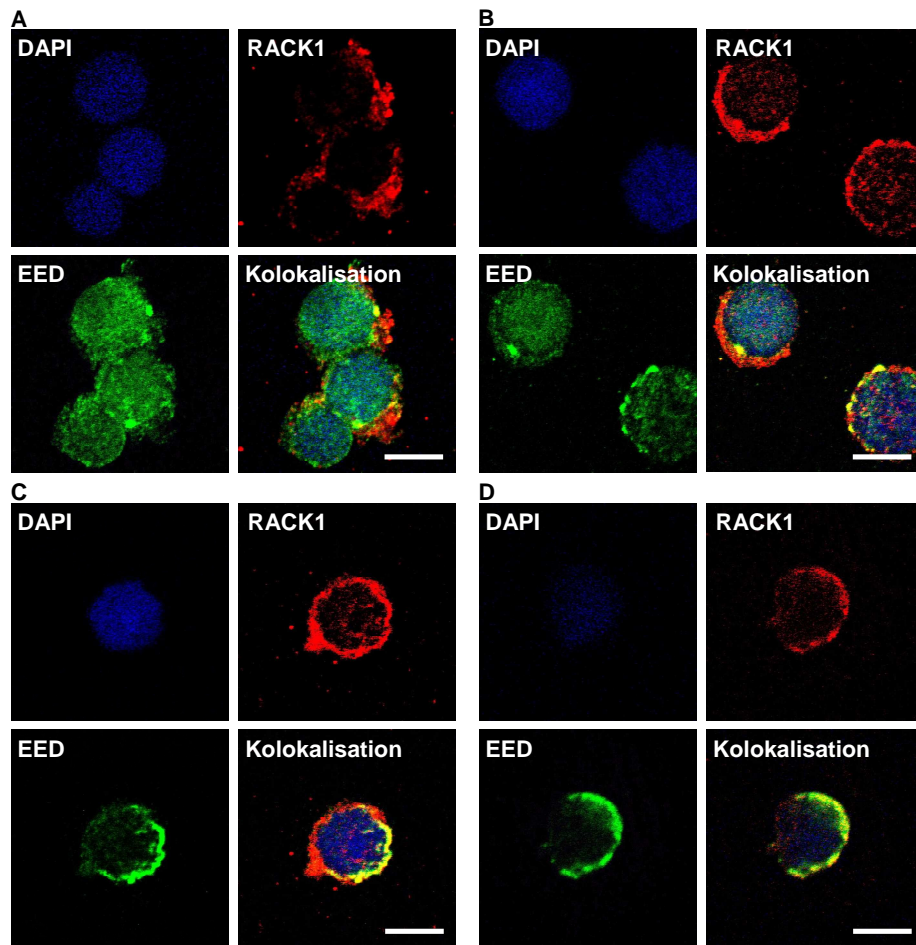


Abb. 11: endogenes RACK1 und endogenes EED kolokalisieren in Jurkat-Zellen verstärkt nach TNF-Stimulation. Jurkat-Zellen wurden für 0 (A), 1,5 (B), 3 (C) und 10 min. (D) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Maus-anti-RACK1-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 546 Ziege-anti-Maus-Zweitantikörper (Molecular Probes, rot) und mittels Kaninchen-anti-EED-Antikörpern (Abcam) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Kolokalisation von RACK1 und EED ist als gelbe Färbung erkennbar. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 μ m).

3.1.8 EED kann mit RACK1 und nSMase2 koimmunpräzipitiert werden und ist ein Bestandteil des TNF-R1-Komplexes

Als ergänzenden Beleg für die TNF-induzierte Bindung von EED an RACK1 und die nSMase2 wurden von Sabine Mathieu und Dr. Vladimir Tchikov, Institut für Immunologie der CAU Kiel, Koimmunpräzipitationen und TNF-R1-Komplex-Präparationen vorgenommen. In Jurkat- und HeLa-Zellen konnte EED mit der nSMase2 koimmunpräzipitiert werden, und zwar in beiden Zelllinien erwartungsgemäß deutlich prominenter nach dreiminütiger TNF-Stimulation (s. Abb. Z1A, links, im Anhang). Die nSMase2 konnte in den EED-Immunpräzipitaten ebenfalls nachgewiesen werden. Hier wurde, höchstwahrscheinlich aufgrund von limitierter Antikörperaffinität und geringer endogener nSMase2-Mengen, keine eindeutige nSMase2-Zunahme durch TNF beobachtet (s. Abb. Z1A, rechts, im Anhang). Die überexprimierte katalytische Domäne der nSMase2 koimmunpräzipitierte mit überexprimiertem EED jedoch intensiver nach TNF-Behandlung (s. Abb. Z1C im Anhang). Wie anhand der Immunfluoreszenzerggebnisse aus Kapitel 3.1.7 zu erwarten war, konnte RACK1 in den endogenen EED-Immunpräzipitaten verstärkt nach TNF-Stimulation detektiert werden (s. Abb. Z1B, links, im Anhang). Ebenfalls nach TNF-Stimulation konnte RACK1 im nSMase2-Immunpräzipitat nachgewiesen werden (s. Abb. Z1B, rechts, im Anhang). Da RACK1 nicht direkt an die nSMase2 bindet, muss dieses Signal aus der Bindung von RACK1 an EED resultieren, welches TNF-abhängig mit der nSMase2 koimmunpräzipitiert wurde. EED bindet also höchstwahrscheinlich an beide Proteine gleichzeitig und komplettiert so die TNF-R1-nSMase2-Signalkaskade.

Immunmagnetische Isolationen von TNF-Rezeptorkomplexen bestätigten zusätzlich die TNF-induzierte Interaktion von EED, nSMase2 und RACK1 im Rahmen der TNF-Signaltransduktion. TNF rekrutierte EED und nSMase2 sowohl in Jurkat- als auch in HeLa-Zellen zum Rezeptor-Komplex. In Übereinstimmung mit den Trans- und Kolokalisationsstudien konnten beide Proteine nach 1,5- bis zehnminütiger TNF-Stimulation verstärkt nachgewiesen werden. TNF-R1 und RACK1 waren in allen magnetischen Fraktionen präsent (s. Abb. Z2A im Anhang). Dieses Ergebnis entspricht früheren Studien, wonach FAN und RACK1 konstitutiv und TNF-unabhängig mit dem TNF-R1 verknüpft sind (Adam-Klages et al., 1996; Tcherkasowa et al., 2002). EED und nSMase2 konnten ferner mit dem TNF-R1 kopräzipitiert werden, und zwar in wesentlich stärkerem Maße nach TNF-Stimulation, während RACK1 auch hier konstitutiv TNF-R1-assoziiert vorlag (s. Abb. Z2B im Anhang).

3.1.9 EED wird für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 benötigt

Um zu testen, ob die Bindung von EED an RACK1 und nSMase2 im Rahmen des TNF-R1-Komplexes von essentieller Bedeutung für die TNF-induzierte nSMase2-Aktivierung ist, sollte die EED-Expression durch RNA-Interferenz inhibiert werden. Zwei EED-siRNAs von Ambion wurden gleichzeitig durch Amaxa-Nukleofektion in Jurkat-Zellen transfiziert. Die Effektivität der EED-Herunterregulation wurde mittels Immunfluoreszenz überprüft. Wie aus Abbildung 12A ersichtlich ist, konnte die EED-Expression erfolgreich inhibiert werden, während eine Negativkontroll-siRNA keinen Effekt auf die endogene EED-Expression zeigte. Bei unbehandelten, EED-siRNA- und Negativkontroll-siRNA-transfizierten Jurkat-Zellen wurde die N-SMase-Aktivität nach 0, 1, 2, 3, 5 und 10 Minuten TNF-Inkubation gemessen. Die N-SMase-Aktivität war bei Negativkontroll-siRNA- und untransfizierten Zellen nach zwei- bis dreiminütiger TNF-Stimulation am höchsten und erreichte nach zehn Minuten wieder die basalen Aktivitätswerte. Durch die EED-siRNAs konnte die TNF-bedingte Aktivitätssteigerung jedoch komplett unterbunden werden (s. Abb. 12B). Es konnte somit gezeigt werden, dass EED einen essentiellen Bestandteil der nSMase2-Aktivierung durch TNF darstellt. Der zeitliche Rahmen der N-SMase-Aktivierung entsprach dabei dem Zeitraum der in Kapitel 3.1.5-3.1.7 geschilderten, durch TNF gesteigerten EED-nSMase2-Kolokalisation.

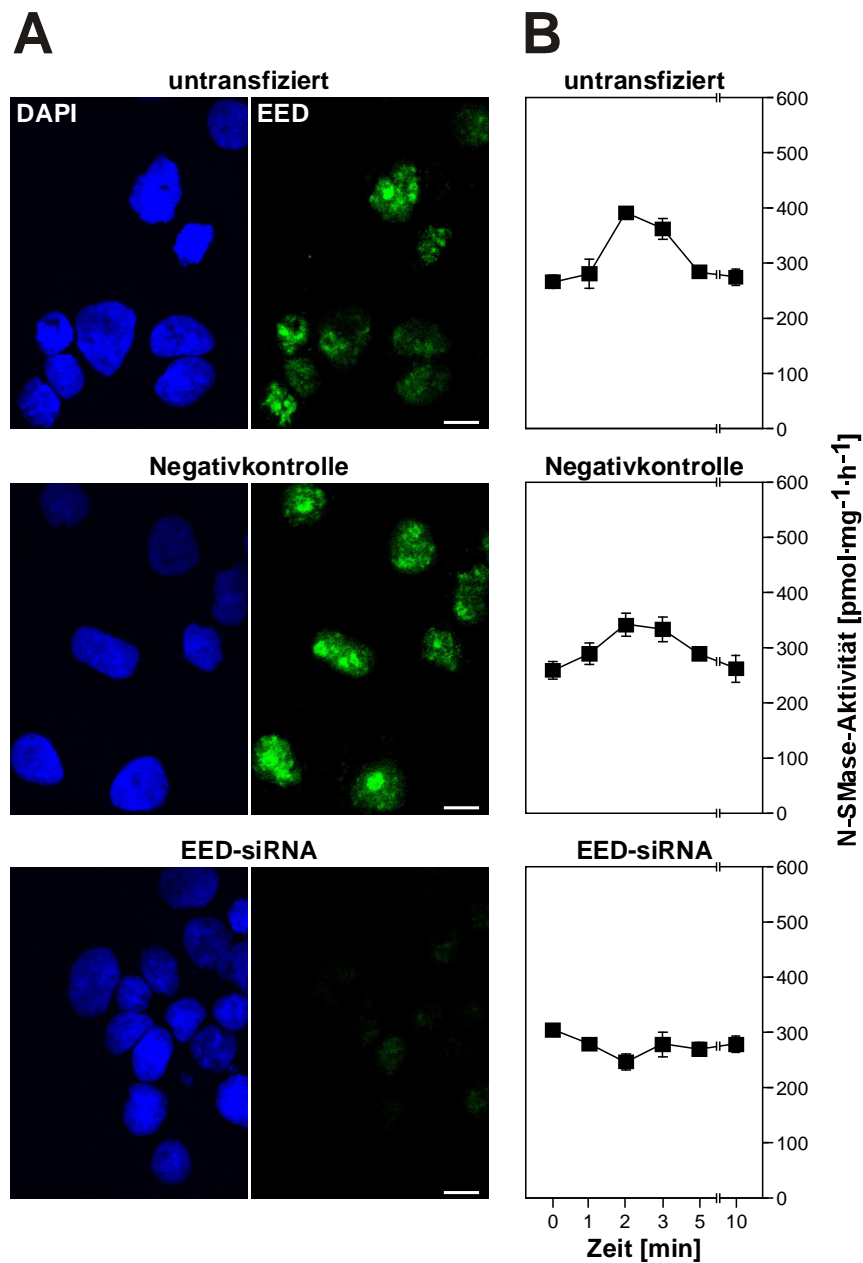


Abb. 12: EED wird für die Aktivierung der nSMase2 durch TNF benötigt. (A) Jurkat-Zellen blieben unbehandelt (oben), wurden mit Negativkontroll-siRNA (Mitte) oder mit EED-spezifischen siRNAs (unten) transfiziert und 48 Stunden später fixiert und permeabilisiert. Die Expression von endogenem EED wurde mittels Kaninchen-anti-EED-Antikörpern (Abcam) mit fluoreszenzgekoppelten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) überprüft. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 μm). (B) N-SMase-Aktivität nach 0, 1, 2, 3, 5 und 10 min. TNF-Stimulation bei unbehandelten, Negativkontroll-siRNA-transfizierten und mit EED-spezifischen siRNAs transfizierten Jurkat-Zellen. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Aktivitätsmessungen dargestellt. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. Die Experimente aus (B) wurden von Stephan Philipp und Dr. Supandi Winoto-Morbach, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

3.1.10 Überexpression von konstitutiv membrangebundenem EED und EED-Einzeldomänen ist nicht ausreichend für die Aktivierung der nSMase2

Um als Bestandteil des TNF-R1-Komplexes die nSMase2 zu aktivieren, muss EED nach TNF-Stimulation an die Zellmembran translozieren (s. Kapitel 3.1.5-3.1.8). Es sollte daher überprüft werden, ob konstitutiv membrangebundenes EED bereits ausreicht, um auch TNF-unabhängig die nSMase2 zu aktivieren. Zu diesem Zweck wurde die vollständige EED-cDNA im Expressionsvektor pFLAG-CMV2 an die Sequenz für das membranintegrierte H-2K^K-Peptid fusioniert. Das Plasmid wurde daraufhin mittels Amaxa-Nukleofektion transient in Jurkat-Zellen transfiziert. Durch Immunfluoreszenz mit direkt fluoreszenzgekoppeltem H-2K^K-Antikörper konnte verifiziert werden, dass derart überexprimiertes H-2K^K-EED konstitutiv membrangebunden vorlag (s. Abb. 13A, oben). Es stellte sich heraus, dass große Mengen membranassoziierter EEDs ohne TNF-Stimulation nicht ausreichten, um die basale N-SMase-Aktivität zu erhöhen (s. Abb. 13B, oben). EED muss für eine nSMase2-Aktivitätssteigerung also zusammen mit dem TNF·TNF-R1·FAN·RACK1-Komplex an die nSMase2 binden. Identische Resultate waren durch Überexpression der nSMase2-bindenden EED-Domäne (FLAG-EEDΔIV-VII; beinhaltet nur die EED-WD-Repeats I-III) und der C-terminalen EED-Region (FLAG-EEDΔI-III; beinhaltet nur die EED-WD-Repeats IV-VIII) zu verzeichnen (s. Abb. 13B, Mitte und unten). Durch Immunfluoreszenz mit Maus-anti-FLAG-Antikörper (Sigma) und fluoreszenzgekoppeltem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus-Zweitantikörper konnte zudem gezeigt werden, dass beide EED-Einzeldomänen nicht mehr nukleär, sondern konstitutiv zytoplasmatisch lokalisiert waren (s. Abb. 13A, Mitte und unten). Für die Shuttle-Bewegung zwischen Kern und Zytoplasma (Witte et al., 2004) werden also offenbar alle EED-Domänen benötigt.

Alle drei Konstrukte verringerten zudem die TNF-induzierte N-SMase-Aktivität (s. Abb. 13B, C). Identische Resultate wurden bereits für die Überexpression von RACK1 berichtet und lassen sich vermutlich auf Interferenz der überexprimierten Proteine mit den endogenen Komponenten der nSMase2-Signalkaskade zurückführen (Tcherkasowa et al., 2002).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass EED nach TNF-Stimulation die Lücke zwischen der nSMase2 und RACK1 schließt, wodurch die nSMase2 aktiviert wird. EED stellt somit das bisher unbekannt fehlende Glied in der Signaltransduktion vom TNF-R1 zur nSMase2 dar.

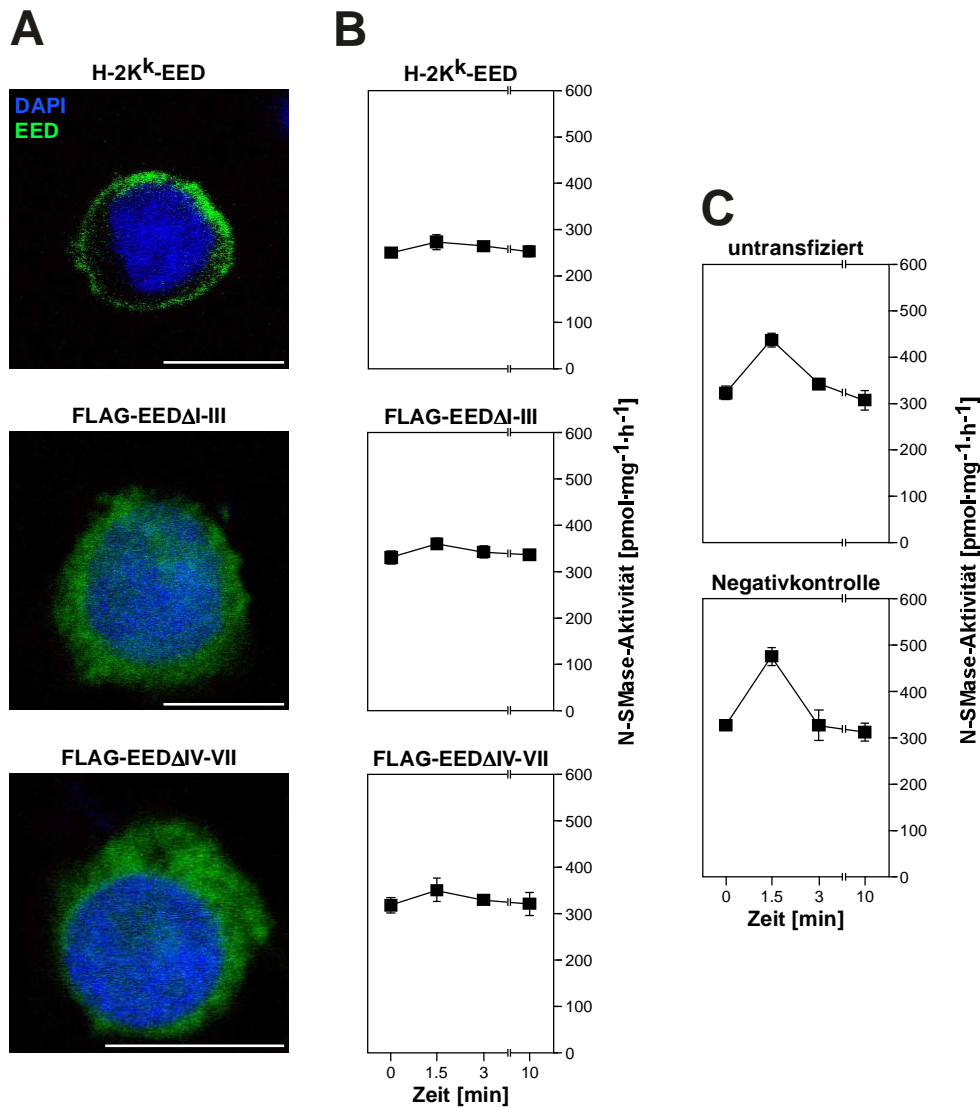


Abb. 13: Die TNF-abhängige Aktivierung der nSMase2 erfolgt nur bei Rekrutierung von vollständigem EED-Protein (inklusive aller Domänen) im Zusammenhang mit dem TNF-R1·FAN·RACK1-Komplex. (A) Jurkat-Zellen wurden mit einem konstitutiv Plasmamembran-gebundenen EED-Konstrukt (pFLAG-CMV2.H-2K^K-EED₂₋₄₄₁, oben), mit der C-terminalen EED-Region (FLAG-EEDΔI-III (pFLAG-CMV2.EED₂₃₄₋₄₄₁), Mitte) oder mit der nSMase2-interagierenden EED-Region (FLAG-EEDΔIV-VII (pFLAG-CMV2.EED₂₋₂₃₃), unten) transfiziert. Die Expression der jeweiligen Konstrukte wurde durch Immunfluoreszenz mit direkt fluoreszenzgekoppelten H-2K^K-spezifischen Antikörpern (EED-H-2K^K, grün) bzw. mit Maus-anti-FLAG-Antikörpern von Sigma (FLAG-EEDΔI-III, FLAG-EEDΔIV-VII) und fluoreszenzgekoppelten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) nachgewiesen. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 µm). (B) Messung der N-SMase-Aktivität bei den transfizierten Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. (C) Kontrolle: Messung der N-SMase-Aktivität nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen bei untransfizierten und Leervektor-transfizierten (pFLAG-CMV2; Negativkontrolle) Zellen. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Aktivitätsmessungen dargestellt. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. Die Aktivitätsmessungen wurden von Dr. Supandi Winoto-Morbach, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

3.2 Integrin-beta-Untereinheiten sind Komponenten der TNF-induzierten nSMase2-Signaltransduktion

3.2.1 ITGB1, ITGB2, ITGB5 und ITGB7 sind membranständige Komponenten von Jurkat-Zellen

Die Ergebnisse früherer Studien legen eine Beteiligung von Integrinen an der nSMase2-Signaltransduktion nahe (s. Kapitel 1.5). Besonders wahrscheinliche Kandidaten für stabilisierende Funktionen bei der TNF-abhängigen, membranassoziierten nSMase2-Aktivierung sind die Integrin- β -Untereinheiten ITGB1, ITGB2 und ITGB5, die an RACK1 binden, sowie ITGB7, welches an die neu identifizierte Signalwegskomponente EED bindet (Liliental et al., 1998; Rietzler et al., 1998). Diese These sollte im Folgenden experimentell überprüft werden.

ITGB1 und ITGB2 waren in Jurkat-T-Lymphozyten bereits beschrieben worden (Chan et al., 2000). Es sollte entsprechend analysiert werden, ob ITGB5 und ITGB7 in diesen Zellen ebenfalls exprimiert werden und ob die verwendeten Kaninchen-anti-ITGB5- und -ITGB7-Antikörper von Abnova spezifisch sind. Dazu wurden die beiden Integrine zunächst durch Calcium-Phosphat-Transfektion in 293T-Zellen überexprimiert und Lysate gemeinsam mit Lysaten aus untransfizierten 293T- und Jurkat-Zellen im Western Blot auf Banden von identischem Molekulargewicht hin untersucht. Neben den zur Kontrolle überexprimierten Konstrukten konnten auch endogenes ITGB5 und ITGB7 in beiden Zelltypen nachgewiesen werden (s. Abb. 14A, B).

Als nächstes wurde durch Immunfluoreszenz die intrazelluläre Lokalisation der vier Integrin-Untereinheiten sowie mögliche TNF-bedingte Verteilungsänderungen in Jurkat-Zellen untersucht. ITGB5 und ITGB7 wurden mit den oben genannten Antikörpern detektiert, ITGB1 und ITGB2 mit Maus-anti-ITGB1- bzw. Kaninchen-anti-ITGB2-Antikörpern (jeweils von BD). Als Sekundärantikörper wurden Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus- bzw. Esel-anti-Kaninchen-Antikörper (Molecular Probes) eingesetzt. Alle Proteine wurden erwartungsgemäß an der Plasmamembran nachgewiesen. ITGB1, ITGB5 und ITGB7 waren zudem als Cluster in einigen Bereichen der Zellmembran und vesikulär im membrannahen Zytoplasma angehäuft (s. Abb. 14C, G, I). Diese Verteilungsmuster änderten sich nicht durch dreiminütige TNF-Stimulation (s. Abb. 14D, H, J). ITGB2 war in wesentlich größeren Mengen als die übrigen Integrine gleichmäßig an der Zellperipherie verteilt (s. Abb. 14E). TNF-Stimulation bewirkte hier jedoch eine Clusterbildung im Zellbindungsbereich an den

Ergebnisse

Adhäsionsobjektträger (s. Abb. 14F). Dieses Ergebnis entspricht früheren Studien, wonach ITGB2-Aktivierung durch TNF unter anderem zu verstärkter Zelladhäsion führt (Bouaouina et al., 2004).

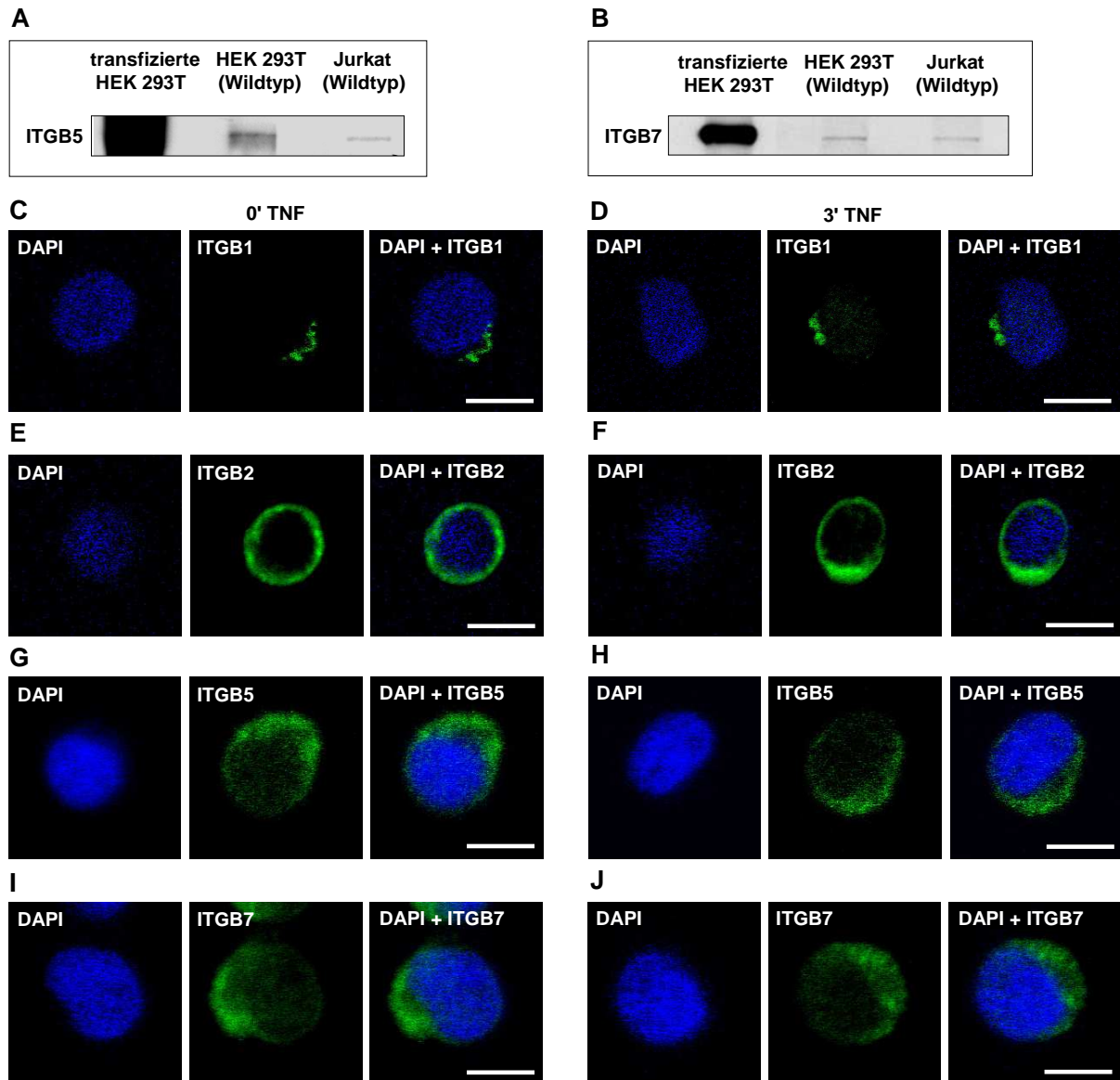


Abb. 14: Verteilung von verschiedenen Integrin-beta-Untereinheiten in Jurkat-Zellen mit und ohne TNF-Stimulation. A, B: Nachweis von endogenem ITGB5 und ITGB7 in Jurkat-Zellen durch Western-Blot. Als Positivkontrollen dienten überexprimiertes (cDNA-Klone: pCMV6-XL5.ITGB5 bzw. pCMV6-XL5.ITGB7 von Origene) und endogenes ITGB5 bzw. ITGB7 aus HEK 293T-Zell-Lysaten. C-J: Jurkat-Zellen wurden für 0 und 3 min. mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Integrine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Maus-anti-ITGB1- (BD), Kaninchen-anti-ITGB2- (BD), Maus-anti-ITGB5- (Abnova) oder Maus-anti-ITGB7-Antikörpern (Abnova) mit fluoreszenzgekoppeltem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus- bzw. Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 µm). ITGB1 ist in unbehandelten (C) und für 3 min. mit TNF stimulierten Zellen (D) an einer Membranseite angehäuft. ITGB2 ist in unbehandelten Zellen gleichmäßig membranständig verteilt (E) und nach 3 min. TNF-Stimulation an einer Membranseite angehäuft (F). ITGB5 und ITGB7 sind in unbehandelten (G: ITGB5, I: ITGB7) und für 3 min. mit TNF stimulierten Zellen (H: ITGB5, J: ITGB7) an einer Membranseite angehäuft.

3.2.2 Integrine sind an der TNF-induzierten Aktivierung der nSMase2 beteiligt

Um zu überprüfen, ob und in welchem Maße Integrine für eine Stabilisierung des TNF-R1·FAN·RACK1·EED·nSMase2-Komplexes benötigt werden, sollte ihre Expression mittels siRNAs inhibiert werden. Als Kontrollen wurden siRNAs für ITGB1, ITGB2, ITGB5 und ITGB7 in Jurkat-Zellen transfiziert und die Herunterregulation der jeweiligen Proteine in den Zelllysaten per Western Blot überprüft. ITGB1 konnte durch die ITGB1-siRNA_2 (Ambion Silencer Pre-designed siRNA 288622) erfolgreich herunterreguliert werden (s. Abb. 15A, oben). ITGB2 lag in sehr großen endogenen Mengen vor. Daher wurde die Proteinmenge durch einzelne siRNAs nicht vollständig entfernt (s. Abb. 15B, oben). Für die folgenden Experimente wurden deshalb die beiden am besten inhibierenden siRNAs, ITGB2-siRNA_2 und _3 (Ambion Silencer Pre-designed siRNA 105999 und 8238) zusammen transfiziert. Für ITGB5 und ITGB7 waren funktionierende Mischungen aus jeweils drei Einzel-siRNAs von Santa Cruz erhältlich (s. Abb. 15C, D, oben).

Als nächstes wurden nSMase2-Aktivitätsmessungen mit Integrin-siRNA-, Negativkontroll-siRNA- und untransfizierten Jurkatzellen durchgeführt. Durch Immunfluoreszenzanalysen wurde die erfolgreiche Herunterregulation der jeweiligen Integrine durch die Integrin-siRNAs, aber nicht durch die Negativ-Kontroll-siRNA, sichergestellt (s. mikroskopische Aufnahmen in Abb. 15). Die nSMase-Aktivierungsexperimente ergaben, dass insbesondere ITGB1 und ITGB2 essentiell für die TNF-vermittelte nSMase2-Aktivierung sind, da ohne eine dieser Untereinheiten ebenso wie ohne EED praktisch keine Aktivitätssteigerung zu verzeichnen war (s. Abb. 16A, B, 12B). Durch Herunterregulation von ITGB5 und (in etwas geringerem Ausmaß) von ITGB7 wurde die Aktivitätssteigerung ebenfalls deutlich verringert, wenn auch nicht vollständig aufgehoben (s. Abb. 16C, D). Es ist bekannt, dass unterschiedliche Integrine zur Beteiligung an membranassoziierten Signaltransduktionen miteinander kooperieren und auch Komplexe bilden (Filla et al., 2006; Waldeck-Weiermair et al., 2008). Auch an der nSMase2-Signaltransduktion scheinen auf diese Weise mehrere verschiedene Integrine beteiligt zu sein, die durch ihre β -Untereinheiten an die Komponenten des Komplexes binden. Vor allem ITGB1 und ITGB2 nehmen hierbei offenbar eine Schlüsselfunktion ein.

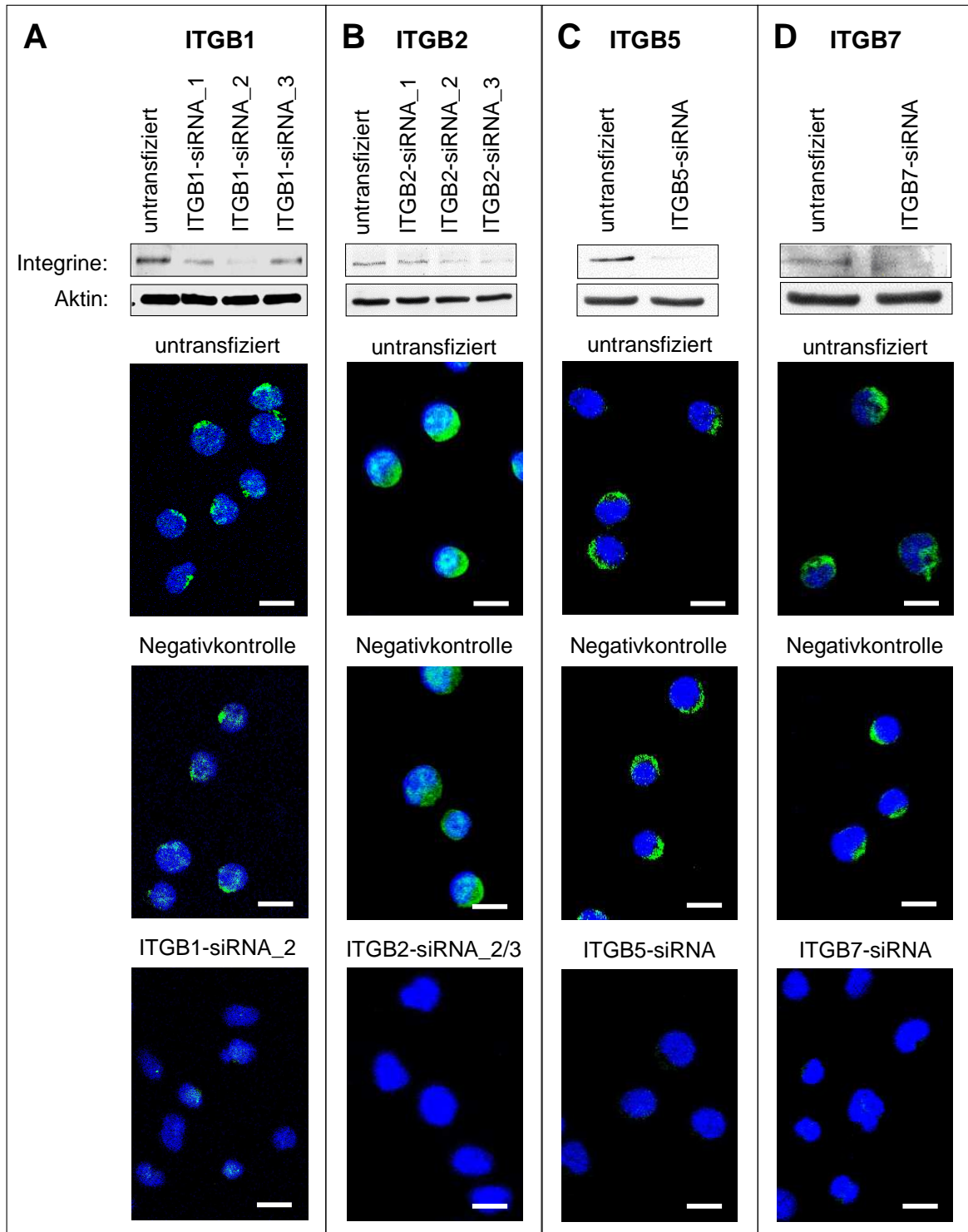


Abb. 15: RNA-Interferenz-Kontrollexperimente für verschiedene Integrin-beta-Untereinheiten in Jurkat-Zellen. Oben: Die Effizienzen verschiedener siRNAs zur Reduzierung der endogenen Proteinsynthese von ITGB1 (A), ITGB2 (B), ITGB5 (C) und ITGB7 (D) wurden 72 Stunden nach Transfektion in Jurkat-Zellen durch Western-Blot überprüft. Aktin-Detektion diente jeweils als Ladekontrolle. Mikroskopische Zellaufnahmen: Mittels Immunfluoreszenz wurden ein möglicher Einfluss von Negativkontroll-siRNA auf die Integrinexpressionen ausgeschlossen und die Effizienzen von ITGB1-siRNA_2 (A), ITGB2-siRNA_2 und 3 (zusammen transfiziert, B), ITGB5-siRNA (C) und ITGB7-siRNA (D) verifiziert. Integrine sind durch grüne Fluoreszenz erkennbar, Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 μ m). Verwendete Antikörper: s. Abb. 14.

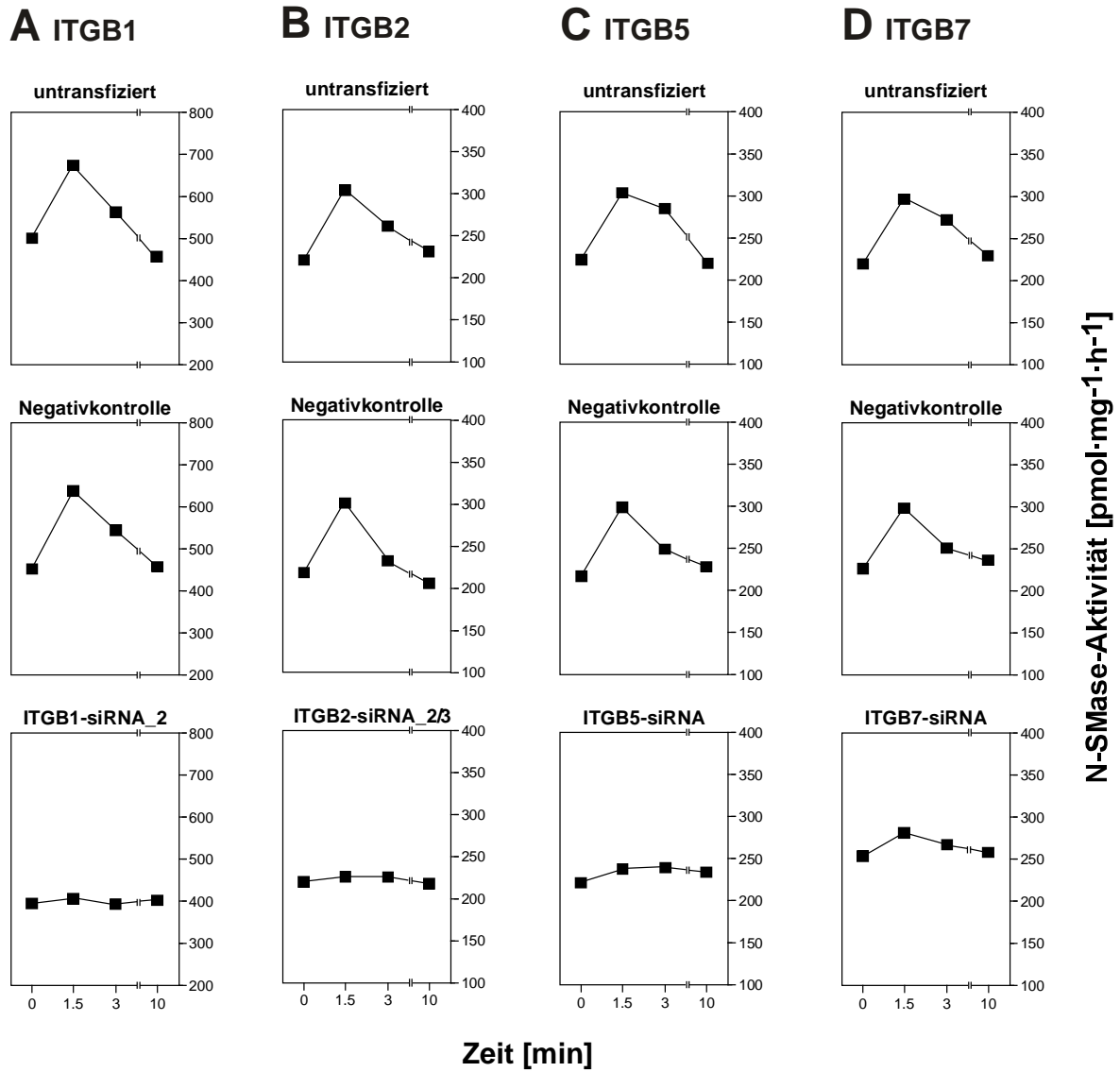


Abb. 16: Für die Aktivierung der nSMase2 durch TNF werden die Integrine ITGB1, ITGB2, ITGB5 und ITGB7 benötigt. Jurkat-Zellen blieben untransfiziert (oben) oder wurden durch Amaxa-Nukleofektion mit Negativkontroll-siRNA (Mitte) bzw. zuvor auf ihre Wirksamkeit kontrollierten (s. Abb. 15) siRNAs (unten) gegen ITGB1 (A), ITGB2 (B), ITGB5 (C) oder ITGB7 (D) transfiziert. 72 Stunden später wurden die N-SMase-Aktivitäten jeweils nach 0, 1,5, 3 und 10 min. TNF-Stimulation gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte aus zwei (A) bzw. drei (B-D) Aktivitätsmessungen dargestellt. Standardabweichungen (B-D) sind durch Fehlerbalken dargestellt. Unterschiede in den Basalaktivitäten zwischen den einzelnen Experimenten sind auf unterschiedliche Substrate ([N-methyl-¹⁴C]-Sphingomyelin von GE Healthcare (A) bzw. von Hartmann (B-D)) zurückzuführen. Die Aktivitätsmessungen wurden von Dr. Supandi Winoto-Morbach, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

3.3 Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern der nSMase2

3.3.1 Yeast Two-Hybrid Screen mit der vollständigen nSMase2 als Köderprotein

Das Polycomb-Group-Protein EED stellte sich als erster identifizierter Interaktionspartner der nSMase2 heraus, der zudem eine entscheidende Position im nSMase2-Signaltransduktionsweg einnimmt. Es sollte nun nach weiteren Proteinen gesucht werden, die direkt an die nSMase2 binden können. Zu diesem Zweck wurde ein Yeast Two-Hybrid Screen mit der vollständigen nSMase2 im Vektor plex202 (plex.nSMase2₁₋₆₅₅) als Köderprotein durchgeführt. Hierfür wurde eine HeLa-cDNA-Bibliothek von Takara verwendet. Die Beutesequenzen waren jeweils in den Y2H-Beute-Vektor pB42AD kloniert.

Zunächst wurde das Köderkonstrukt stabil in Hefezellen des Stammes JK103 transformiert. Erfolgreich transformierte, auf U⁻ H⁻ Glc⁺-Selektionsplatten wachsende Hefen wurden in einem weiteren Schritt in zehn parallelen Ansätzen mit der HeLa-cDNA-Bibliothek kotransformiert. Auf U⁻ H⁻ W⁻ Glc⁺-Selektionsplatten wurden je ca. 5000 Kolonien pro Transformation erhalten, die der Selektion entsprechend sowohl das Köder- als auch ein Beutekonstrukt enthalten mussten. Die Kolonien wurden anschließend in TE/Glycerol resuspendiert und in unterschiedlichen Mengen auf U⁻ H⁻ W⁻ L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten verteilt. Gemäß dem Y2H-System sollten nur diejenigen Hefen blaue Kolonien ausbilden, in denen Köder- und Beuteprotein miteinander interagierten. Nach Ausplattierung der gesamten Hefemenge war das Wachstum von 96 blauen Kolonien zu verzeichnen (s. Tabelle 9). Um unspezifisches Wachstum auszuschließen, wurden alle Kolonien erneut auf U⁻ H⁻ W⁻ L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺- und zusätzlich als Negativkontrollen auf U⁻ H⁻ W⁻ Glc⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten ausgestrichen. Letztgenanntes Medium beinhaltete keine Galactose, weshalb die Hefen darauf keine Blaufärbung zeigen sollten. 48 Kolonien wuchsen blau auf U⁻ H⁻ W⁻ L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺- und weiß auf U⁻ H⁻ W⁻ Glc⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten und beinhalteten somit mutmaßliche mit der nSMase2 interagierende Kandidatproteine (s. Tabelle 9). Nach Isolation aus den Hefezellen wurden die Plasmide in *E. coli* KC8-Bakterien transformiert und die Beuteplasmide auf M9-Medium selektiert. Die pB42AD-Beuteplasmide wurden nach Isolation mittels Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von cDNA aus der HeLa-cDNA-Bibliothek analysiert. 39 Vektoren beinhalteten ein cDNA-Insert. Durch die anschließenden Sequenzierungen stellte sich heraus, dass 18 Beutesequenzen kodierende Regionen im korrekten Leserahmen beinhalteten (s. Tabelle 9).

3.3.1.1 Die erhaltenen Beuteproteine des Yeast Two-Hybrid Screens mit der vollständigen nSMase2

Die 18 Beutesequenzen, die durch den Y2H-Screen mit der vollständigen nSMase2 als Köderprotein erhalten wurden, repräsentierten nur drei unterschiedliche Proteine. 11 Sequenzen kodierten für HIST3H2A (histone cluster 3, H2A), 6 kodierten für PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und eine für USP14 (ubiquitin specific peptidase 14) (s. Tabelle 10A). USP14 ist an der Degradierung zahlreicher Proteine beteiligt (Koulich et al., 2008) und ein dementsprechend häufiger Protein-Interaktionspartner. Histone und PCNA sind normalerweise nukleär lokalisiert (Nielsen et al., 2001; Travali et al., 1989). Sofern es nicht (ähnlich wie bei EED) zu einer TNF-bedingten Anreicherung im Zytosol kommt, sind diese Proteine eher unwahrscheinliche Kandidaten für eine *in vivo*-Bindung an die zytoplasmatische und membranassoziierte nSMase2 in humanen Zellen.

Die Interaktion der Kandidaten mit der vollständigen nSMase2 im Hefesystem sollte durch Retransformationen der entsprechenden Beutepasmide und des plex.nSMase2₁₋₆₅₅-Köderplasmids in JK103-Hefen verifiziert werden. Erfolgreiche Kotransformationen wurden abermals durch Selektion auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺-Platten überprüft. Nach Selektionsausstrich der Kolonien auf U⁻H⁻W⁻L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Platten kam es jedoch in keinem der 18 Fälle zu einem Wachstum blauer Hefen (s. Tabelle 9, 10B). Die Blaufärbungen der kotransformierten Hefen aus dem ursprünglichen Y2H-Screen konnten also nicht reproduziert werden und stellten vermutlich einen unspezifischen Effekt dar. Daher wurden im Y2H-Screen mit der vollständigen Sequenz der nSMase2 als Köderprotein keine echten Interaktionspartner identifiziert.

Ergebnisse

Tabelle 9: Y2H-Screen mit der vollständigen nSMase2 als Köderprotein

Prozedur	Anzahl der erhaltenen Kandidaten
Gewachsene Hefekolonien auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ -Selektionsplatten nach 10 Transformationen von plex.nSMase2 ₁₋₆₅₅ (Köderplasmid) in JK103-Hefen, Selektion auf U ⁻ H ⁻ Glc ⁺ -Selektionsplatten und darauf folgenden Kotransformationen mit der pB42AD-HeLa-cDNA-Bibliothek (Beute-Plasmide)	ca. 50000
Gewachsene und gepickte blaue Hefekolonien nach Resuspendierung aller U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ -selektierter Kolonien in 10 mL TE/Glycerol und Verteilung der Gesamtmenge auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten	96
Wachstum blauer Hefen nach Selektionsausstrich auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten	48
Wachstum weißer Hefen nach Selektionsausstrich auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ X-Gal ⁺ -Kontrollplatten	48
Hefepiasmidisolationen und Transformationen der isolierten Plasmide in <i>E. coli</i> KC8-Bakterien mit anschließender Anzucht auf M9-Platten zur Selektion auf Beuteplasmide	48
Beuteplasmidisolationen, gefolgt von Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese der Plasmide zur Detektion von HeLa-cDNA-Inserts	48
Sequenzierungen von HeLa-cDNA-beihaltenden Beuteplasmiden	39
Beutesequenzen, die kodierende Regionen für Proteine im korrekten Leserahmen repräsentierten	18 (3 unterschiedliche Proteine)
Wachstum blauer Hefen auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten nach Retransformation der kontrollierten pB42AD-Beuteplasmide und des plex.nSMase2 ₁₋₆₅₅ -Köderplasmids	0

Tabelle 10: Die Beuteproteine des Y2H-Screens mit der vollständigen nSMase2

Name des Beuteproteins	A: Anzahl der auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Medium gewachsenen blauen Kolonien mit demselben Beuteprotein	B: Blaufärbung von Hefen auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsmedium nach Retransformation mit plex.nSMase2 ₁₋₆₅₅
HIST3H2A (histone cluster 3, H2A)	11	-
PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	6	-
USP14 (ubiquitin specific peptidase 14)	1	-

3.3.2 Yeast Two-Hybrid Screens mit Einzeldomänen der nSMase2 als Köderproteine

Es ist bekannt, dass mit hydrophoben und membranständigen Köderproteinen im Yeast Two-Hybrid Screen weniger Beuteproteine identifiziert werden können als mit freien zytosolischen Proteinen. Die nSMase2 gehört zu den hydrophoben Proteinen, wodurch der Mangel an identifizierten Interaktionspartnern im Y2H-Screen mit der vollständigen nSMase2 als Köder erklärt werden kann. Um dieses Problem zu umgehen, sollte der Y2H-Screen mit einzelnen Domänen der nSMase2 wiederholt werden.

3.3.2.1 Yeast Two-Hybrid Screen mit der regulatorischen Domäne der nSMase2 als Köderprotein

In diesem Versuchsansatz diente die regulatorische Domäne der nSMase2 (nSMase2RD) als Köderprotein im Y2H-Screen. Die verwendete Sequenz kodierte für die kollagenähnliche Domäne und die beiden assoziierten membrangebundenen Segmente der nSMase2 (Philipp und Puchert et al., 2010).

Es wurden wieder in je zwei Schritten zehn Kotransformationen mit der nSMase2RD im plex202-Vektor (plex.nSMase2₁₋₃₁₇) und den Sequenzen der HeLa-cDNA-Bibliothek im pB42AD-Vektor in JK103-Hefen vorgenommen. Die Transformationsausbeute entsprach dabei dem Resultat des Screens mit der vollständigen nSMase2. Durch Ausplattierung sämtlicher transformierter Hefen auf U⁻H⁻W⁻L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten kam es nur zum Wachstum von 62 blauen Kolonien. Lediglich 25 davon behielten ihre Blaufärbung nach erneutem Ausstrich bei und zeigten Wachstum weißer Hefen auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺ X-Gal⁺-Kontrollplatten (s. Tabelle 11). Nach den folgenden Isolationsschritten der Beuteplasmide zeigte sich, dass 16 Vektoren ein cDNA-Insert enthielten. Deren Sequenzierungen ergaben, dass nur 3 Beutesequenzen für Proteine im korrekten Leserahmen kodierte (s. Tabelle 11). Ein Kandidat kodierte auch hier für PCNA, die anderen beiden für PGK1 (phosphoglycerate kinase 1) und SDF2L1 (stromal cell-derived factor 2-like 1) (s. Tabelle 12A). Wie beim Y2H-Screen mit der vollständigen nSMase2 führten auch in diesem Fall die Retransformationen der erhaltenen Beuteproteine mit dem Köderprotein nicht zum Wachstum blauer Hefen auf U⁻H⁻W⁻L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten (s. Tabellen 11, 12B). Die hydrophobe regulatorische Domäne der nSMase2 stellte sich somit als eine Region heraus, die im Y2H-System nicht an Proteinbindungen der nSMase2 beteiligt ist.

Ergebnisse

Tabelle 11: Y2H-Screen mit der regulatorischen Domäne der nSMase2 als Köderprotein

Prozedur	Anzahl der erhaltenen Kandidaten
Gewachsene Hefekolonien auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ -Selektionsplatten nach 10 Transformationen von plex.nSMase2 ₁₋₃₁₇ (Köderplasmid) in JK103-Hefen, Selektion auf U ⁻ H ⁻ Glc ⁺ -Selektionsplatten und darauf folgenden Kotransformationen mit der pB42AD-HeLa-cDNA-Bibliothek (Beute-Plasmide)	ca. 50000
Gewachsene und gepickte blaue Hefekolonien nach Resuspendierung aller U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ -selektierter Kolonien in 10 mL TE/Glycerol und Verteilung der Gesamtmenge auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten	62
Wachstum blauer Hefen nach Selektionsausstrich auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten	25
Wachstum weißer Hefen nach Selektionsausstrich auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ X-Gal ⁺ -Kontrollplatten	25
Hefepiasmidisolationen und Transformationen der isolierten Plasmide in <i>E. coli</i> KC8-Bakterien mit anschließender Anzucht auf M9-Platten zur Selektion auf Beuteplasmide	25
Beuteplasmidisolationen, gefolgt von Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese der Plasmide zur Detektion von HeLa-cDNA-Inserts	25
Sequenzierungen von HeLa-cDNA-beihaltenden Beuteplasmiden	16
Beutesequenzen, die kodierende Regionen für Proteine im korrekten Leserahmen repräsentierten	3 (3 unterschiedliche Proteine)
Wachstum blauer Hefen auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten nach Retransformation der kontrollierten pB42AD-Beuteplasmide und des plex.nSMase2 ₁₋₃₁₇ -Köderplasmids	0

Tabelle 12: Die Beuteproteine des Y2H-Screens mit der regulatorischen Domäne der nSMase2

Name des Beuteproteins	A: Anzahl der auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Medium gewachsenen blauen Kolonien mit demselben Beuteprotein	B: Blaufärbung von Hefen auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsmedium nach Retransformation mit plex.nSMase2 ₁₋₃₁₇
PCNA (proliferating cell nuclear antigen)	1	-
PGK1(phosphoglycerate kinase 1)	1	-
SDF2L1 (stromal cell-derived factor 2-like 1)	1	-

3.3.2.2 Yeast Two-Hybrid Screen mit der katalytischen Domäne der nSMase2 als Köderprotein

Die katalytische Domäne der nSMase2 (nSMase2CD) stellt den zytosolischen Teil des Enzyms dar (Philipp und Puchert et al., 2011). Sie ist dementsprechend nicht hydrophob und vermutlich für die Interaktion mit weiteren zytosolischen Proteinen hauptverantwortlich.

Aus zehn Kotransformationen mit der nSMase2CD im plex202-Vektor (plex.nSMase2₃₁₈₋₆₅₅) und den cDNAs der HeLa-Bibliothek im pB42AD-Vektor konnten insgesamt ca. 60.000 erfolgreich transformierte JK103-Kolonien auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺-Selektionsplatten isoliert werden, die in 10 mL TE/Glycerol resuspendiert wurden. Nach Ausplattierung von 2 µL auf U⁻H⁻W⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten wurden bereits 78 blaue Kolonien erhalten (s. Tabelle 13). Außer bei 3 Kolonien kam es bei allen übrigen zum Wachstum blauer Hefen nach erneutem Ausstrich auf U⁻H⁻W⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Medium und zum Wachstum weißer Hefen auf U⁻H⁻W⁻ Glc⁺ X-Gal⁺-Kontrollplatten (s. Tabelle 13). Analog zu den vorherigen Screens wurden die verbliebenen 75 Beuteplasmide nach Hefepiasmidisolierungen, Retransformationen in *E. coli* KC8-Bakterien und deren Selektion auf M9-Platten isoliert. 61 dieser Kandidaten beinhalteten eine cDNA aus der HeLa-Bibliothek und wurden daher sequenziert. 47 cDNA-Inserts kodierten für Proteinsequenzen im korrekten Leserahmen. Insgesamt konnten 32 unterschiedliche potentielle Beuteproteine identifiziert werden (s. Tabellen 13, 14).

Um die Y2H-Interaktionen zu bestätigen, wurden die 47 proteinkodierenden Beuteplasmide jeweils zusammen mit dem plex.nSMase2₃₁₈₋₆₅₅-Köderplasmid in Hefen retransformiert. Außer bei dem Kandidaten CKB (creatine kinase, brain) kam es in allen Fällen zum Wachstum blauer Hefen auf U⁻H⁻W⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Selektionsmedium, wodurch die Interaktionen im Hefesystem verifiziert werden konnten (s. Tabellen 13, 14B; Beispiele in Abb. 17.1A-F). Es sollte nun überprüft werden, ob es sich hierbei um spezifische Interaktionen handelte. Dafür wurden die Kandidaten abermals in Hefen transformiert, diesmal zusammen mit in den plex-Vektor klonierter syk-cDNA. SYK (spleen tyrosine kinase) ist nicht als Bestandteil der nSMase2-Signaltransduktion bekannt. Eine mögliche Interaktion eines Beuteproteins mit dieser Kinase könnte also auf unspezifische Bindeeigenschaften des jeweiligen Kandidaten hinweisen, wodurch weitere Verifizierungsschritte vonnöten wären. Bei keiner der 46 Kotransformationen kam es jedoch zu auf SYK-Bindung hinweisendem Wachstum blauer Kolonien (s. Tabellen 13, 14C; Beispiele in Abb. 17.3A-F). Somit konnten die Interaktionen der nSMase2CD mit 31 verschiedenen Proteinen im Y2H-Screen verifiziert

Ergebnisse

werden. Die nSMase2CD stellte sich im Gegensatz zur nSMase2RD also als Domäne heraus, über die die nSMase2 mit anderen Proteinen wechselwirken kann.

Tabelle 13: Y2H-Screen mit der katalytischen Domäne der nSMase2 als Köderprotein

Prozedur	Anzahl der erhaltenen Kandidaten
Gewachsene Hefekolonien auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ -Selektionsplatten nach 10 Transformationen von plex.nSMase2 ₃₁₈₋₆₅₅ (Köderplasmid) in JK103-Hefen, Selektion auf U ⁻ H ⁻ Glc ⁺ -Selektionsplatten und darauf folgenden Kotransformationen mit der pB42AD-HeLa-cDNA-Bibliothek (Beute-Plasmide)	ca. 60000
Gewachsene und gepickte blaue Hefekolonien nach Resuspendierung aller U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ -selektierter Kolonien in 10 mL TE/Glycerol und Verteilung der Gesamtmenge auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten	78
Wachstum blauer Hefen nach Selektionsausstrich auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten	75
Wachstum weißer Hefen nach Selektionsausstrich auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ Glc ⁺ X-Gal ⁺ -Kontrollplatten	75
Hefepiasmidisolationen und Transformationen der isolierten Plasmide in <i>E. coli</i> KC8-Bakterien mit anschließender Anzucht auf M9-Platten zur Selektion auf Beuteplasmide	75
Beuteplasmidisolationen, gefolgt von Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese der Plasmide zur Detektion von HeLa-cDNA-Inserts	75
Sequenzierungen von HeLa-cDNA-beihaltenden Beuteplasmiden	61
Beutesequenzen, die kodierende Regionen für Proteine im korrekten Leserahmen repräsentierten	47 (32 unterschiedliche Proteine)
Wachstum blauer Hefen auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten nach Retransformation der kontrollierten pB42AD-Beuteplasmide und des plex.nSMase2 ₃₁₈₋₆₅₅ -Köderplasmids	46 (31 unterschiedliche Proteine)
Kein Wachstum blauer Hefen auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsplatten nach Kotransformationen der kontrollierten pB42AD-Beuteplasmide mit dem plex202-SYK-Plasmid (Negativkontrolle)	46 (31 unterschiedliche Proteine)

Ergebnisse

Tabelle 14: Die Beuteproteine des Y2H-Screens mit der katalytischen Domäne der nSMase2

Name des Beuteproteins	A: Anzahl der auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Medium gewachsenen blauen Hefekolonien mit demselben Beuteprotein	B: Blaufärbung auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsmedium nach Retransformation mit plex.nSMase2 ₃₁₈₋₆₅₅	C: Negativkontrolle: Blaufärbung auf U ⁻ H ⁻ W ⁻ L ⁻ Gal ⁺ X-Gal ⁺ -Selektionsmedium nach Retransformation mit plex 202-SYK
AFTPH (aftiphilin, transcript variant 3)	1	+++	-
ATP5B (H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide)	1	+	-
COPB1 (coatomer protein complex, subunit beta 1)	1	++	-
CKB (creatine kinase, brain)	1	-	-
CROP (cisplatin resistance-associated overexpressed protein)	1	+	-
DNAJB6 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6)	2	+++	-
EEF1A1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1)	1	+++	-
EIF3I (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I)	1	+++	-
ENO1 (enolase 1)	2	+++	-
GART (phosphoribosylaminoimidazole synthetase)	1	+++	-
HSP90AA1 (heat shock protein 90kDa alpha, class A member 1)	9	+++	-
HSPD1 (heat shock 60kDa protein 1)	2	++	-
KPNA2 (karyopherin alpha 2)	2	+++	-
LAMR1 (laminin receptor 1)	2	+++	-
p27BBP (p27 beta-4 integrin-binding protein)	1	++	-
PDIA6 (protein disulfide isomerase family A, member 6)	1	++	-
PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1)	1	+++	-
PKCζ (protein kinase C ζ)	2	+++	-
PPA2 (pyrophosphatase 2)	1	++	-
PRDX1 (peroxiredoxin 1)	1	++	-

Ergebnisse

PSMC3 (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3)	1	+++	-
RBBP7 (retinoblastoma binding protein 7)	1	++	-
RNF103 (ring finger protein 103)	1	+++	-
RPLP0 (ribosomal protein, large, P0)	1	+	-
RPLP1 (ribosomal protein, large, P1)	1	++	-
SERPINB1 (serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1)	1	+++	-
SLC25A12 (solute carrier family 25)	2	+++	-
SMARCA1 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1)	1	+++	-
TPT1 (tumor protein, translationally-controlled 1)	1	+++	-
TUBA1B (tubulin, alpha 1b)	1	+++	-
TUBB2C (tubulin, beta 2C)	1	+++	-
USP3 (ubiquitin specific peptidase 3)	1	+++	-

Stärke der Interaktion (B, C): sehr stark (+++), stark (++), schwach (+), nicht detektierbar (-)

3.3.2.2.1 Auswahl von interessanten Kandidaten aus dem Y2H-Screen mit der katalytischen Domäne der nSMase2 für Folgeuntersuchungen

Aus den vorhandenen Kandidaten wurden vorrangig die Proteine p27BBP (p27 beta-4 integrin-binding protein), LAMR1 (laminin receptor 1), PKC ζ (protein kinase C ζ) und COPB1 (coatamer protein complex, subunit beta 1) für Folgeuntersuchungen ausgewählt, da für diese Moleküle bereits spezifische Hinweise für eine Beteiligung an nSMase2-assoziierten Prozessen vorlagen (s. u.: Biffo et al., 1997; Nelson et al, 2008; Ramström et al., 2004; Benichou et al., 1994 etc.)

3.3.2.2.2 p27BBP, LAMR1, PKC ζ , COPB1, RBBP7 und AFTPH binden im Y2H-System an die katalytische Domäne der nSMase2 und an die vollständige nSMase2

Vor weiterführenden Untersuchungen in humanen Zellen sollte für die oben ausgewählten Kandidaten überprüft werden, ob es auch bei Expression der jeweiligen Kandidaten im Köder-Vektor plex202 und der katalytischen Domäne der nSMase2 im Beute-Vektor pB42AD zur Interaktion kommt. Die cDNA-Sequenzen von p27BBP, LAMR1, PKC ζ und COPB1 sowie zusätzlich von RBBP7 (retinoblastoma binding protein 7) und AFTPH (aftiphilin, transcript variant 3) wurden mittels Restriktionsverdau aus pB42AD ausgeschnitten und in plex202 umklontiert. Jedes dieser neuen Konstrukte wurde zusammen mit der in pB42AD klonierten katalytischen Domäne der nSMase2 in JK103-Hefen transformiert. Nach Ausstrich von erfolgreich transformierten Kolonien auf U⁻H⁻W⁻L⁻ Gal⁺ X-Gal⁺-Selektionsplatten kam es auch in dieser Plasmidkombination in allen Fällen zum Wachstum blauer Hefen (s. Abb. 17.4A-F). Es stellte sich also heraus, dass diese Interaktionspartner sowohl als Beute- als auch als Köderproteine im Y2H-System mit der katalytischen nSMase2-Domäne interagierten.

Keines der hier untersuchten Proteine befand sich im Y2H-Screen mit der vollständigen nSMase2 unter den gefundenen Kandidaten (s. Tabelle 10). Es sollte daher überprüft werden, ob die 6 mutmaßlichen Interaktionspartner auch mit der kompletten nSMase2 interagieren konnten. Auch in diesem Ansatz wurden jeweils Doppeltransformationen mit den Kandidat-Sequenzen in pB42AD und der vollständigen nSMase2-Sequenz in plex202, sowie umgekehrt, durchgeführt. Mit der vollständigen nSMase2-Sequenz in pB42AD und den Kandidaten in plex202 kam es bei PKC ζ und LAMR1 zu einem deutlichen (s. Abb. 17.5B, C) und bei

Ergebnisse

p27BBP zu einem geringeren, aber eindeutig detektierbaren Wachstum blauer Hefen (s. Abb. 17.5A). Die Y2H-Interaktionen der vollständigen nSMase2 mit COPB1, RBBP7 und AFTH waren offensichtlich sehr schwach, da es hier nur zu einem dezenten Wachstum von weißlich-blauen Hefen kam (s. Abb. 17.5D-F). Der Unterschied zu den SYK-Kandidat-Transformationen (Negativkontrolle), bei denen lediglich einzelne, rein weiße Kolonien entstanden (s. Abb. 17.3A-F), war jedoch auch hier klar erkennbar. In der umgekehrten Kombination mit der vollständigen nSMase2 in plex202 und den Kandidaten in pB42AD konnte allerdings in keinem Fall Wachstum blauer Hefen detektiert werden (s. Abb. 17.2A-F). Gleiche Ergebnisse waren in den dieser Doktorarbeit vorangegangenen Y2H-Versuchen mit EED erzielt worden. EED interagiert dort ebenfalls mit der vollständigen nSMase2, wenn deren cDNA in den pB42AD-Vektor kloniert war, aber nicht mit der nSMase2 in plex202 (Philipp und Puchert et al., 2010). Die nSMase2-Bindestelle ist durch Bildung des Köder-Fusionsproteins in dieser Klonierungsrichtung möglicherweise maskiert. Im Folgenden sollten nun die Interaktionen von p27BBP, LAMR1, PKC ζ und COPB1 mit der nSMase2 auch in humanen Zellen verifiziert werden. Weitere Analysen zur Interaktion von RBBP7 und AFTPH mit der nSMase2 in humanen Zellen wurden als separates Projekt im Rahmen der Masterarbeit von Anne Luzius in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

Ergebnisse

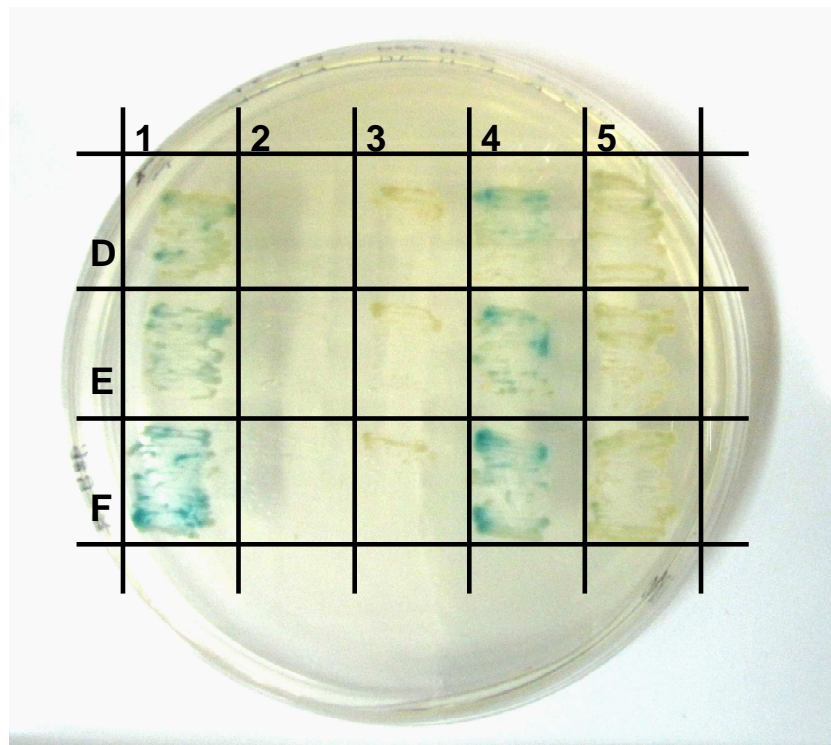
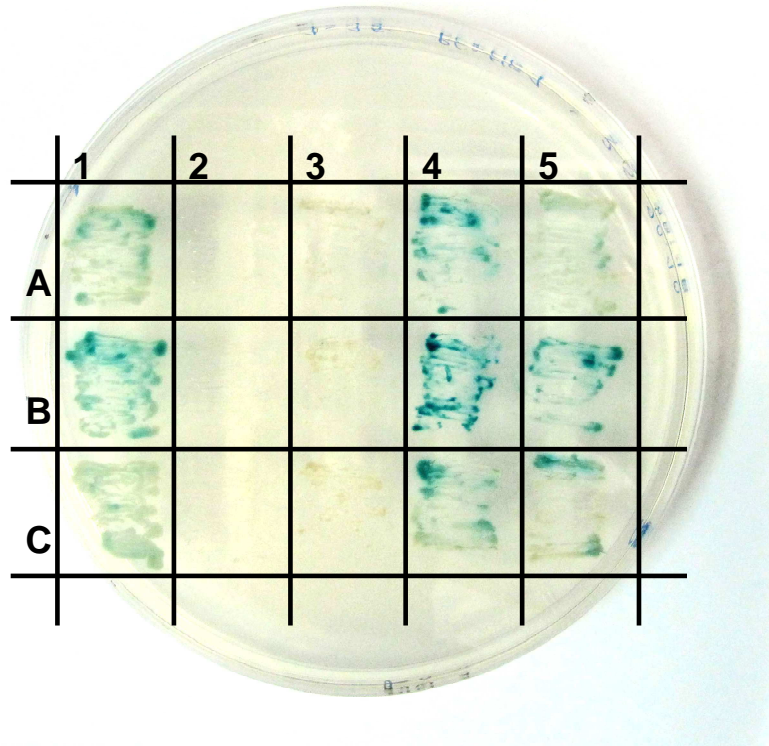


Abb. 17: Y2H-Interaktionen der Kandidaten p27BBP, PKC ζ , LAMR1, COPB1, RBBP7 und AFTPH mit der katalytischen Domäne der nSMase2 und der vollständigen nSMase2. Zeilen: Y2H-Interaktionen mit (A) p27BBP, (B) PKC ζ , (C) LAMR1, (D) COPB1, (E) RBBP7, (F) Aftiphilin. Spalten: Doppeltransformierte Hefen mit (1) Kandidat-Sequenz in pB42AD und nSMase2CD-Sequenz in plex202, (2) Kandidat-Sequenz in pB42AD und vollständige nSMase2-Sequenz in plex202, (3) Kandidat-Sequenz in pB42AD und SYK-Sequenz (Negativkontrolle) in plex202, (4) Kandidat-Sequenz in plex202 und nSMase2CD-Sequenz in pB42AD, (5) Kandidat-Sequenz in plex202 und vollständige nSMase2-Sequenz in pB42AD. Blaufärbung der Hefen zeigt vorhandene Interaktionen der durch die jeweiligen Konstrukte exprimierten Proteine an.

3.3.3 p27BBP und die nSMase2 kolokalisieren TNF-unabhängig in humanen Zellen

p27BBP stellte sich als vielversprechende mögliche Komponente der nSMase2-Signaltransduktion heraus, da es wie RACK1 und EED an eine Integrin- β -Untereinheit, in diesem Fall ITGB4, bindet (Biffo et al., 1997). p27BBP ist auch als EIF6 (eukaryotic translation initiation factor 6) bekannt und interagiert direkt mit RACK1 (Ceci et al., 2003). Es könnte daher ein weiteres Verbindungsmolekül zwischen RACK1 und der nSMase2 darstellen.

Das im Y2H-Screen mit der katalytischen Domäne der nSMase2 identifizierte p27BBP muss in identischen intrazellulären Bereichen lokalisiert sein wie die nSMase2, damit es zu einer *in vivo*-Interaktion zwischen diesen Molekülen kommen kann. Um eine mögliche Kolokalisation der Moleküle in humanen Zellen zu erkennen, wurden Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Es sollten zunächst die Verteilungsmuster der endogenen Proteine in Jurkat-T-Lymphozyten analysiert werden. p27BBP wurde durch einen monoklonalen Maus-anti-EIF6-Antikörper (BD) mit grün fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus-Zweitantikörper und die nSMase2 durch den Kaninchen-anti-nSMase2 Antikörper (Santa Cruz) mit rot fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 555 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper detektiert. p27BBP ist entsprechend seiner vielfältigen Funktionen in diversen Zelltypen sowohl nukleär als auch zytosolisch und an der Zellmembran beschrieben worden (Biffo et al., 1997; Sanvito et al., 1999). Dieses Verteilungsmuster konnte in Jurkat-Zellen bestätigt werden. Das Protein wurde in allen intrazellulären Kompartimenten einschließlich des Nukleus nachgewiesen, befand sich jedoch verstärkt außerhalb des Zellkerns. In diesem Bereich kam es auch zu einer ausgeprägten Kolokalisation mit der nSMase2 (s. Abb. 18A). Durch dreidimensionale Aufnahmen der Zellen mit der Stack-Funktion des Programms AIM Meta wurde zudem bestätigt, dass p27BBP und die nSMase2 in verschiedenen Ebenen an der Zellmembran und im Zytoplasma kolokalisierten (nicht gezeigt).

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich die p27BBP-Verteilung durch unterschiedliche TNF-Stimulationszeiten ändert. Deshalb wurden Jurkat-Zellen für 3, 10, 30 und 60 Minuten mit TNF inkubiert und erneute Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Hierbei konnte allerdings keine Veränderung im Verteilungsmuster von p27BBP beobachtet werden. Stattdessen bestand die p27BBP-nSMase2-Kolokalisation unverändert sowohl zum Zeitpunkt der nSMase2-Aktivierung (3 Minuten TNF) als auch nach den längeren Stimulationszeiten (s. Abb. 18B-E). Die Bindung von p27BBP und nSMase2 ist in Jurkat-Zellen also grundsätzlich und auch TNF-unabhängig möglich.

Ergebnisse

Die exakte extranukleäre Lokalisation von sehr stark exprimierten Proteinen wie p27BBP ist in Jurkat-Zellen aufgrund des eher gering ausgeprägten Zytoplasmabereichs schwerer zu ermitteln als in adhären, zytosolreicheren Zellen. Deshalb wurden die Immunfluoreszenzversuche zusätzlich in HeLa-Zellen durchgeführt. In dieser Zellart ergaben sich für die nSMase2 und p27BBP identische Verteilungsmuster wie in der T-Zelllinie. p27BBP war in allen Kompartimenten vorhanden, während die nSMase2 in intrazellulären vesikulären Strukturen und an der Zellmembran detektiert wurde. Die ausgeprägteste Kolokalisation fand an der Plasmamembran und im membrannahen Zytoplasmabereich statt, also in den Regionen, in denen es zur TNF-bedingten Aktivierung der nSMase2 kommt (s. Abb. 19A). Auch in HeLa-Zellen konnte durch 3-, 10-, 30- und 60-minütige TNF-Stimulation keine eindeutige Zu- oder Abnahme der Kolokalisation beobachtet werden (s. Abb. 19B-E), was auch hier für eine konstitutive Interaktion von p27BBP mit der nSMase2 spricht.

Ergebnisse

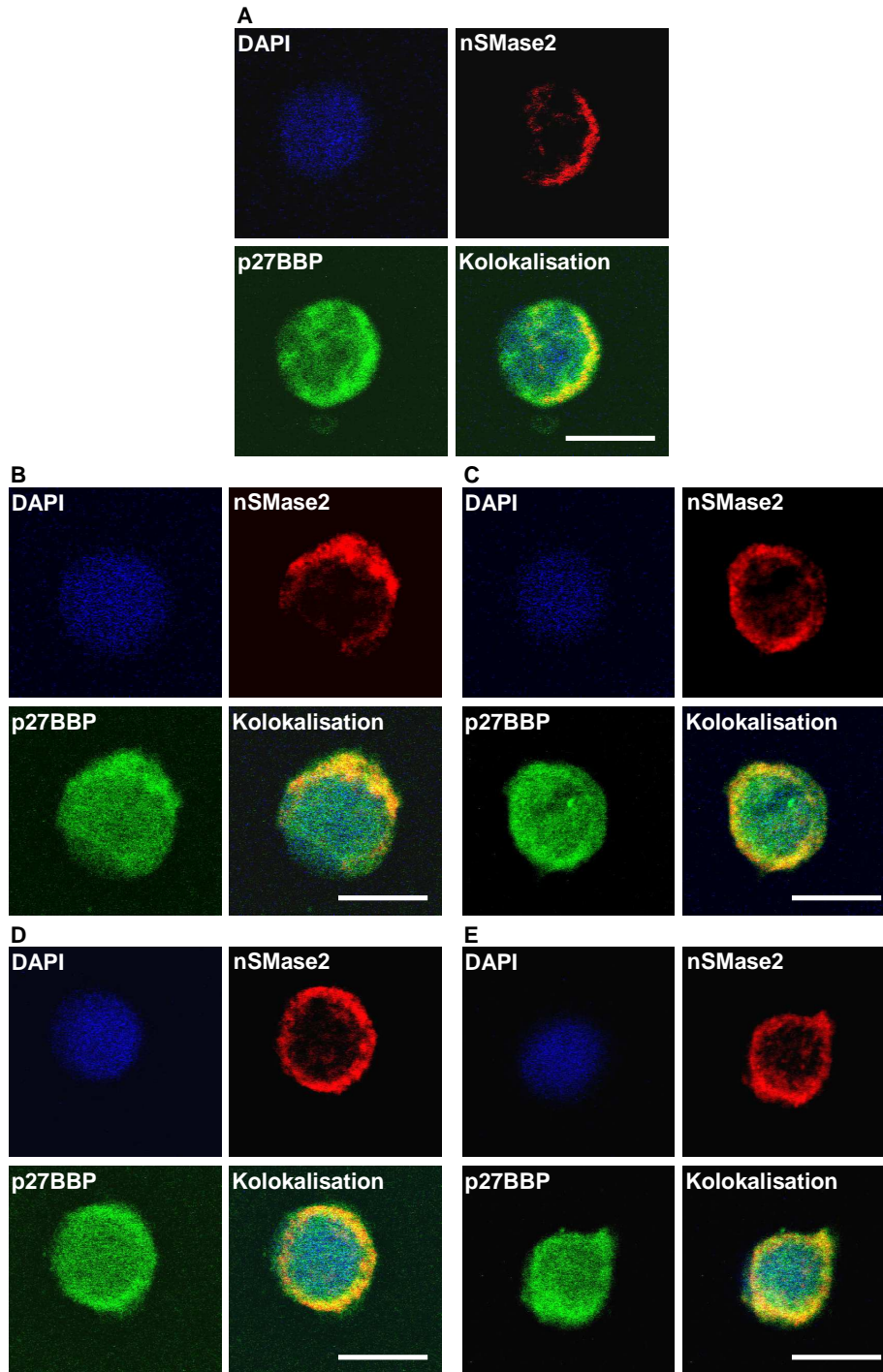


Abb. 18: endogene nSMase2- und p27BBP -Verteilung in Jurkat-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Kaninchen-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 555 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Maus-anti-EIF6(=p27BBP)-Antikörpern (BD) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und p27BBP ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 μ m).

Ergebnisse

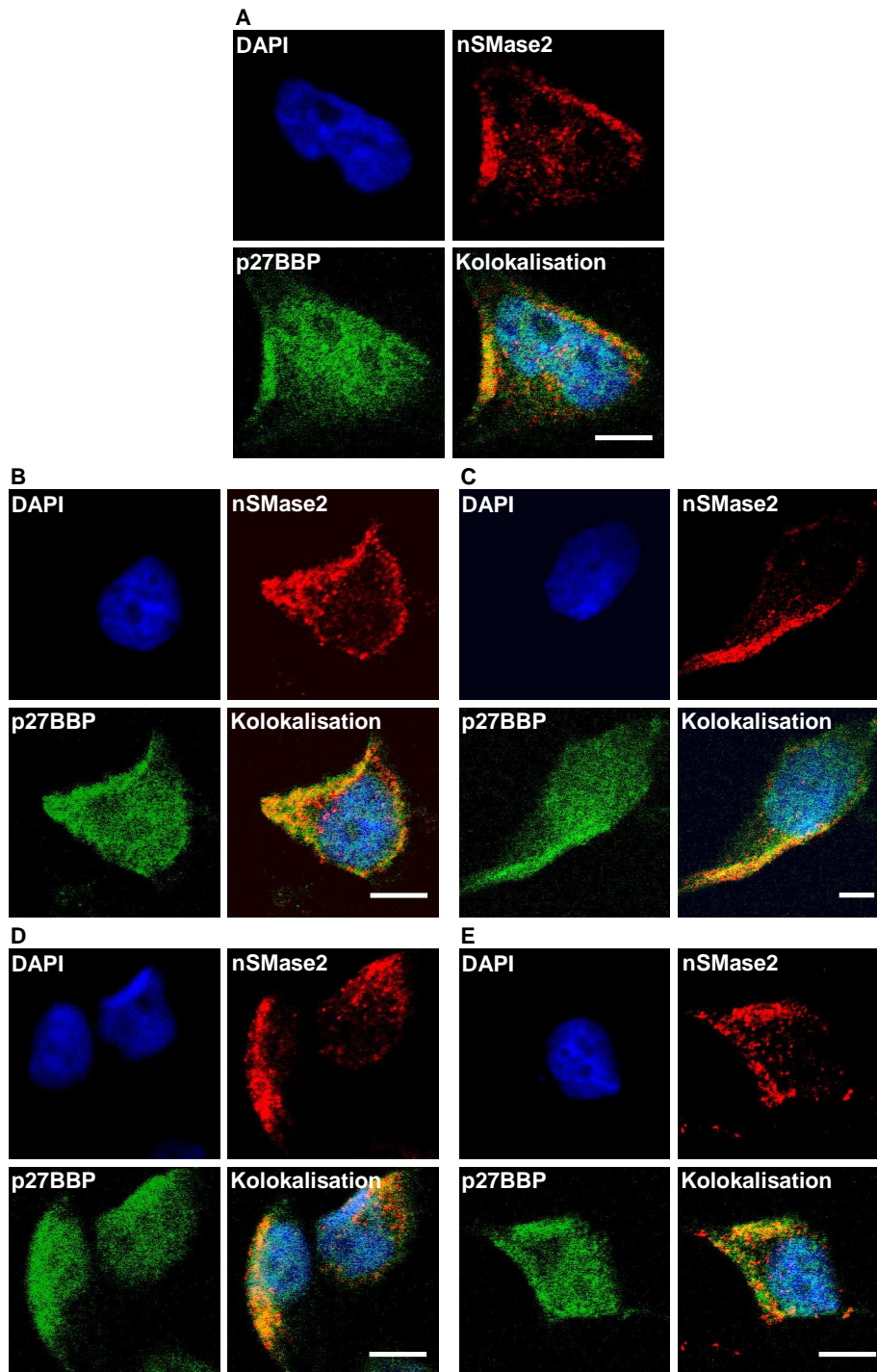


Abb. 19: endogene nSMase2- und p27BBP-Verteilung in HeLa-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. HeLa-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Kaninchen-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 555 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Maus-anti-EIF6(=p27BBP)-Antikörpern (BD) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und p27BBP ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 µm).

3.3.4 p27BBP und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden

Durch die Kollokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die in der Hefe beobachtete spezifische Interaktion von p27BBP und der nSMase2 auch in humanen Zellen stattfinden kann. Mittels Koimmunpräzipitationsversuchen mit den endogenen Proteinen aus Jurkat-Zelllysaten wurde nun überprüft, ob es tatsächlich *in vivo* zu dieser Interaktion kommt. Für die Immunpräzipitationen mit Miltenyi-Microbeads und die anschließenden Proteindetektionen im Western Blot wurden die gleichen Primärantikörper verwendet wie bei den Immunfluoreszenzen. Als Negativkontrollen wurden antikörperfreie Lysate der identischen Prozedur unterzogen. p27BBP konnte mit der nSMase2 deutlich koimmunpräzipitiert werden. Durch vorherige dreiminütige Stimulation der Zellen mit TNF wurde keine Veränderung der Bindungsintensität beobachtet (s. Abb. 20A). Im umgekehrten Versuchsaufbau konnte die nSMase2 ebenfalls mit p27BBP koimmunpräzipitiert werden, mit lediglich etwas schwächerer Signalintensität. Auch in diesem Fall war die Interaktion mit und ohne TNF-Stimulation ersichtlich (s. Abb. 20B). Die TNF-unabhängige Bindung dieser beiden Proteine in Jurkat-Zellen konnte also durch Koimmunpräzipitationen in beiden Ansätzen bestätigt werden.

Ergebnisse

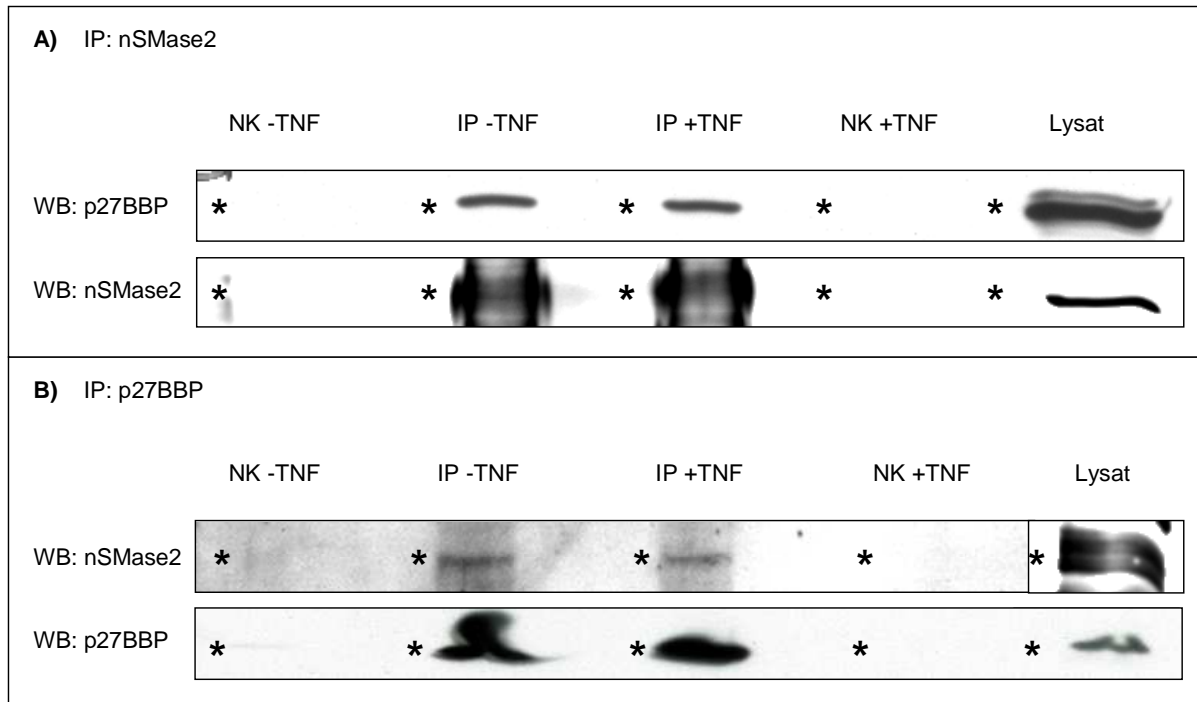


Abb. 20: p27BBP und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (-TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. Die nSMase2 (A) bzw. p27BBP (B) wurden mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und spezifischen Antikörpern (A: Kaninchen-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz); B: Maus-anti-EIF6(=p27BBP)-Antikörper (BD)) aus den Lysaten immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). In den anschließenden Western Blots wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt (Lysat). A: Die nSMase2-Immunpräzipitate (IP: nSMase2) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten p27BBP-Antikörper auf Koimmunpräzipitation von p27BBP überprüft (WB: p27BBP). Die Darstellung der direkt immunpräzipitierten nSMase2 mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: nSMase2). B: Die p27BBP-Immunpräzipitate (IP: p27BBP) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper auf Koimmunpräzipitation der nSMase2 überprüft (WB: nSMase2). Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten p27BBP mit dem oben genannten p27BBP-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: p27BBP). Die abgegrenzte Lysat-Spur (WB: nSMase2) wurde zur besseren Darstellung mit einer anderen Belichtung aufgenommen als die übrigen Spuren. *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

3.3.5 p27BBP und RACK1 können koimmunpräzipitiert werden

RACK1 war durch einen Y2H-Screen bereits als Interaktionspartner von p27BBP identifiziert worden und die Interaktion konnte durch Koimmunpräzipitation in A431-Zellen (epidermales Karzinom) bestätigt werden (Ceci et al., 2003). Daher sollte in dieser Arbeit die direkte Interaktion auch in Jurkat-Zellen überprüft und zusätzlich ein möglicher Einfluss von TNF analysiert werden. Zur Immunpräzipitation und Detektion von RACK1 diente ein monoklonaler Maus-anti-RACK1-Antikörper von Santa Cruz.

Ergebnisse

Es stellte sich heraus, dass p27BBP sehr prominent mit RACK1 koimmunpräzipitiert werden konnte (s. Abb. 21A). Auch bei den p27BBP-Immunpräzipitaten wurde im RACK1-Western Blot eine spezifisch kopräzipitierende Bande sichtbar, wenn auch etwas weniger prägnant (s. Abb. 21B). Eine deutliche Zu- oder Abnahme der Interaktion durch dreiminütige TNF-Stimulation konnte in beiden Immunpräzipitationsansätzen nicht festgestellt werden. Die Kolokalisations- und Koimmunpräzipitationsergebnisse verdeutlichen, dass p27BBP in menschlichen Zellen spezifisch sowohl mit der nSMase2 als auch mit RACK1 interagiert und somit eine weitere potentielle Komponente der nSMase2-Signaltransduktion darstellt.

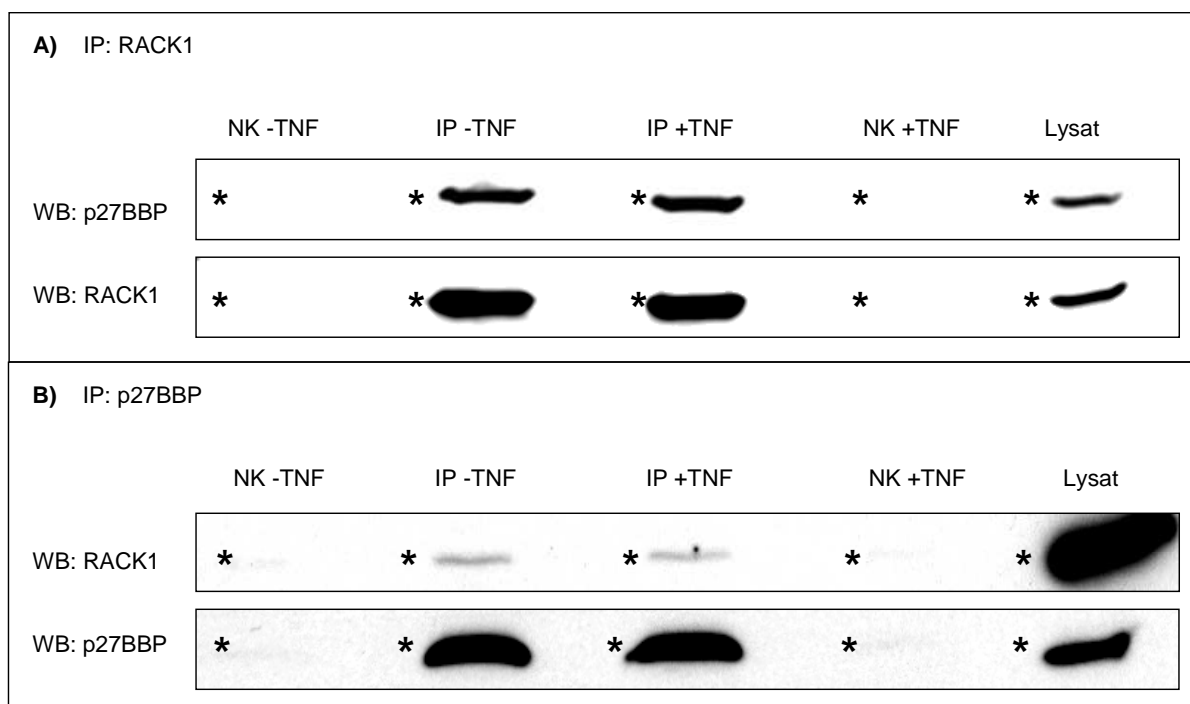


Abb. 21: p27BBP und RACK1 können koimmunpräzipitiert werden. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (–TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. RACK1 (A) bzw. p27BBP (B) wurden mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und spezifischen Antikörpern (A: Maus-anti-RACK1-Antikörper (Santa Cruz); B: Maus-anti-EIF6(=p27BBP)-Antikörper (BD)) aus den Lysaten immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). In den anschließenden Western Blots wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt (Lysat). A: Die RACK1-Immunpräzipitate (IP: RACK1) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten p27BBP-Antikörper auf Koimmunpräzipitation von p27BBP überprüft (WB: p27BBP). Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten RACK1 mit dem oben genannten RACK1-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: RACK1). B: Die p27BBP-Immunpräzipitate (IP: p27BBP) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten RACK1-Antikörper auf Koimmunpräzipitation von RACK1 überprüft (WB: RACK1). Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten p27BBP mit dem oben genannten p27BBP-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: p27BBP). *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

3.3.6 p27BBP ist an der TNF-induzierten Aktivierung der nSMase2 beteiligt

Eine mögliche Rolle von p27BBP in der TNF-induzierten Aktivierung der nSMase2 sollte mittels N-SMase-Aktivitätsmessungen in Jurkat-Zellen überprüft werden, nachdem die p27BBP-Expression durch RNA-Interferenz herunterreguliert wurde. Es wurde dazu eine validierte p27BBP-siRNA von Ambion verwendet, die zunächst im Western Blot überprüft wurde. Sie rief in Jurkat-Zellen eine erwartungsgemäß deutliche Reduzierung des endogenen p27BBP-Proteins hervor (s. Abb. 22A). Für die N-SMase-Aktivitätsuntersuchungen wurde p27BBP erneut herunterreguliert. Durch Immunfluoreszenzen konnte gezeigt werden, dass nur die p27BBP-spezifische, aber nicht die Negativkontroll-siRNA die p27BBP-Expression in Jurkat-Zellen verminderte (s. Abb. 22B). Die N-SMase-Aktivität wurde jeweils nach 0, 1,5, 3 und 10 Minuten TNF-Stimulation gemessen. Bei den untransfizierten und mit Negativkontroll-siRNA transfizierten Ansätzen wurde die größte Aktivitätssteigerung durch TNF nach 1,5 Minuten verzeichnet. Durch p27BBP-RNA-Interferenz konnte dieser Effekt hingegen deutlich abgeschwächt werden (s. Abb. 22C). p27BBP ist also offenbar eine weitere notwendige Komponente der TNF-abhängigen nSMase2-Aktivierung. Die geringe noch erkennbare Aktivitätssteigerung durch TNF nach p27BBP-RNA-Interferenz ist möglicherweise auf die nicht absolut vollständige Herunterregulation von p27BBP zurückzuführen (s. Abb. 22A, B).

Ergebnisse

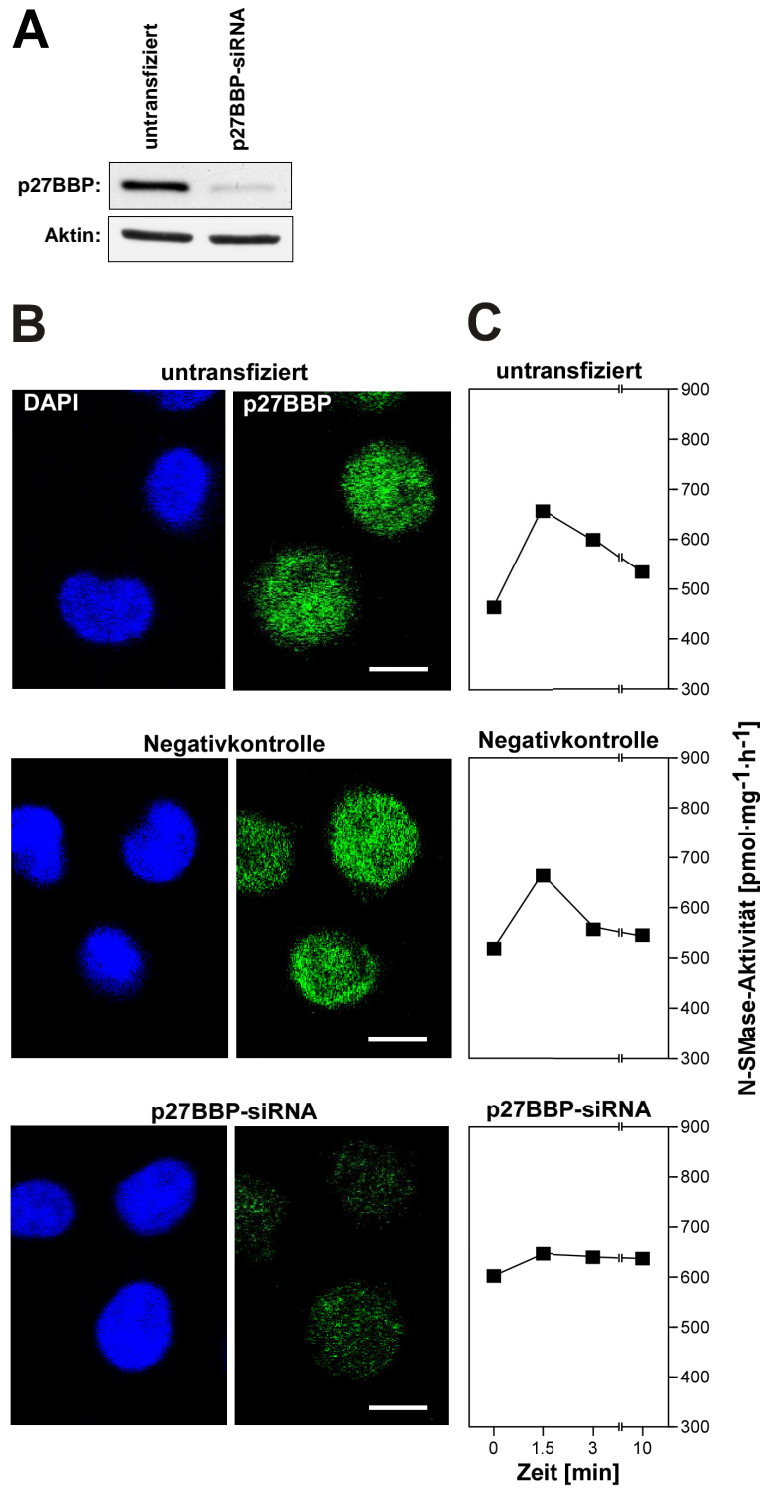


Abb. 22: p27BBP ist an der Aktivierung der nSMase2 durch TNF beteiligt. A: Die Effizienz einer p27BBP-spezifischen siRNA wurde 48 Stunden nach Transfektion in Jurkat-Zellen durch Western-Blot mit Maus-anti-EIF6(=p27BBP)-Antikörpern (BD) überprüft. Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle. B: Jurkat-Zellen blieben unbehandelt (oben), wurden mit Negativkontroll-siRNA (Mitte) oder mit p27BBP-spezifischer siRNA (unten) transfiziert und 48 Stunden später fixiert und permeabilisiert. Die Expression von endogenem p27BBP wurde mittels Maus-anti-EIF6(=p27BBP)-Antikörpern (BD) und fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Maus-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) überprüft. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstab Balken: 10 μm). C: N-SMase-Aktivität nach 0, 1,5, 3 und 10 min. TNF-Stimulation bei unbehandelten, Negativkontroll-siRNA-transfizierten und mit p27BBP-spezifischer siRNA transfizierten Jurkat-Zellen. Es sind jeweils die Mittelwerte aus zwei Aktivitätsmessungen dargestellt. Die Aktivitätsmessungen wurden von Dr. Supandi Winoto-Morbach, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

3.3.7 LAMR1 und die nSMase2 kolokalisieren TNF-unabhängig in humanen Zellen

LAMR1 ist an ribosomalen Prozessen im Zytosol beteiligt und partizipiert als membranständiger Rezeptor bei Zelladhäsion. Für die Bindung an extrazelluläres Laminin interagiert LAMR1 mit Integrin $\alpha 6\beta 4$ und kolokalisiert mit ITGB1 (Nelson et al., 2008; Romanov et al., 1994). Zudem ist LAMR1 ebenso wie ITGB1 und ITGB2 sowie die nSMase2 in JNK- und p38MAPK-Signaltransduktion involviert (Avdi, 2001; Givant-Horwitz et al., 2004; Clarke et al., 2006, 2010; Sato et al., 2005; Ramgolam et al., 2010; Jin et al., 2011).

In den in Kapitel 3.3.2.2.2 geschilderten Heferversuchen interagierte LAMR1 spezifisch sowohl mit der katalytischen Domäne der nSMase2 als auch mit dem vollständigen Protein. Wie für p27BBP sollte auch diese Interaktion in humanen Zellen überprüft werden. Für Immunfluoreszenzversuche wurden ein Kaninchen-anti-LAMR1-Antikörper (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (grün) und der Ziege-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörper (rot) verwendet. In Jurkat-Zellen konnte dadurch gezeigt werden, dass LAMR1 größtenteils im Zytoplasma einschließlich des Membranbereichs lokalisiert war. Hier konnte eine deutliche Kolokalisation mit der nSMase2 detektiert werden (s. Abb. 23A), die in dreidimensionalen Stack-Aufnahmen in allen Zellebenen nachzuweisen war (nicht gezeigt). Nach 3-, 10-, 30- und 60-minütiger TNF-Stimulation waren keine Unterschiede in der intrazellulären Verteilung der Proteine zu verzeichnen (s. Abb. 23B-E).

Die Verteilungsmuster wurden zudem in HeLa-Zellen überprüft. In diesen Zellen befand sich LAMR1 in deutlich ausgeprägterem Maße im Zellkern als in der T-Zelllinie. Dieses Ergebnis entspricht früheren Studien, in denen die 37LRP (37 kDa laminin receptor precursor; LBP/p40) genannte LAMR1-Vorstufe in verschiedenen adhären Zellen auch im Nukleus beschrieben wurde. Hier bindet 37LRP unter anderem an Chromatin (Sato et al., 1996; Salama et al., 2001). Für Lamininbindung an der Zellmembran und zytosolische Funktionen ist 67LR (67 kDa laminin receptor), also der reife LAMR1, zuständig (Nelson et al., 2008). Der in dieser Arbeit verwendete Lamininrezeptor-Antikörper erkannte beide LAMR1-Varianten (s. Abb. 25). Entsprechend konnte LAMR1 in den HeLa-Immunfluoreszenzen außer im Zellkern auch im Zytoplasmabereich und an der Plasmamembran diagnostiziert werden, wo es in mehreren Bereichen mit der nSMase2 kolokalisierte (s. Abb. 24A). Durch verschieden lange TNF-Stimulationen konnte auch in diesen Zellen weder eine prägnante Veränderung der Kolokalisationsintensität noch eine Translokation von LAMR1 beobachtet werden (s. Abb. 24B-E). LAMR1 und die nSMase2 kolokalisierten in Jurkat- und HeLa-Zellen also TNF-unabhängig.

Ergebnisse

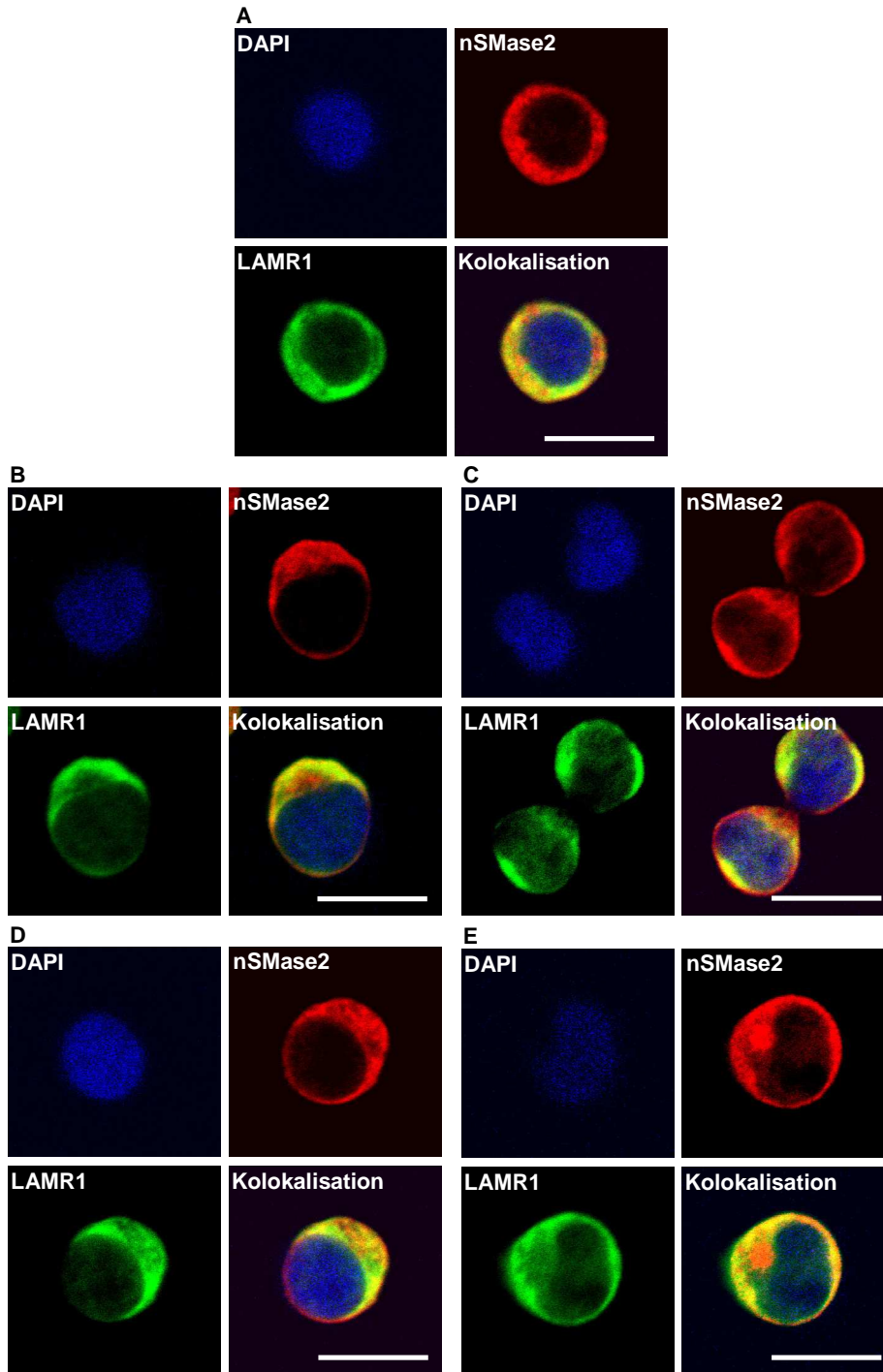


Abb. 23: endogene nSMase2- und LAMR1-Verteilung in Jurkat-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Ziege-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Kaninchen-anti-LAMR1-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und LAMR1 ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 μm).

Ergebnisse

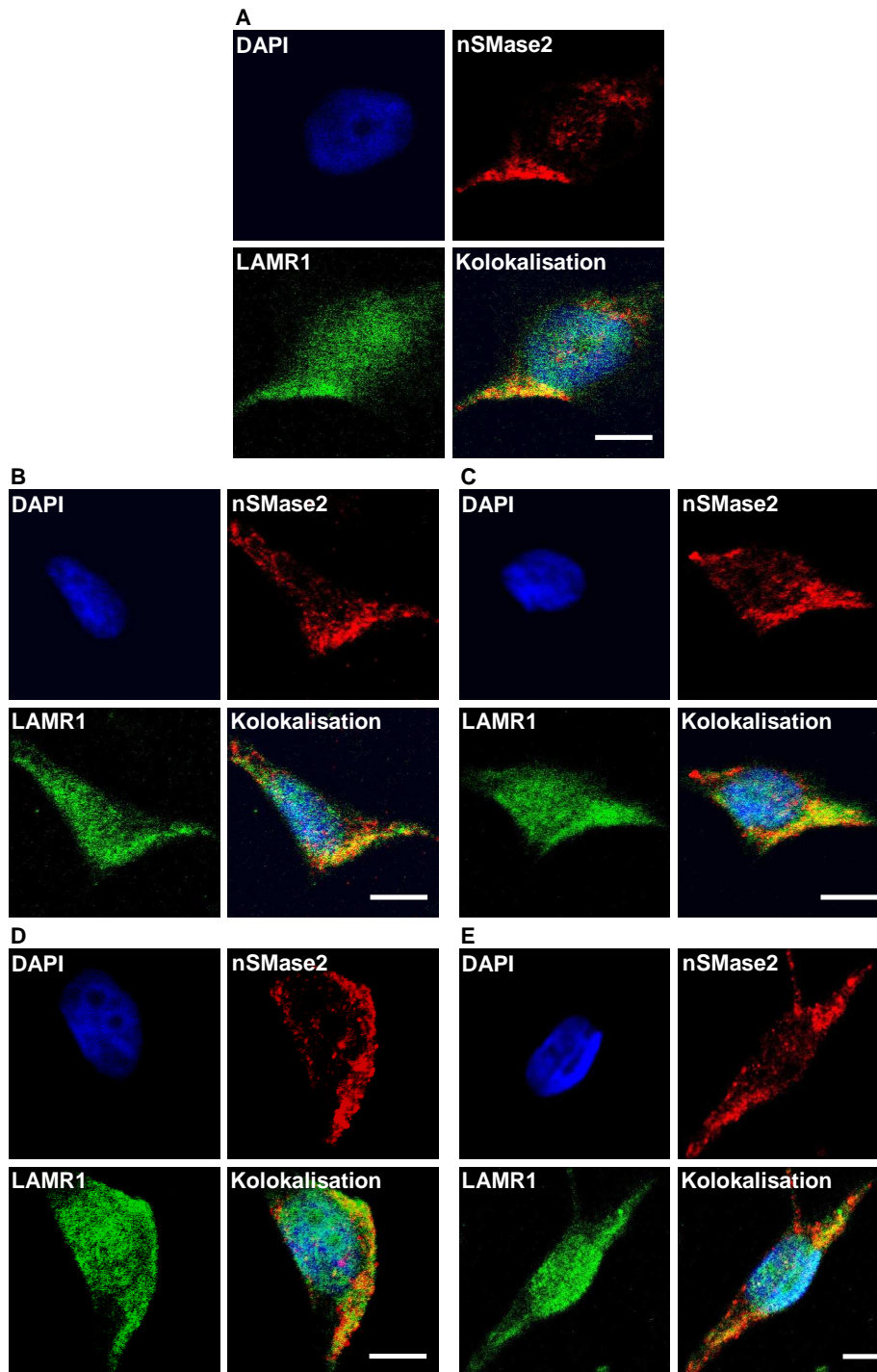


Abb. 24: endogene nSMase2- und LAMR1-Verteilung in HeLa-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Ziege-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Kaninchen-anti-LAMR1-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und LAMR1 ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 μm).

3.3.8 LAMR1 und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden

Um die Interaktion von LAMR1 und nSMase2 in humanen Zellen zu verifizieren, wurden wie in Kapitel 3.2.4 Koimmunpräzipitationsversuche mit endogenen Proteinen aus Jurkat-Zelllysaten durchgeführt. Dazu wurden der gleiche Kaninchen-anti-LAMR1-Antikörper wie in Kapitel 3.3.7 und ein monoklonaler Maus-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz) verwendet. In dem nSMase2-Immunpräzipitat konnte durch LAMR1-Western Blot eine Bande von 67 kDa detektiert werden. Das gleiche Ergebnis wurde in der Koimmunpräzipitation nach dreiminütiger TNF-Stimulation beobachtet. Die nSMase2 interagiert also TNF-unabhängig spezifisch mit dem reifen Lamininrezeptor, während die 37 kDa-Vorstufe nur im Zelllysate, aber nicht in den nSMase2-Präzipitaten nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 25A). Im umgekehrten Versuchsaufbau wurde die nSMase2 ebenfalls mit und ohne vorherige TNF-Stimulation mit LAMR1 koimmunpräzipitiert (s. Abb. 25B). Die Proteine interagieren entsprechend nicht nur in der Hefe, sondern auch in humanen Zellen miteinander.

Ergebnisse

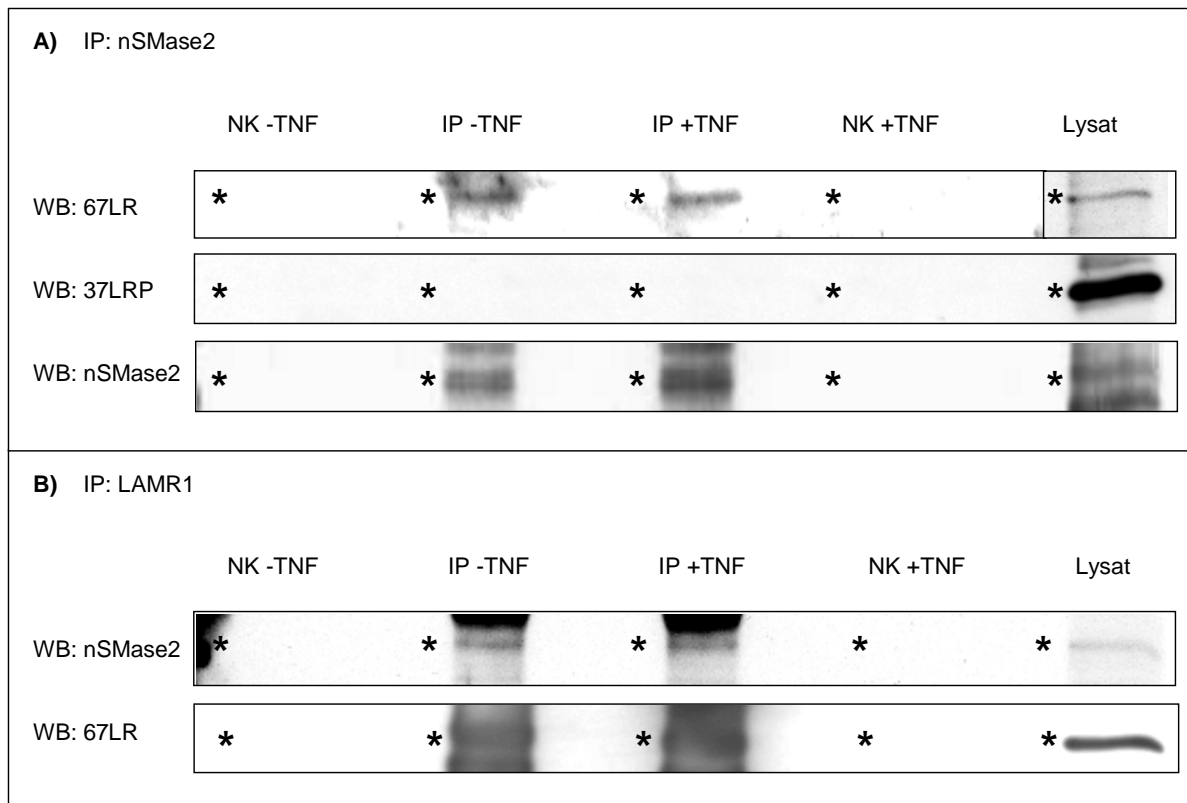


Abb. 25: LAMR1 und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (-TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. Die nSMase2 (A) bzw. LAMR1 (B) wurden mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und spezifischen Antikörpern (A: Maus-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz); B: Kaninchen-anti-LAMR1-Antikörper (Santa Cruz)) aus den Lysaten immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). In den anschließenden Western Blots wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt (Lysat). A: Die nSMase2-Immunpräzipitate (IP: nSMase2) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten LAMR1-Antikörper auf Koimmunpräzipitation des reifen LAMR1 (WB: 67LR) und der LAMR1-Vorstufe (WB: 37LRP) überprüft. Die Darstellung der direkt immunpräzipitierten nSMase2 mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper diene als Ladekontrolle (WB: nSMase2). Die abgegrenzte Lysat-Spur (WB: 67LR) wurde zur besseren Darstellung mit einer anderen Belichtung aufgenommen als die übrigen Spuren. B: Die LAMR1-Immunpräzipitate (IP: LAMR1) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper auf Koimmunpräzipitation der nSMase2 überprüft (WB: nSMase2). Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten reifen LAMR1 mit dem oben genannten LAMR1-Antikörper diene als Ladekontrolle (WB: 67LR). *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

3.3.9 RACK1 kann mit LAMR1 koimmunpräzipitiert werden

Sowohl LAMR1 als auch RACK1 sind Bestandteile von eukaryontischen Ribosomen und binden Integrine an der Zellmembran (Nelson et al., 2008, Nilsson et al., 2004; Liliental et al., 1998). Eine direkte Interaktion der beiden Proteine sollte daher überprüft werden. Die Western Blot-Membranen mit den LAMR1-Immunpräzipitationen aus Kapitel 3.2.8 wurden zu diesem Zweck mit dem Maus-anti-RACK1-Antikörper (Santa Cruz) reinkubiert. Dadurch

Ergebnisse

konnten in den LAMR1-Präzipitaten sowohl mit als auch ohne vorherige TNF-Stimulation RACK1-spezifische Banden detektiert werden (s. Abb. 26A). Zusätzlich wurden RACK1-Immunpräzipitationen vorgenommen, in denen jedoch weder 67LR noch 37LRP nachweisbar waren (s. Abb. 26B). RACK1 konnte also mit LAMR1 koimmunpräzipitiert werden, LAMR1 jedoch nicht mit RACK1. Möglicherweise blockierte der verwendete RACK1-Antikörper bei der RACK1-Immunpräzipitation die Bindestelle für LAMR1, so dass es in diesem Versuchsansatz nicht zur Interaktion zwischen RACK1 und LAMR1 kommen konnte.

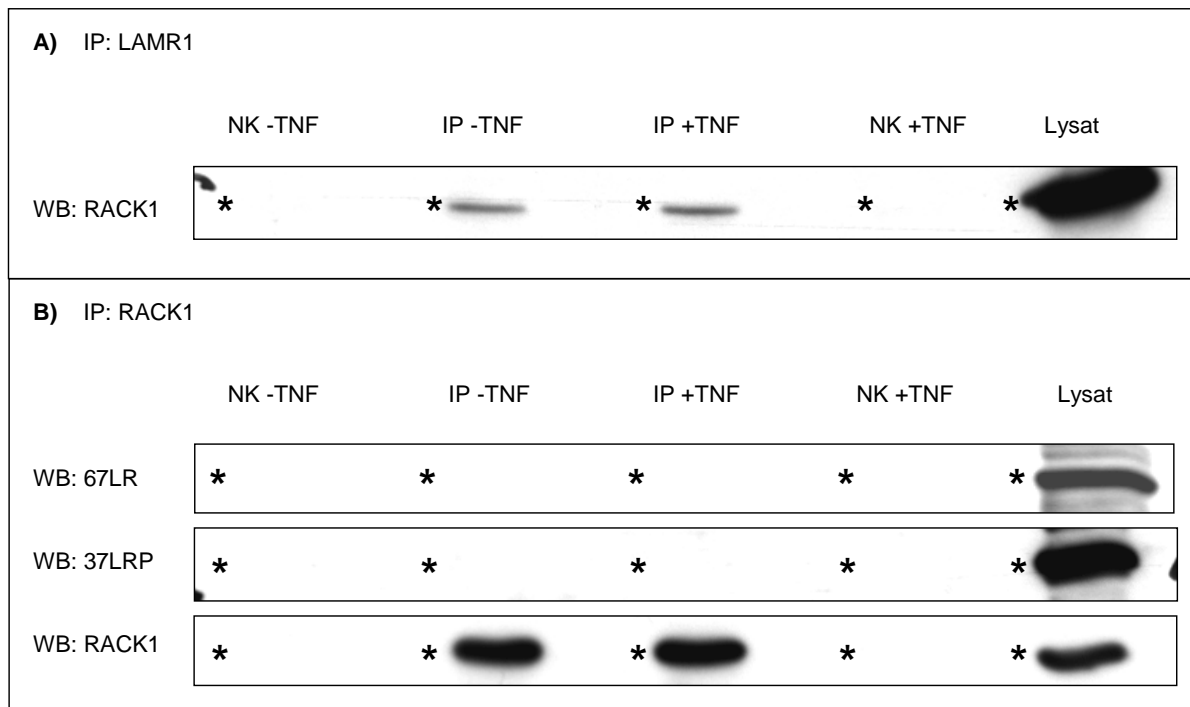


Abb. 26: RACK1 kann mit LAMR1 koimmunpräzipitiert werden. A: Reinkubation der Western Blot-Membran mit den LAMR1-Immunpräzipitationen aus Abb. 25B mit Maus-anti-RACK1-Antikörpern (Santa Cruz) zur Detektion von koimmunpräzipitiertem RACK1 (WB: RACK1). B: Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (-TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. RACK1 wurde mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und dem oben genannten RACK1-Antikörper aus den Lysaten immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). Im anschließenden Western Blot wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt (Lysat). Die RACK1-Immunpräzipitate (IP: RACK1) wurden mittels Western Blot mit dem Kaninchen-anti-LAMR1-Antikörper (Santa Cruz) auf Koimmunpräzipitation des reifen LAMR1 (WB: 67LR) und der LAMR1-Vorstufe (WB: 37LRP) überprüft. Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten RACK1 mit dem oben genannten RACK1-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: RACK1). *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

3.3.10 LAMR1 wird nicht für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 benötigt

Die spezifische Interaktion von LAMR1 mit der nSMase2 und vermutlich auch mit RACK1 macht den Lamininrezeptor zu einem weiteren potentiell an der TNF-abhängigen nSMase2-Aktivierung beteiligten Faktor. Daher sollte im Folgenden ermittelt werden, ob LAMR1-Herunterregulation die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 unterbindet. Zunächst wurden deshalb zwei verschiedene siRNAs gegen LAMR1 in Jurkat-Zellen transfiziert und ihre Effizienz mittels Western Blot und einem Maus-anti-LAMR1-Antikörper (Enzo) überprüft. Die LAMR1-Expression konnte vor allem durch die LAMR1-siRNA_2 erfolgreich unterbunden werden (s. Abb. 27A), weshalb diese für die folgenden Experimente verwendet wurde. Durch Immunfluoreszenz mit den Antikörpern aus Kapitel 3.3.7 wurde die Expressionsinhibition durch die LAMR1-siRNA_2 zusätzlich verifiziert und zudem sichergestellt, dass die Negativkontroll-siRNA keinen Einfluss auf die LAMR1-Proteinmenge ausübt (s. Abb. 27B). Die folgenden N-SMase-Aktivitätsmessungen ergaben, dass die Aktivität der nSMase2 auch in Abwesenheit von LAMR1 durch TNF gesteigert werden kann. Es kam nach erfolgreicher Herunterregulation von LAMR1 trotzdem zu dem typischen Anstieg der N-SMase-Aktivität nach 1,5-minütiger TNF-Stimulation mit allmählicher Abnahme nach drei bis zehn Minuten (s. Abb. 27C). LAMR1 ist demnach keine essentielle Komponente des TNF-induzierten nSMase2-Aktivierungskomplexes, könnte aber aufgrund der konstitutiven Interaktion mit der nSMase2 stromabwärts der nSMase2-Aktivierung in die Effektorsignalwege involviert sein.

Ergebnisse

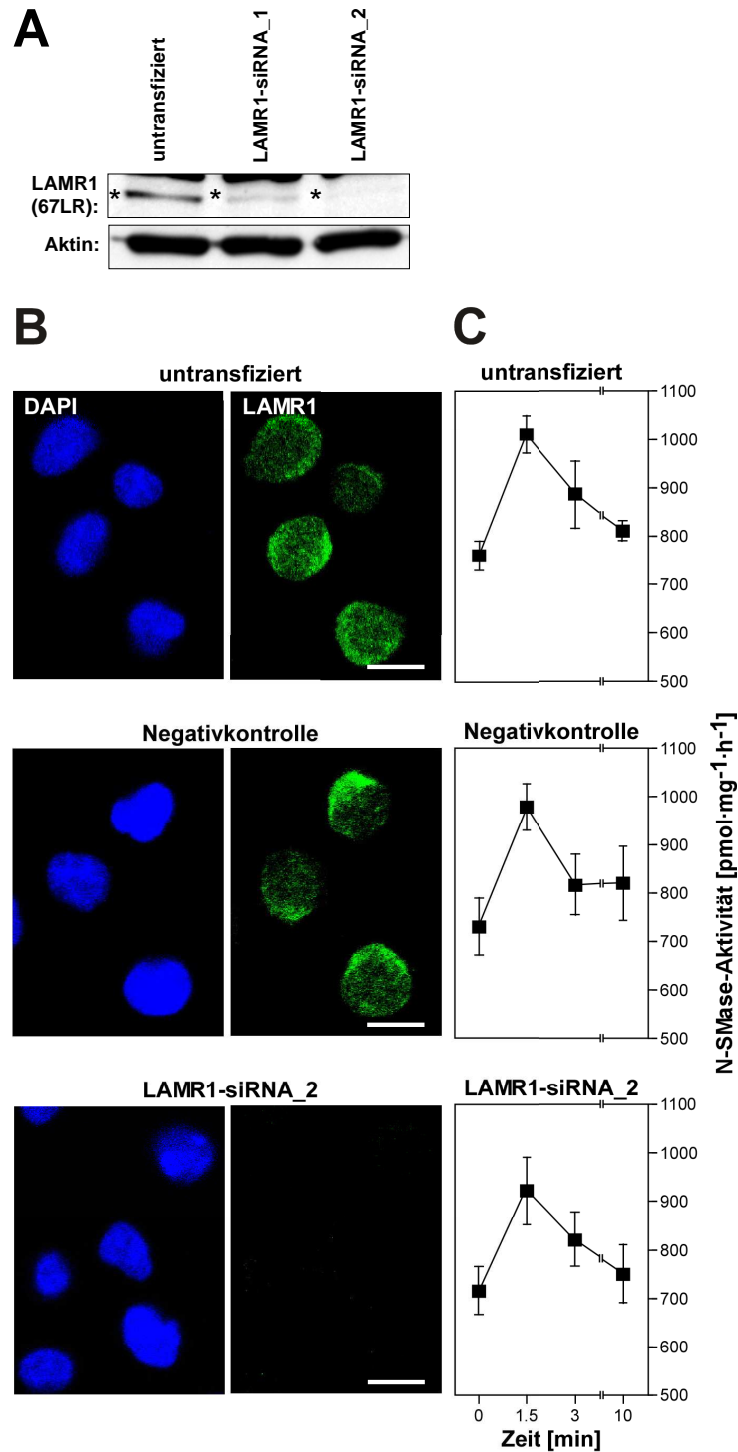


Abb. 27: LAMR1 wird nicht für die Aktivierung der nSMase2 durch TNF benötigt. A: Die Effizienz zweier siRNAs zur Reduzierung der endogenen Proteinsynthese von LAMR1 (67LR und 37LRP) wurde 48 Stunden nach Transfektion in Jurkat-Zellen durch Western-Blot mit Maus-anti-LAMR1-Antikörpern (Enzo, erkennen 67LR) überprüft. Aktin-Detektion diente als Ladekontrolle. B: Jurkat-Zellen blieben unbehandelt (oben), wurden mit Negativkontroll-siRNA (Mitte) oder mit LAMR1-siRNA_2 (unten) transfiziert und 48 Stunden später fixiert und permeabilisiert. Die Expression von endogenem LAMR1 wurde mittels Kaninchen-anti-LAMR1-Antikörpern (Santa Cruz, erkennen 67LR und 37LRP) mit fluoreszenzgekoppelten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) überprüft. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 μm). C: N-SMase-Aktivität nach 0, 1,5, 3 und 10 min. TNF-Stimulation bei unbehandelten, Negativkontroll-siRNA-transfizierten und mit LAMR1-siRNA_2 transfizierten Jurkat-Zellen. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Aktivitätsmessungen dargestellt. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. Die Aktivitätsmessungen wurden von Dr. Supandi Winoto-Morbach, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

3.3.11 PKC ζ und die nSMase2 kolokalisieren TNF-unabhängig in humanen Zellen

PKC ζ ist durch TNF und Ceramid aktivierbar und bindet direkt an Ceramid, um einen proapoptotischen Komplex zu bilden (Ramström et al., 2004; Wang et al., 2005). Das Protein agiert entsprechend stromabwärts von SMase-bedingter Sphingomyelinhydrolyse. PKC ζ -Überexpression hatte in früheren Studien einen dominant negativen Effekt sowohl auf A-SMase- als auch auf N-SMase-Aktivität (Charruyer et al., 2007; Bezombes et al., 2002). Durch die Y2H-Studien aus Kapitel 3.3.2.2 konnte zudem gezeigt werden, dass PKC ζ direkt mit der nSMase2 interagieren kann.

Für Kolokalisationsstudien in humanen Zellen mittels Immunfluoreszenz wurden der Kaninchen-anti-PKC ζ -Antikörper 9372 (Cell Signaling) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (grün) und erneut der Ziege-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörper (rot) verwendet. PKC ζ wurde bereits, abhängig von der jeweils untersuchten Zellart, im Zytoplasma, an der Zellmembran und/oder im Nukleus beschrieben (Stross et al., 2009). Bei den hier durchgeführten Immunfluoreszenzen mit Jurkat-Zellen konnte die endogene PKC ζ vor allem im Zytoplasma und an der Zellmembran, aber auch in geringeren Mengen im Zellkern nachgewiesen werden. Das Enzym kolokalisierte außerhalb des Nukleus deutlich mit der nSMase2 (s. Abb. 28A). Durch dreidimensionale Aufnahmen mittels Stack-Funktion konnte die Kolokalisation in großen Arealen des Zytoplasmas verifiziert werden (nicht gezeigt). Durch 3-, 10-, 30- und 60-minütige TNF-Stimulation konnte keine Veränderung der Kolokalisation induziert werden (s. Abb. 28B-E). In HeLa-Zellen wurde die PKC ζ prominenter im Nukleus detektiert als in Jurkat-Zellen. Die Nucleoli (identifizierbar als dunkle Flecken in der DAPI-Färbung) waren dabei frei von PKC ζ . Auch in HeLa-Zellen kam es vor allem an der Zellmembran und im membrannahen Zytoplasma zu detektierbarer Kolokalisation mit der nSMase2 (s. Abb. 29A). Verschieden lange TNF-Stimulationen verursachten in HeLa-Zellen wie bei den Jurkat-Zellen keine eindeutig erkennbare PKC ζ -Translokation (s. Abb. 29B-E). Diese Ergebnisse entsprechen früheren Studien mit J-LAT-Zellen (HIV-Provirusinfizierte, aber nicht-transkribierende Jurkat-Zellen) und endothelialen HUVEC-Zellen (Williams et al., 2004; Ross et al., 1997).

Ergebnisse

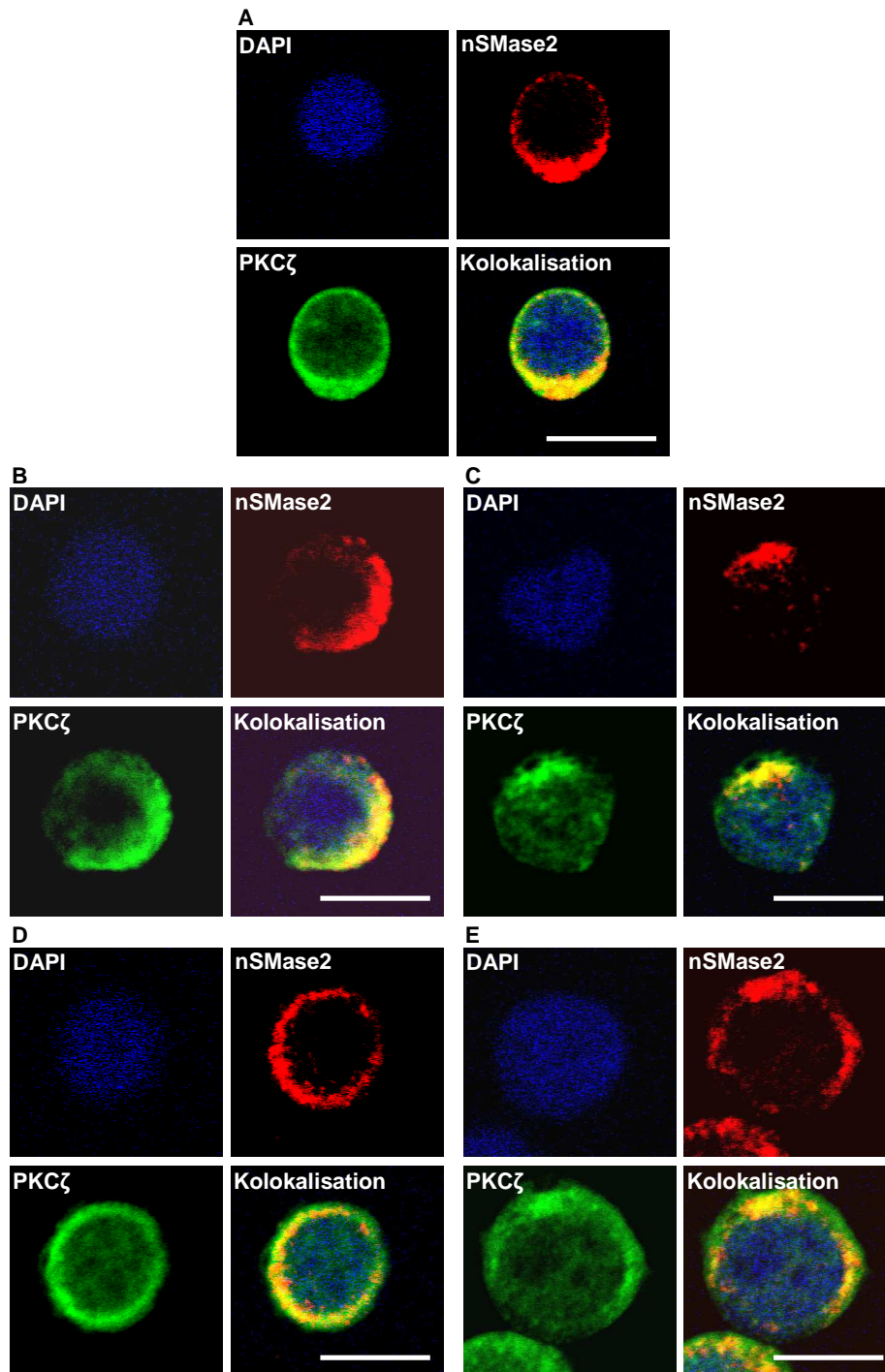


Abb. 28: endogene nSMase2- und PKC ζ -Verteilung in Jurkat-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Ziege-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Kaninchen-anti-PKC ζ -Antikörper 9372 (Cell Signaling) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und PKC ζ ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 μ m).

Ergebnisse

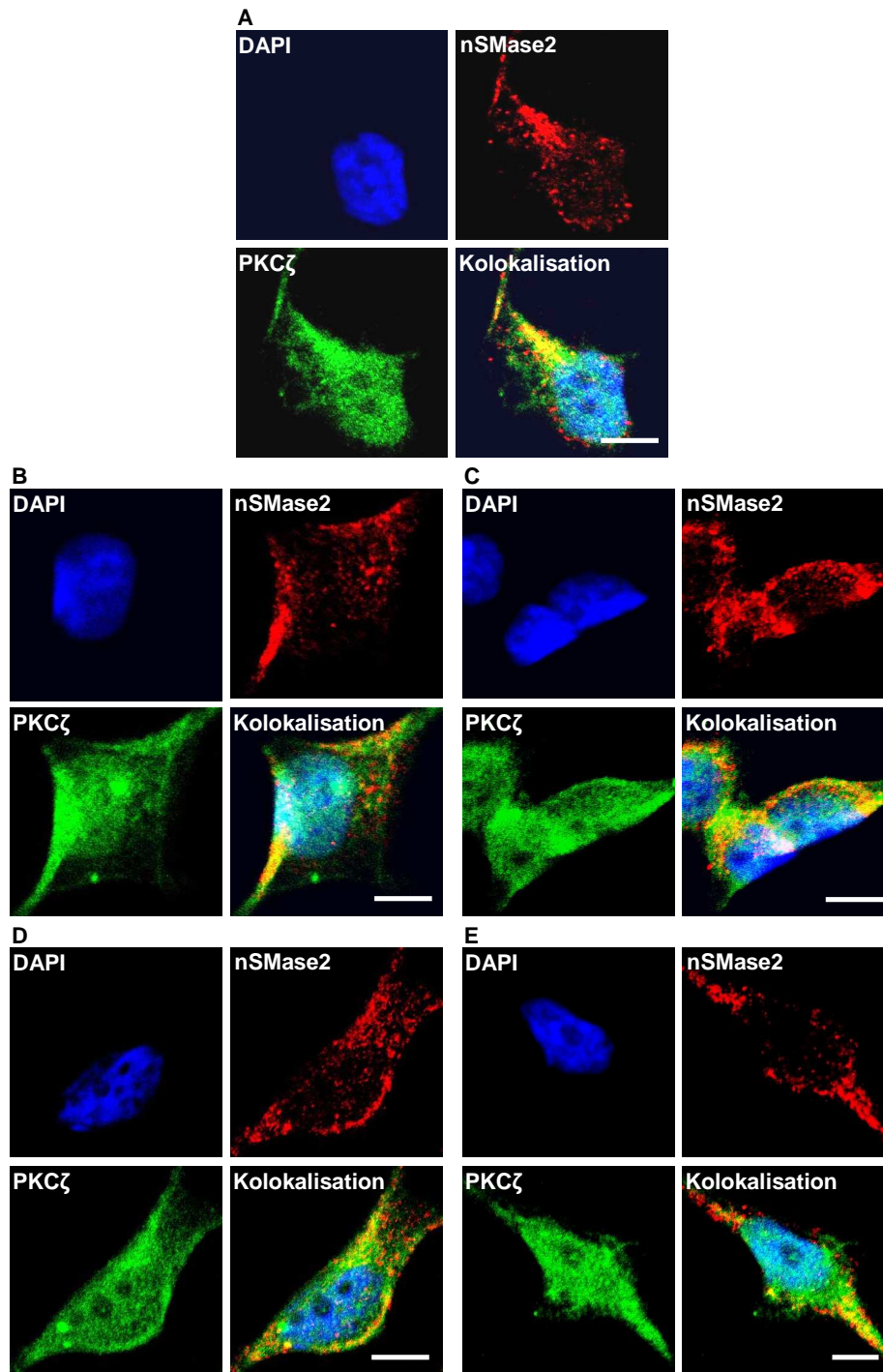


Abb. 29: endogene nSMase2- und PKC ζ -Verteilung in HeLa-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. HeLa-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Ziege-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Kaninchen-anti-PKC ζ -Antikörpern 9372 (Cell Signaling) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und PKC ζ ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 μ m).

3.3.12 PKC ζ und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden

Die spezifische Interaktion der PKC ζ mit der nSMase2 konnte in Jurkat-Zellen mittels Koimmunpräzitationen verifiziert werden. Es wurden dazu jeweils der monoklonale Kaninchen-anti-PKC ζ -Antikörper C24E6 (Cell Signaling) und der bereits in Kapitel 3.3.8 verwendete monoklonale Maus-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz) verwendet. In den nSMase2-Immunpräzipitaten konnten mit und ohne vorherige TNF-Stimulation sehr prominente PKC ζ -Banden detektiert werden, was auf eine starke Interaktion der beiden Proteine hindeutet (s. Abb. 30A). Umgekehrt konnte die nSMase2 auch mit der PKC ζ koimmunpräzipitiert werden, allerdings weniger intensiv (s. Abb. 30B).

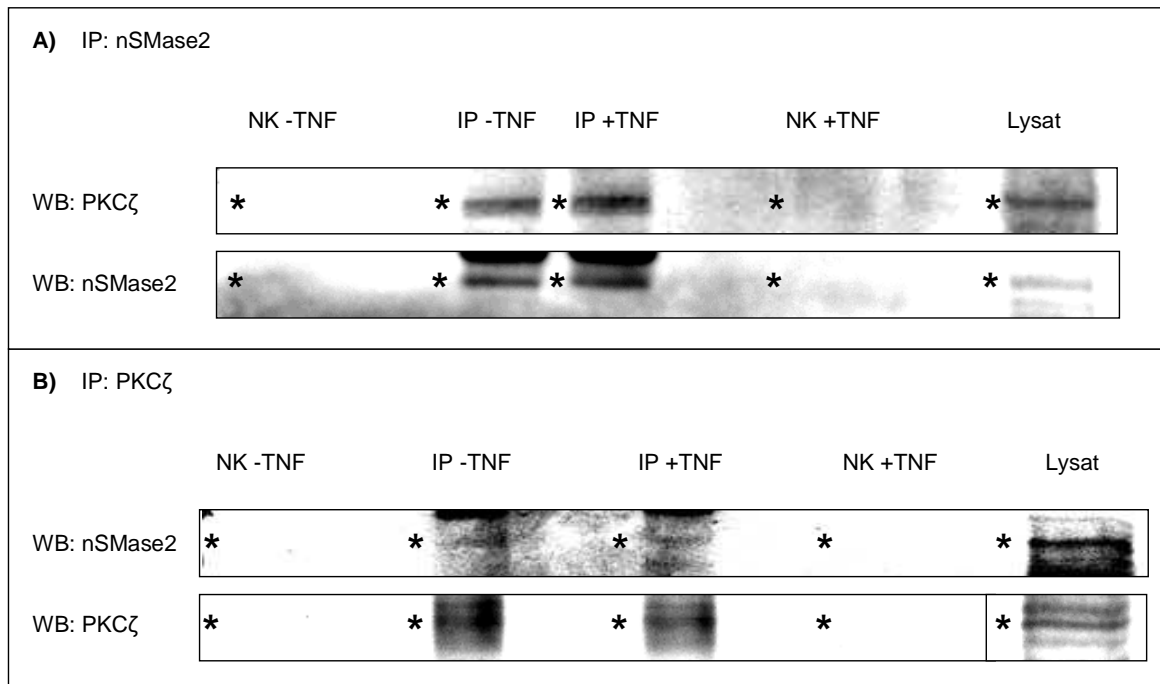


Abb. 30: PKC ζ und die nSMase2 können koimmunpräzipitiert werden. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (-TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. Die nSMase2 (A) bzw. PKC ζ (B) wurden mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und spezifischen Antikörpern (A: Maus-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz); B: Kaninchen-anti-PKC ζ -Antikörper C24E6 (Cell Signaling)) aus den Lysaten immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). In den anschließenden Western Blots wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt (Lysat). A: Die nSMase2-Immunpräzipitate (IP: nSMase2) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten PKC ζ -Antikörper auf Koimmunpräzipitation von PKC ζ überprüft (WB: PKC ζ). Die Darstellung der direkt immunpräzipitierten nSMase2 mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: nSMase2). B: Die PKC ζ -Immunpräzipitate (IP: PKC ζ) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper auf Koimmunpräzipitation der nSMase2 überprüft (WB: nSMase2). Die Darstellung der direkt immunpräzipitierten PKC ζ mit dem oben genannten PKC ζ -Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: PKC ζ). Die abgegrenzte Lysat-Spur (WB: PKC ζ) wurde zur besseren Darstellung mit einer anderen Belichtung aufgenommen als die übrigen Spuren. *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

3.3.13 PKC ζ und RACK1 können nicht koimmunpräzipitiert werden

RACK1 bindet spezifisch an PKC β 2, rekrutiert klassische PKCs an die Plasmamembran und koppelt PKC ϵ an ITGB1 und ITGB5 (Besson et al., 2002). Die atypischen PKCs (aPKCs) wie PKC ζ sind jedoch bislang nicht mit RACK1 in Verbindung gebracht worden. Koimmunpräzipitationsexperimente in Jurkat-Zellen sollten diesen Sachverhalt aufklären. Es wurden derselbe PKC ζ -Antikörper wie in Kapitel 3.3.12 und der Maus-anti-RACK1-Antikörper von Santa Cruz verwendet. Die 67 kDa schwere PKC ζ konnte nur im Kontrolllysate, aber nicht in den RACK1-Immunpräzipitaten nachgewiesen werden, auch nicht nach dreiminütiger TNF-Stimulation (s. Abb. 31A). Es wurden lediglich Banden von niedrigerem Molekulargewicht detektiert, die den dissoziierten schweren Antikörperketten entsprechen könnten. In den PKC ζ -Immunpräzipitaten war RACK1 ebenfalls nicht nachweisbar (s. Abb. 31B). PKC ζ kann somit kein weiteres direktes Verbindungsmolekül zwischen RACK1 und der nSMase2 im Rahmen der N-SMase-Aktivierung darstellen. Dieses Ergebnis entspricht früheren Studien, wonach PKC ζ mit den durch SMasen generierten Ceramiden Komplexe bildet (Wang et al., 2005). Die in Kapitel 3.3.11 und 3.3.12 geschilderte konstitutive Interaktion mit der nSMase2 lässt also auf Funktionen der PKC ζ bei Mechanismen stromabwärts der nSMase2-Aktivierung schließen. Um zu testen, ob die PKC ζ dennoch auch stromaufwärts der nSMase2 wirkt, sollte ein möglicher Effekt von PKC ζ -RNA-Interferenz auf die N-SMase-Aktivität untersucht werden. Da keine validierten PKC ζ -siRNAs kommerziell erhältlich waren, wurden drei nicht validierte siRNAs auf ihr Potential zur Herunterregulation der PKC ζ hin getestet. Die PKC ζ -Proteinsynthese konnte jedoch nicht inhibiert werden (s. Abb. 32), so dass ein eventueller Einfluss der PKC ζ auf die nSMase2-Aktivierung nicht analysiert werden konnte.

Ergebnisse

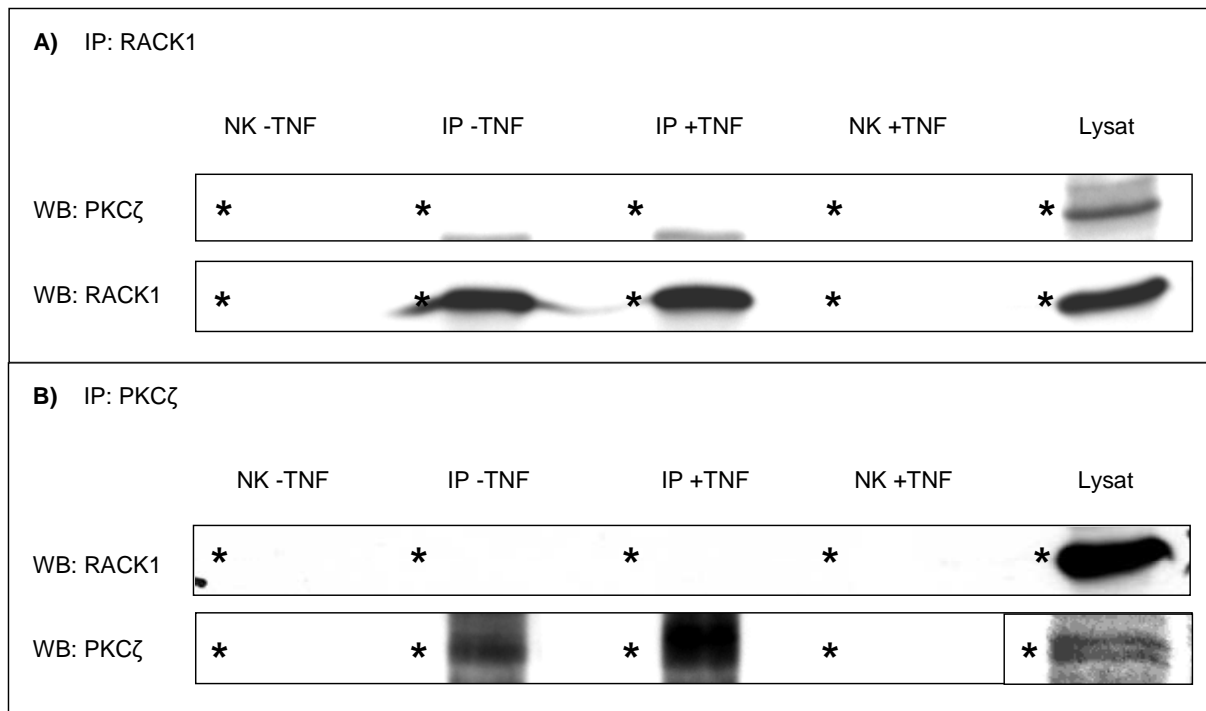


Abb. 31: PKC ζ und RACK1 können nicht koimmunpräzipitiert werden. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (-TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. RACK1 (A) bzw. PKC ζ (B) wurden mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und spezifischen Antikörpern (A: Maus-anti-RACK1-Antikörper (Santa Cruz); B: Kaninchen-anti-PKC ζ -Antikörper C24E6 (Cell Signaling)) aus den Lysaten immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). In den anschließenden Western Blots wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt (Lysat). A: Die RACK1-Immunpräzipitate (IP: RACK1) wurden mittels Western Blot (WB: PKC ζ) mit dem oben genannten PKC ζ -Antikörper auf Koimmunpräzipitation von PKC ζ überprüft. Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten RACK1 mit dem oben genannten RACK1-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: RACK1). B: Die PKC ζ -Immunpräzipitate (IP: PKC ζ) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten RACK1-Antikörper auf Koimmunpräzipitation von RACK1 überprüft (WB: RACK1). Die Darstellung der direkt immunpräzipitierten PKC ζ mit dem oben genannten PKC ζ -Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: PKC ζ). Die abgegrenzte Lysat-Spur (WB: PKC ζ) wurde zur besseren Darstellung mit einer anderen Belichtung aufgenommen als die übrigen Spuren *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

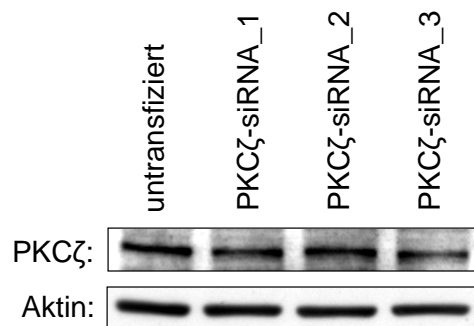


Abb. 32: Auswirkungen von verschiedenen PKC ζ -siRNAs auf die Proteinmenge von PKC ζ in Jurkat-Zellen. Die Effizienz von drei siRNAs zur Reduzierung der endogenen Proteinsynthese von PKC ζ wurde 48 Stunden nach Transfektion in Jurkat-Zellen durch Western-Blot mit Kaninchen-anti-PKC ζ -Antikörpern C24E6 (Cell Signaling) überprüft. Aktin-Detektion diente als Ladekontrolle.

3.3.14 COPB1 und die nSMase2 kolokalisieren im Bereich des Golgi-Apparats

COPB1, auch β -COP genannt, ist als Bestandteil des COP1 (coatamer protein complex 1) unter anderem an Protein-Rücktransporten vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum beteiligt (Paulsson et al., 2002). Außerdem interagiert COPB1 wie die nSMase2-Signalwegskomponenten RACK1 und EED mit dem HIV-Protein Nef (Benichou et al, 1994; Gallina et al., 2001; Witte et al., 2004).

Ob COPB1 und nSMase2 in humanen Zellen kolokalisiert vorliegen, wurde abermals in Jurkat- und HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenzexperimenten untersucht. COPB1 wurde durch einen Kaninchen-anti- β -COP-Antikörper (Abcam) mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (grün) und die nSMase2 durch den Ziege-anti-nSMase2-Antikörper von Santa Cruz mit fluoreszenzmarkiertem Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörper (rot) nachgewiesen. Sowohl in Jurkat- als auch in HeLa-Zellen war COPB1 spezifisch an einer zytoplasmatischen Seite des Zellkerns angehäuft sichtbar. Dieses Verteilungsmuster entspricht der intrazellulären Lokalisation des Golgi-Apparats und ist übereinstimmend mit der COPB1-Verteilung in anderen Zelltypen (Oprins et al., 1993; Sullivan et al., 2000). In diesem Organell kolokalisierte COPB1 zudem mit der teilweise Golgi-assoziierten nSMase2, die Kolokalisation war in Jurkat-Zellen allerdings wesentlich prominenter ausgeprägt als in HeLa-Zellen (s. Abb. 33A, 34A). Diese Golgi-spezifische Kolokalisation konnte durch dreidimensionale Stack-Aufnahmen der Zellen bestätigt werden (nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte COPB1 in geringeren Mengen im Zytosol verteilt detektiert werden, eine deutliche Kolokalisation mit der nSMase2 wurde jedoch weder an der Zellmembran noch im membrannahen Zytoplasma beobachtet. Durch 3, 10, 30 und 60 Minuten TNF-Stimulation wurde ebenfalls keine Veränderung des Verteilungsmusters von COPB1 induziert (s. Abb. 33B-E, 34B-E). Wenn die Interaktion von COPB1 und nSMase2 *in vivo* stattfindet, dann also anscheinend vor allem im Bereich des Golgi-Apparats.

Ergebnisse

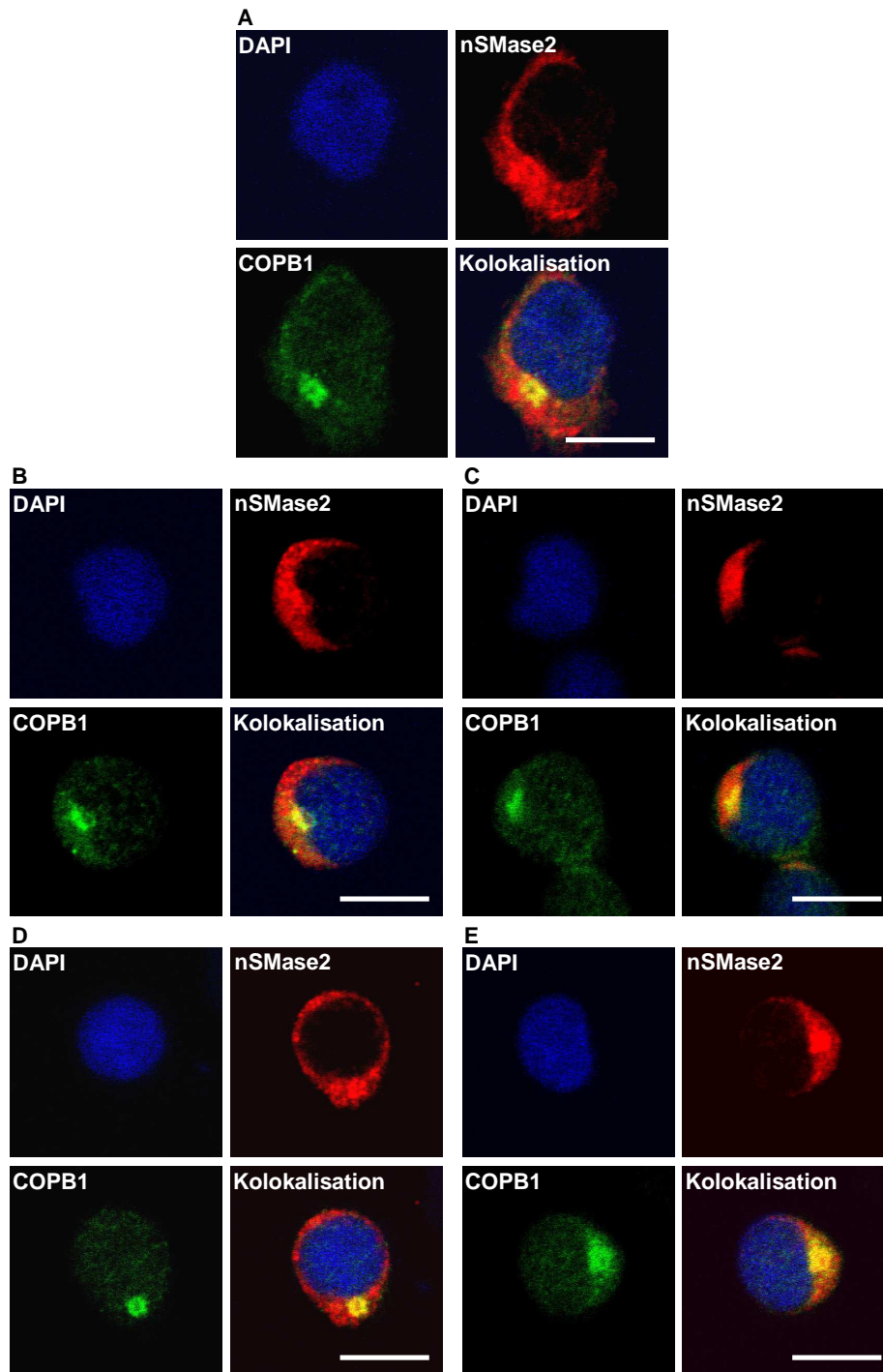


Abb. 33: endogene nSMase2- und COPB1-Verteilung in Jurkat-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Ziege-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Kaninchen-anti- β -COP-Antikörpern (Abcam) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und COPB1 ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 μ m).

Ergebnisse

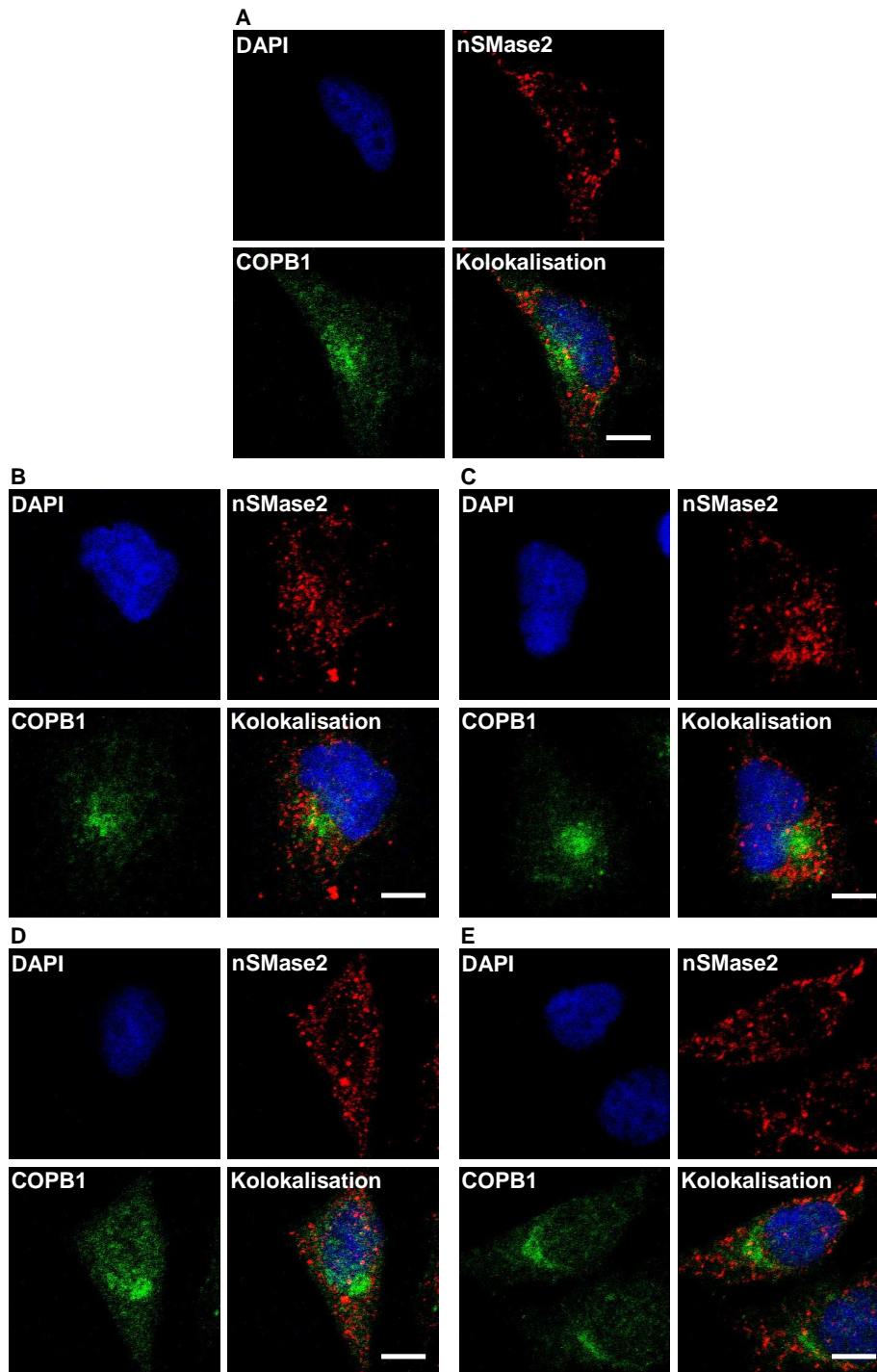


Abb. 34: endogene nSMase2- und COPB1-Verteilung in HeLa-Zellen nach unterschiedlich langen TNF-Stimulationen. HeLa-Zellen wurden für 0 min. (A), 3 min. (B), 10 min. (C), 30 min. (D) und 60 min. (E) mit TNF (100 ng/mL) stimuliert. Die Zielproteine wurden in der Immunfluoreszenz mittels Ziege-anti-nSMase2-Antikörpern (Santa Cruz) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 555 Esel-anti-Ziege-Zweitantikörpern (Molecular Probes, rot) bzw. mittels Kaninchen-anti- β -COP-Antikörpern (Abcam) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt. Kolokalisation von nSMase2 und COPB1 ist als gelbe Färbung erkennbar (Maßstabsbalken: 10 μ m).

3.3.15 COPB1 kann mit der nSMase2 koimmunpräzipitiert werden

Für Koimmunpräzipitationsexperimente aus Jurkat-Lysaten wurden der Maus-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz) und erneut der Kaninchen-anti- β -COP-Antikörper (Abcam) verwendet. Dadurch konnte im nSMase2-Immunpräzipitat eine schwache Bande auf der Laufhöhe von COPB1 nachgewiesen werden, deren Intensität sich nach TNF-Stimulation nicht verstärkte (s. Abb. 35A). In den COPB1-Immunpräzipitaten konnte die nSMase2 hingegen weder mit noch ohne vorherige TNF-Behandlung der Zellen detektiert werden (s. Abb. 35B). Die Interaktionsintensität von COPB1 mit der nSMase2 scheint *in vivo* also nur schwach ausgeprägt und TNF-unabhängig zu sein.

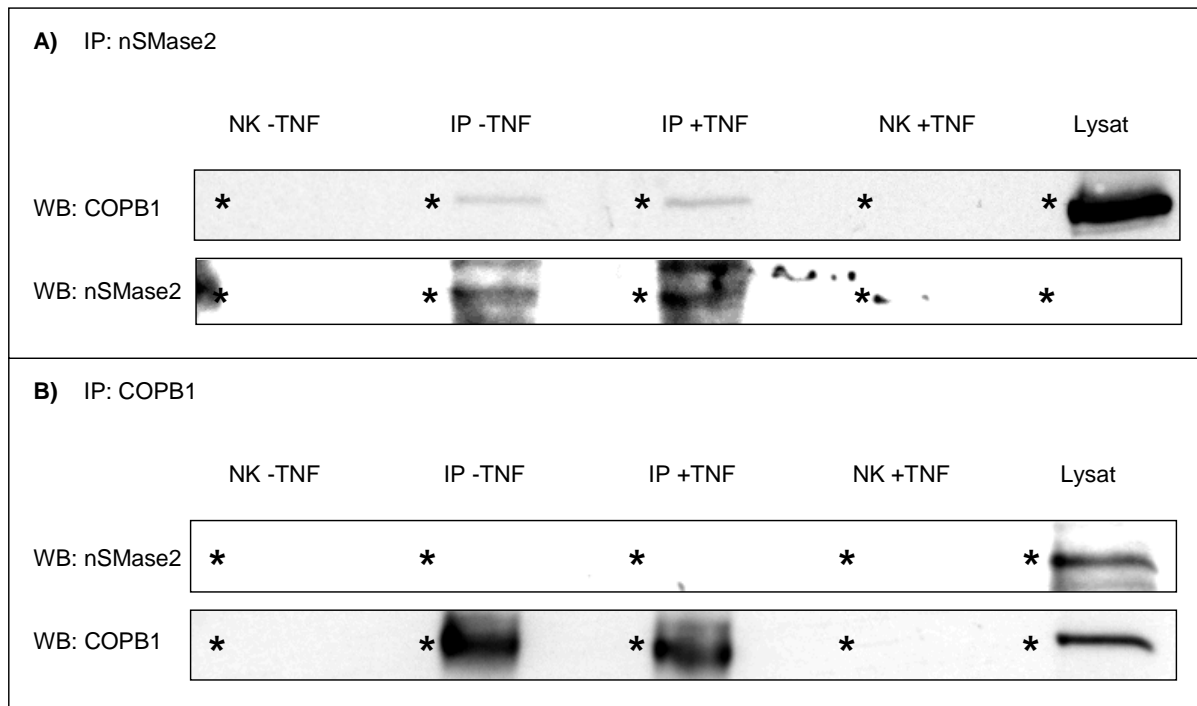


Abb. 35: COPB1 kann mit der nSMase2 koimmunpräzipitiert werden. Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (-TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. Die nSMase2 (A) bzw. COPB1 (B) wurden mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und spezifischen Antikörpern (A: Maus-anti-nSMase2-Antikörper (Santa Cruz); B: Kaninchen-anti- β -COP-Antikörper (Abcam)) aus den Lysaten immunpräzipitiert (IP). Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). In den anschließenden Western Blots wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt. A: Die nSMase2-Immunpräzipitate (IP: nSMase2) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten COPB1-Antikörper auf Koimmunpräzipitation von COPB1 überprüft (WB: COPB1). Die Darstellung der direkt immunpräzipitierten nSMase2 mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: nSMase2). B: Die COPB1-Immunpräzipitate (IP: COPB1) wurden mittels Western Blot mit dem oben genannten nSMase2-Antikörper auf Koimmunpräzipitation der nSMase2 überprüft (WB: nSMase2). Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten COPB1 mit dem oben genannten COPB1-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: COPB1). *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

3.3.16 COPB1 und RACK1 können nicht koimmunpräzipitiert werden

COPB1 ist in Maus und Ratte auch als RACK2 beschrieben worden, da es wie RACK1 mit PKC ϵ interagieren kann (Fenton et al., 2009). Deshalb sollte auch für COPB1 eine mögliche direkte Interaktion mit RACK1 in Jurkat-Zellen durch weitere Koimmunpräzipitationen überprüft werden. Durch Reinkubation der COPB1-Immunpräzipitate aus Kapitel 3.3.15 mit RACK1-Antikörpern (Santa Cruz) konnte jedoch mit und ohne TNF kein koimmunpräzipitiertes RACK1 festgestellt werden (s. Abb. 36A). Ein identisches Resultat ergab sich nach RACK1-Immunpräzipitationen mit anschließendem COPB1-Western Blot (s. Abb. 36B). Eine Interaktion von COPB1 mit RACK1 konnte in Jurkat-Zellen mittels Immunpräzipitation also nicht nachgewiesen werden und wurde auch durch TNF nicht induziert.

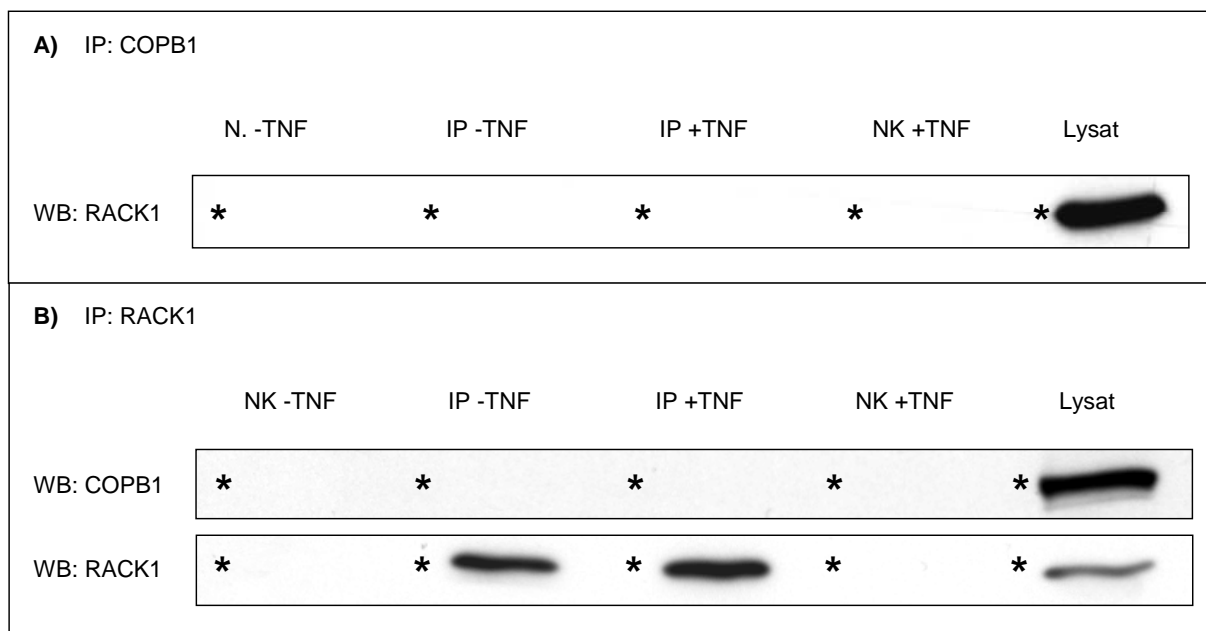


Abb. 36: COPB1 und RACK1 können nicht koimmunpräzipitiert werden. A: Reinkubation der Western Blot-Membran mit den COPB1-Immunpräzipitationen aus Abb. 34B mit Maus-anti-RACK1-Antikörpern (Santa Cruz) zur Detektion von koimmunpräzipitiertem RACK1 (WB: RACK1). B: Jurkat-Zellen wurden für 0 min. (-TNF) und 3 min. (+TNF) mit TNF stimuliert und anschließend lysiert. RACK1 wurde mittels Protein G MicroBeads (Miltenyi) und dem oben genannten RACK1-Antikörper aus den Lysaten immunpräzipitiert. Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Protein G MicroBeads, aber ohne Antikörper, der gleichen Prozedur unterzogen (NK). Im anschließenden Western Blot wurden zusätzlich die endogenen Proteine aus unbehandeltem Jurkat-Lysat dargestellt (Lysat). Die RACK1-Immunpräzipitate (IP: RACK1) wurden mittels Western Blot mit dem Kaninchen-anti- β -COPB-Antikörper (Abcam) auf Koimmunpräzipitation von COPB1 überprüft (WB: COPB1). Die Darstellung des direkt immunpräzipitierten RACK1 mit dem oben genannten RACK1-Antikörper diente als Ladekontrolle (WB: RACK1). *-Symbole zeigen die erwarteten Laufhöhen der detektierten Proteine.

3.3.17 COPB1 wird nicht für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 benötigt

COPB1 interagiert nicht mit RACK1 und war zudem überwiegend im Bereich des Golgi-Apparats/ER lokalisiert (s. Kapitel 3.3.14 und 3.3.16). Diese Befunde sprechen gegen eine direkte Beteiligung an der nSMase2-Signalkaskade. Aufgrund seiner beschriebenen Funktion als Transportprotein (Paulsson et al., 2002) könnte COPB1 allerdings dennoch an der N-SMase-Aktivierung beteiligt sein, indem es Komponenten der Signalkaskade oder die nSMase2 selbst vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran eskortiert. Um diesen Sachverhalt aufzuklären, wurde die COPB1-Expression in Jurkat-Zellen herunterreguliert. Dafür wurde eine validierte COPB1-siRNA von Ambion transfiziert, welche die Translation des Proteins erfolgreich unterdrückte (s. Abb. 37A). Durch Immunfluoreszenzen wurde die Wirksamkeit der siRNA zusätzlich verifiziert und ein Einfluss von Negativkontroll-siRNA auf die COPB1-Expression ausgeschlossen (s. Abb. 37B). Trotz erfolgreicher Herunterregulation des Proteins war in den COPB1-siRNA-transfizierten Zellen eine identische N-SMase-Aktivierung durch TNF zu verzeichnen wie in den untransfizierten und mit Negativkontroll-siRNA transfizierten Jurkat-Zellen (s. Abb. 37C). Es stellte sich also heraus, dass COPB1 nicht an der TNF-induzierten Aktivierung der nSMase2 in Jurkat-Zellen beteiligt ist.

Ergebnisse

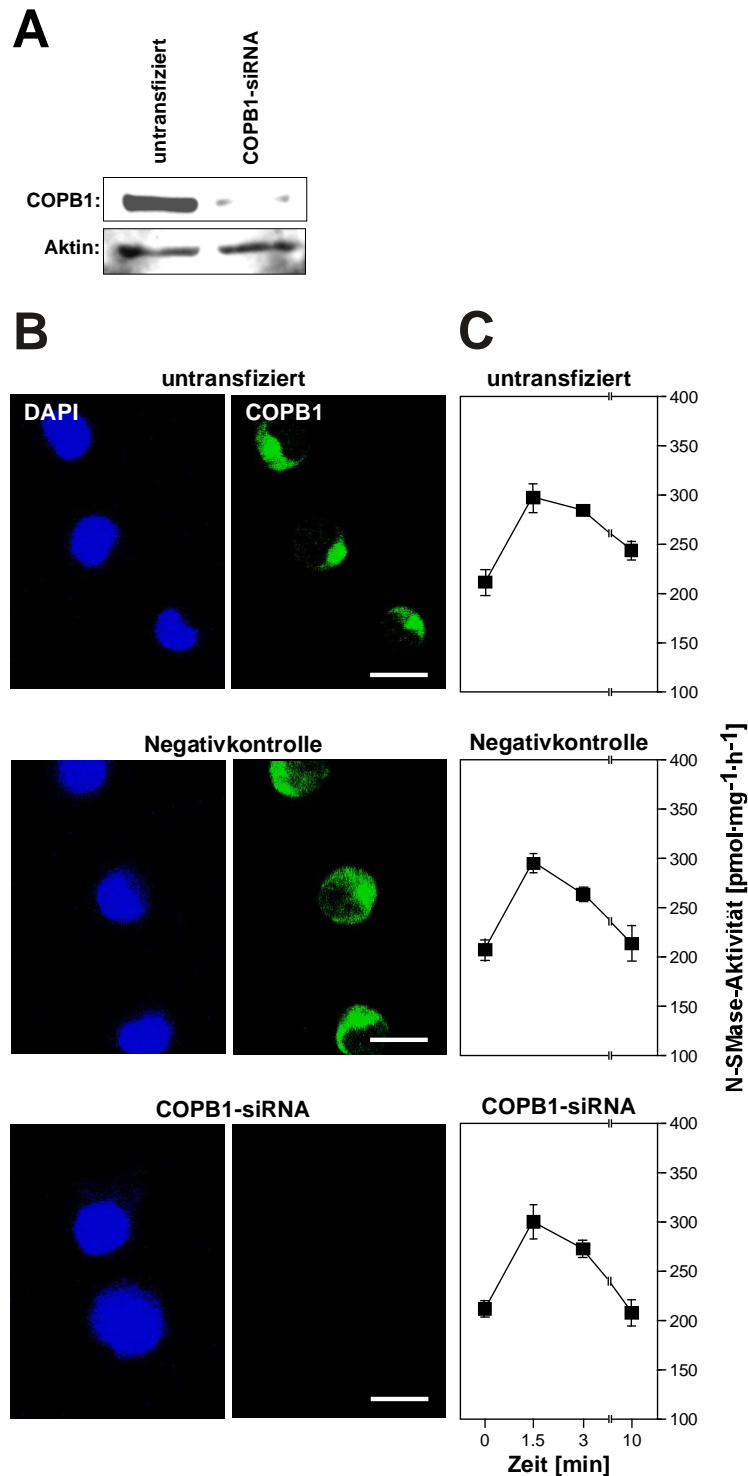


Abb. 37: COPB1 wird nicht für die Aktivierung der nSMase2 durch TNF benötigt. A: Die Effizienz einer siRNA zur Reduzierung der endogenen Proteinsynthese von COPB1 wurde 48 Stunden nach Transfektion in Jurkat-Zellen durch Western-Blot mit Kaninchen-anti- β -COPB-Antikörpern (Abcam) überprüft. Aktin-Detektion diente als Ladekontrolle. B: Jurkat-Zellen blieben unbehandelt (oben), wurden mit Negativkontroll-siRNA (Mitte) oder mit COPB1-siRNA (unten) transfiziert und 48 Stunden später fixiert und permeabilisiert. Die Expression von endogenem COPB1 wurde mittels Kaninchen-anti-COPB1-Antikörpern (Abcam) mit fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörpern (Molecular Probes, grün) überprüft. Zellkerne wurden durch DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (Maßstabsbalken: 10 μm). C: N-SMase-Aktivität nach 0, 1,5, 3 und 10 min. TNF-Stimulation bei unbehandelten, Negativkontroll-siRNA-transfizierten und mit COPB1-siRNA transfizierten Jurkat-Zellen. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Aktivitätsmessungen dargestellt. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. Die Aktivitätsmessungen wurden von Dr. Supandi Winoto-Morbach, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

4. Diskussion

4.1 Ein membranassoziierter Multimolekülkomplex ist für TNF-induzierte nSMase2-Aktivierung verantwortlich

Der N-SMase-Signaltransduktionsweg stellt eine der letzten bislang unvollständig beschriebenen Signalkaskaden des TNF-R1 dar. Das liegt unter anderem daran, dass erst über drei Jahrzehnte nach der Observierung von neutraler SMase-Aktivität im Menschen (Schneider und Kennedy, 1967) jenes Gen identifiziert wurde, welches für die *in vivo* als N-SMase agierende nSMase2 kodiert (Hofmann et al., 2000; Marchesini et al., 2003). Da also das Schlüsselmolekül selbst bis zu diesem Zeitpunkt nicht molekular identifiziert war, konnte der TNF-induzierte Signalweg zunächst nur von der Seite des TNF-R1 aus analysiert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass im Rahmen der TNF-induzierten N-SMase-Aktivierung die NSD des TNF-R1 konstitutiv an FAN und FAN an RACK1 binden muss (Adam et al., 1996; Adam-Klages et al., 1996; Tcherkasowa et al., 2002). Durch die Klonierung der nSMase2 war inzwischen auch das letzte wichtige molekulare Werkzeug vorhanden, um den N-SMase-Signaltransduktionsweg vollständig zu entschlüsseln.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte die Lücke zwischen dem TNF-R1·FAN·RACK1-Komplex und der nSMase2 geschlossen werden. EED interagierte spezifisch mit sowohl der nSMase2 als auch mit RACK1, stellte sich als Bestandteil des TNF-R1-Komplexes heraus und erwies sich als essentiell für TNF-induzierte N-SMase-Aktivierung in Jurkat-T-Lymphozyten. Es stellte sich ferner heraus, dass EED aus dem Zellkern bzw. dem kernnahen Zytoplasma an die Membran transloziert, um mit RACK1 und der nSMase2 in Verbindung zu treten. Der dafür nötige Impuls wird ebenfalls durch die Bindung von TNF an den TNF-R1 übermittelt, und zwar abhängig von der NSD des Rezeptors. Der zur Deaktivierung der nSMase2 führende Mechanismus scheint jedoch EED-unabhängig zu sein, denn nach zehnminütiger TNF-Stimulation hatte die N-SMase-Aktivität wieder ihr basales Niveau erreicht, während EED noch nicht in den Nukleus relokalisiert war.

Frühe N-SMase-Aktivierung nach 1,5- bis dreiminütiger TNF-Stimulation wurde außer in Jurkat-Zellen in verschiedenen anderen Zellarten beschrieben, wie A549, HUVEC, Maus-Embryonalfibroblasten und -Thymozyten sowie glatter Muskulatur. (Kreder et al, 1999; Clarke et al., 2011b). Diese frühe Aktivierung unterliegt vermutlich einem allgemeingültigen, FAN-vermittelten und EED-abhängigen Mechanismus. In MCF-7-Zellen wurde hingegen

eine späte Aktivierung der nSMase2 nach mehrstündiger TNF-Stimulation beobachtet, die nicht auf vermehrte nSMase2-Expression zurückzuführen war. Stattdessen wurden bisher unbekannte TNF-induzierte posttranslationelle Mechanismen als Grund vermutet (Clarke et al., 2011b). Es ist jedoch anzunehmen, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, rapide EED-Translokation nicht an diesem Phänomen beteiligt ist, da vermehrte EED-nSMase2-Kolokalisation in Jurkat-Zellen bereits nach 90 Sekunden erkennbar war. Außerdem konnte in HEK-293T-Zellen, in denen endogene, frühe N-SMase-Aktivierung durch TNF bisher ebenfalls nicht beobachtet wurde, keine veränderte EED-Verteilung durch TNF festgestellt werden.

Bislang ist noch ungeklärt, wie das Signal für die Translokation vom TNF-Rezeptor an EED übermittelt wird. Witte et al. (2004) beobachteten allerdings eine identische EED-Translokation in Jurkat-Zellen durch Integrin-Aktivierung. EED wurde in diesem Zusammenhang als „Shuttle-Protein“ beschrieben, welches dank seiner Kernlokalisations- und -extinktions-Signalsequenzen permanent zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und zurück wandert. WD-Repeat-Proteine wie EED sind dank ihrer propellerartigen Strukturen zudem in der Lage, an andere Proteine reversibel zu binden (Smith et al., 1999). Es wurde daher von Witte et al. postuliert, dass EED-Moleküle, die gerade nicht an weitere Kernproteine binden, intrinsisch aus dem Kern emigrieren und nur dann im Zytoplasma verbleiben, wenn sie mit aktivierten zytosolischen oder membranständigen Bindungspartnern interagieren. Dementsprechend könnten Proteine, wie z. B. aktivierte Integrine, EED durch direkte Interaktion an der Kern-Relokalisation hindern, wodurch es zu der beschriebenen EED-Akkumulation an der Plasmamembran kommt. TNF ist ein bekannter Integrin-Aktivator (Bouaouina et al., 2004) und in der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass Integrine ebenso wie EED für die TNF-induzierte N-SMase-Aktivierung benötigt werden. Diese Befunde führen zu folgendem Modell für die frühe nSMase2-Aktivierung durch TNF: Durch TNF-Bindung an den TNF-R1 werden Integrine aktiviert, die daraufhin zytosolisches EED binden und dessen nukleäre Relokalisation verhindern. EED kann dadurch mit dem membranständigen TNFR1·FAN·RACK1-Komplex und der nSMase2 interagieren und somit die Kaskade komplettieren sowie die nSMase2 aktivieren (s. Abb.38).

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass mindestens vier Integrin- β -Untereinheiten (ITGB1, ITGB2, ITGB5 und ITGB7) und das integrinbindende p27BBP an TNF-abhängiger nSMase2-Signaltransduktion beteiligt sind. Das an p27BBP und LAMR1 bindende ITGB4 (Biffo et al., 1997; Nelson et al., 2008) könnte ein weiteres involviertes Molekül darstellen. Auch RACK1 ist nicht nur als freies zytosolisches Protein vorhanden, sondern wird dank

Integrinbindungen ebenfalls an der Zellmembran stabilisiert (Lee et al., 2002). Alle bekannten beteiligten Proteine außer dem direkt TNF-R1-gebundenen FAN und der bereits membranassoziiert vorliegenden nSMase2 interagieren also mit Integrinen. Es ist daher davon auszugehen, dass die zytosolischen Komponenten der nSMase2-Signaltransduktion durch Integrine an der Zellmembran befestigt bzw. stabilisiert werden und dort einen Multimolekülkomplex bilden können. Bislang ist jedoch unklar, ob die beteiligten Integrine unabhängig voneinander an die verschiedenen Komponenten der Signaltransduktion binden oder ob sie zu diesem Zweck auch miteinander interagieren und dadurch ein stabilisierendes Integrincluster ausbilden. Derartige Komplexe aus verschiedenen Integrinen wurden bereits im Rahmen von Anandamid-induzierter Ca^{2+} -Signaltransduktion (unter Beteiligung von ITGB1 und ITGB5) beschrieben (Waldeck-Weiermair et al., 2008) und sind daher auch im hier behandelten Kontext denkbar.

RACK1 konnte im Gegensatz zu EED auch ohne TNF-Stimulation am TNF-R1-Komplex nachgewiesen werden. Ob p27BBP und die beteiligten Integrine ebenfalls konstitutiv als Komponenten des TNF-Rezeptor-Komplexes vorliegen, wird durch zukünftige Experimente geklärt werden. Anders als EED kolokalisierte p27BBP TNF-unabhängig mit der nSMase2 und konnte sowohl mit als auch ohne TNF-Einfluss mit RACK1 und nSMase2 koimmunpräzipitiert werden. Diese Befunde können teilweise dadurch erklärt werden, dass RACK1 und p27BBP bereits im Rahmen von verschiedenen anderen, TNF-unabhängigen Prozessen membrangebunden vorliegen und daher nicht wie EED aus dem Zellkern rekrutiert werden müssen. RACK1 bindet erwiesenermaßen an Integrine, um $\text{PKC}\alpha$ und $\text{PKC}\epsilon$ an die Membran zu rekrutieren, und p27BBP ist bereits ohne externen Stimulus als desmosomen- und hemidesmosomenassoziiert an der Zellmembran beschrieben worden (Lee et al., 2002; Besson et al., 2002; Bairati et al., 2005). Außerdem interagieren RACK1 und p27BBP auch im Rahmen von ribosomalen Prozessen im Zytosol (Ceci et al., 2003).

4.2 Die nSMase2 als mögliches Schlüsselenzym bei TNF-/Ceramidinduzierter $\text{PKC}\zeta$ -Aktivierung

Die $\text{PKC}\zeta$ gehört wie die $\text{PKC}\lambda/1$ zu den atypischen PKCs (aPKCs), die nicht durch Calcium, Diacylglycerin und Phorbolster aktiviert werden (Bezombes et al., 2002). Ihre Aufgaben in der Zelle weichen entsprechend von denen der klassischen PKCs ab. Beide aPKCs wurden wie die nSMase2 mit MAPK-Signaltransduktion in Verbindung gebracht (Berra et al., 1995;

Bjorkoy et al., 1997), die PKC ζ - und PKC $\lambda/1$ -Knockout-Mäuse weisen jedoch deutlich unterschiedliche Phänotypen auf. Während homozygote PKC $\lambda/1$ -Defizienz bereits frühembryonal letal ist, sind PKC ζ -Knockout-Mäuse zwar überlebensfähig, zeigen aber eine stark verminderte Immunantwort (Martin et al., 2002; Suzuki et al., 2003).

Da PKC ζ und PKC $\lambda/1$ eine 72-prozentige Sequenzhomologie auf Proteinebene und sogar 86% Übereinstimmung bei der Kinasedomäne aufweisen, erkennt der Großteil der verfügbaren Antikörper beide Isoformen. Außerdem führt die Inhibition mit Pseudosubstratproteinen zu einer Blockierung beider Kinasen (Stross et al., 2009). Daher war es in der Vergangenheit schwierig, bestimmte Eigenschaften eindeutig der PKC ζ zuzuschreiben. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass speziell die PKC ζ an die von SMasen generierten Ceramide bindet und dadurch aktiviert wird. Auf diese Weise interagiert PKC ζ mit Par-4, wodurch Apoptose induziert wird (Wang et al., 2005). Außerdem wurde beschrieben, dass Ceramid-induzierte PKC ζ -Aktivierung nach TNF-Stimulation detektierbar ist (Müller et al., 1995; Ramström et al., 2004). Aktivitätsminderungen sowohl der sauren als auch von neutraler SMase wurden nach PKC ζ -Überexpression beobachtet (Charruyer et al., 2007; Bezombes et al., 2002). Dieses Phänomen ist vermutlich dadurch erklärbar, dass SMase-bedingte Folgeprozesse durch unphysiologisch hohe PKC ζ -Mengen verstärkt ablaufen und die Zelle entsprechend gegenreguliert.

Die Ceramid-vermittelte PKC ζ -Aktivierung ist also höchstwahrscheinlich ein Resultat von (TNF-induzierter) SMase-Aktivierung. Welche SMase für die Produktion der PKC ζ -aktivierenden Ceramide hauptverantwortlich ist, wurde jedoch bislang nicht geklärt. In dieser Doktorarbeit wurde die PKC ζ als Bindungspartner der nSMase2 im Y2H-System identifiziert. Um in den Experimenten in humanen Zellen eine mögliche Interferenz der PKC $\lambda/1$ auszuschließen, wurden zwei PKC ζ -Antikörper verwendet, die erwiesenermaßen keine Kreuzreaktivität mit der PKC $\lambda/1$ aufweisen (Stross et al., 2009). Dadurch konnte demonstriert werden, dass die PKC ζ spezifisch mit der nSMase2 interagiert und an der Zellmembran kolokalisiert. Dies sind deutliche Indizien dafür, dass Ceramid/PKC ζ -induzierte Folgeprozesse zu einem wesentlichen Teil durch die nSMase2-Signaltransduktion vermittelt werden (s. Abb. 38). Es wurde beschrieben, dass die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 ebenso wie die Aktivierung der PKC ζ durch Ceramide an Apoptose beteiligt ist (Luberto et al., 2002; Wang et al., 2005). Daher ist es wahrscheinlich, dass die beiden Proteine auch bei diesem Prozess miteinander interagieren (s. Abb. 39).

Da die endogene PKC ζ -Proteinmenge durch die zur Verfügung stehenden, nicht validierten siRNAs in Jurkat-Zellen nicht vermindert werden konnte, bleibt bislang ungeklärt, ob die

PKC ζ auch stromaufwärts der nSMase2 von Bedeutung ist. Aufgrund der beschriebenen Interaktion dieser Kinase mit Ceramiden und da sie nicht wie EED und p27BBP mit der Signalwegskomponente RACK1 interagiert, ist jedoch davon auszugehen, dass die PKC ζ an Effektormechanismen stromabwärts der nSMase2-Aktivierung beteiligt ist.

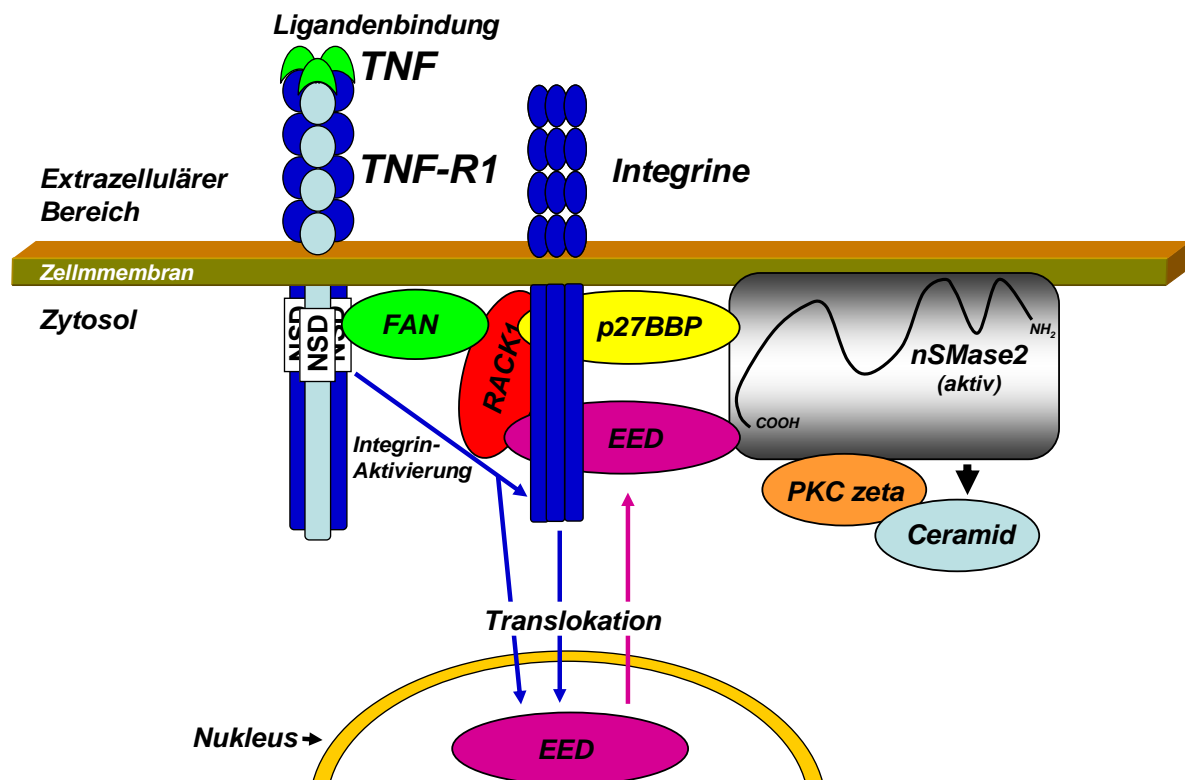


Abb. 38: Schematische Darstellung des TNF-induzierten nSMase2-Aktivierungskomplexes unter Einbeziehung der Ergebnisse dieser Arbeit. Integrine stabilisieren den aus FAN, RACK1 und p27BBP bestehenden Multimolekülkomplex zur Aktivierung der nSMase2 an der Zellmembran. Durch Bindung von TNF an TNF-R1 werden Integrine aktiviert und die EED-Translokation zum Aktivierungskomplex initiiert. Somit wird die Signaltransduktion komplettiert und die nSMase2 aktiviert. Von der nSMase2 generiertes Ceramid interagiert mit der nSMase2-gebundenen PKC ζ , um Effektormechanismen einzuleiten.

4.3 Die nSMase2 und Adhäsionskomplexe interagieren bei teilweise gegensätzlichen Prozessen im Rahmen von Proliferationsereignissen und Krebserkrankungen

Maligne Tumore zeichnen sich durch unkontrolliertes, invasives Wachstum aus, das normalerweise durch die Mechanismen der Zellzykluskontrolle verhindert wird. Bei gesunden Geweben werden die Zellen einem Zellzyklusarrest unterworfen, wenn entsprechende antiproliferative Signale vorhanden sind, beispielsweise bei Kontakt mit anderen Zellen oder Geweben (Hanahan et al., 2000; Marchesini et al., 2004).

In der T-Zelllinie Molt-4 konnte beobachtet werden, dass von neutraler SMase generierte Ceramide Zellzyklusarrest hervorrufen und das Zellzyklusarrestprotein CCA1 der Ratte stellte sich als identisch mit der humanen nSMase2 heraus (Jayadev et al., 1995; Clarke et al., 2006). Durch RNA-Interferenzstudien konnte zudem verifiziert werden, dass auch beim Menschen die nSMase2 diejenige N-SMase darstellt, welche Zellen in der G₀/G₁-Phase verbleiben lässt (Marchesini et al., 2004).

Auf welche Weise die nSMase2 an Zellzykluskontrolle beteiligt ist, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch die Wachstumsarrest induzierende Retinsäure ATRA (all-trans retinoic acid) sowohl die nSMase2-Expression als auch die Ceramidproduktion gesteigert wird (Somenzi et al., 2007). Nach Herunterregulation der nSMase2 wurde die Expression bzw. Dephosphorylierung der klassischen Zellzyklusregulatoren p21/WAF1 und RB (retinoblastoma) teilweise unterdrückt (Marchesini et al., 2004). Jüngste Studien zeigten jedoch, dass die durch ATRA erhöhte nSMase2-Expression ebenso wie experimentelle nSMase2-Überexpression zu Wachstumsarrest führt, ohne dabei Effekte auf p21/WAF1 oder RB auszuüben. Stattdessen war der beobachtete Zellzyklusarrest auf eine Inhibition der Phosphorylierung des Proliferationsfaktors S6K (ribosomal S6 kinase) durch ATRA und die nSMase2 zurückzuführen (Clarke et al., 2011c).

Aufgrund der Beteiligung der nSMase2 an der Zellzykluskontrolle wurde angenommen, dass verminderte nSMase2-Expression zur Proliferation oder Invasivität von Krebszellen führen kann. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass sich das humane nSMase2-Gen *smpd3* auf dem Chromosom 16q22.1 befindet, denn Mutationen in diesem Genomabschnitt sind bereits mit schnell voranschreitendem Krebswachstum in Verbindung gebracht worden (Marchesini et al., 2004). Cadherine sind an der Zellmembran ebenfalls in Kontaktinhibition involviert. Interessanterweise befinden sich die Gene für verschiedene Cadherine in unmittelbarer chromosomaler Nähe zu *smpd3*, weshalb von Marchesini et al. (2004) gemeinsame Transkriptionskontrollen vermutet wurden. Außerdem stellte sich kürzlich heraus, dass das an

der N-SMase-Aktivierung beteiligte RACK1 (Tcherkasowa et al., 2002) auch E-Cadherin und Catenine an Zell-Zell-Kontakten stabilisiert und dadurch die Invasivität von Dickdarmkrebszellen reduziert (Swaminathan et al., 2011).

Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern Hinweise für einen Zusammenhang von nSMase2-Signaltransduktion und weiteren membranständigen Komponenten der Proliferationskontrolle. Das p27BBP-bindende ITGB4 sowie die an nSMase2-Aktivierung beteiligten Proteine ITGB1 und ITGB2 sind als Bestandteile von Hemidesmosomen oder anderen Adhäsionsverbindungen nämlich ebenfalls an der Regulation von Zellzyklusarrest beteiligt (Morena et al., 2002; Fischer et al., 2005; Dumont et al., 1995).

Kontaktinhibition und Zellzyklusarrest durch die nSMase2 wurden in früheren Studien TNF-unabhängig bei konfluentem Zellwachstum beobachtet (Marchesini et al., 2004). Es ist daher wahrscheinlich, dass die hier untersuchten Adhäsionsmoleküle auch bei Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakt-induzierten Prozessen mit der nSMase2 interagieren. Dafür spricht auch, dass p27BBP bereits ohne TNF-Stimulation mit der nSMase2 und RACK1 koimmunpräzipitiert werden konnte. Auch das reife LAMR1 (67LR), ein weiterer in dieser Arbeit identifizierter nSMase2-Interaktor, ist Bestandteil von Hemidesmosomen und bindet an Integrine (Nelson et al., 2008). LAMR1 stellte sich als nicht essentiell für die TNF-induzierte N-SMase-Aktivierung heraus, obwohl es wie p27BBP mit RACK1 und der nSMase2 interagiert und mit der nSMase2 spezifisch im Zellmembranbereich kolokalisierte. Dies sind weitere Anzeichen für ein TNF-unabhängiges Zusammenwirken von nSMase2, p27BBP, LAMR1, RACK1, Integrinen und möglicherweise Cadherinen (s. Abb. 39).

LAMR1 stellte sich als Vermittler von EGCG (epigallocatechin-3-0-gallate) –induzierter Wachstumsinhibition von Krebszellen heraus (Umeda et al., 2008). Im direkten Gegensatz zu diesem Befund wurden jedoch in verschiedenen malignen Tumorarten erhöhte LAMR1-Expressionen diagnostiziert und eine positive Korrelation mit Invasivität und Metastasenbildung festgestellt (Givant-Horvitz et al., 2004).

LAMR1 und p27BBP sind nicht nur Bestandteile von Adhäsionskomplexen, sondern zusätzlich in ribosomale Translationsprozesse involviert. In diesem Zusammenhang stellte sich auch p27BBP als proliferationsfördernd bei Leber- und Fettgewebe heraus, indem es als Translations-Initiationsfaktor wirkt (Nelson et al., 2008; Gandin et al., 2008). Ein weiterer, noch nicht näher untersuchter Kandidat des Y2H-Screens mit der katalytischen Domäne der nSMase2 war TPT1 (tumor protein, translationally-controlled 1), welches ebenfalls an Zellproliferation beteiligt ist (Wu et al., 2009). Es ist daher denkbar, dass p27BBP, LAMR1 und eventuell TPT1 auch bei Zellteilung und –wachstum mit der nSMase2 interagieren (s.

Abb. 39). Tatsächlich ist eine Aktivierung der nSMase2 in der Vergangenheit nicht nur im Zusammenhang mit antiproliferativen Effekten und Zelltod beschrieben worden, sondern auch in Verbindung mit mitogenen Prozessen. Die nSMase2 wurde als Komponente der an Tumorwachstum beteiligten uPA-Signaltransduktion identifiziert. Dabei wurde beobachtet, dass auch die uPA-stimulierte nSMase2-Aktivierung in ECV308-Zellen mit Hilfe von Integrinen vermittelt wird. Untersucht wurde in dem Zusammenhang das Integrin α v-assoziierte ITGB3 (Maupas-Schwalm et al., 2009). Die in dieser Arbeit als Bestandteile der TNF-vermittelten N-SMase-Aktivierung identifizierten Proteine ITGB1, ITGB2 und ITGB5 sind ebenfalls in uPA-aktivierte Prozesse involviert (Alfano et al., 2009; Nalla et al., 2010; Vocca et al., 2009).

Diese drei β -Integrine und die Aktivierung der nSMase2 sind an TNF-induzierter Apoptose beteiligt (Avdi et al., 2001; Chen et al., 2007; Luberto et al., 2002), während die uPA-induzierte nSMase2-Aktivierung unter Beteiligung von Integrinen zur Zellteilung führte (Maupas-Schwalm et al., 2009). Auch die TNF-induzierte nSMase2-Aktivierung erhöhte zwar die Apoptoserate in MCF-7-Zellen, verursacht jedoch nicht grundsätzlich Zelltod, sondern ist durch Expressionssteigerung von VCAM-1 und ICAM-1 zudem an Entzündungsreaktionen beteiligt (Luberto et al., 2002; Clarke et al., 2007; s. Abb.39). Integrine werden, unter anderem durch Bindung an VCAM-1 und ICAM-1, ebenfalls für inflammatorische Prozesse benötigt (Barreiro et al., 2002; Hynes, 2002). Bislang ist nicht eindeutig geklärt, unter welchen Bedingungen die nSMase2 in diesen teilweise gegensätzlichen Prozessen partizipiert. Außerdem kann noch nicht abschließend bewertet werden, ob im Rahmen von Krebserkrankungen die proliferationsfördernden oder –hemmenden Eigenschaften der nSMase2-Signalwege überwiegen. Integrine scheinen allerdings generell wichtige Faktoren für die nSMase2-Aktivierung darzustellen und somit an den unterschiedlichen nSMase2-bedingten Effekten beteiligt zu sein (s. Abb. 39). Höchstwahrscheinlich wirken noch weitere durch TNF, uPA, ATRA oder Zellkonfluenz induzierte Faktoren an der Entscheidung der Zelle mit, welcher Folgeprozess der nSMase2-Aktivierung eingeleitet wird.

Insgesamt verleiten die genannten Befunde zur Hypothese, dass Integrine und damit assoziierte Moleküle vor allem stromaufwärts der nSMase2 eine bedeutende Rolle in den zugehörigen Signaltransduktionswegen spielen. Es ist jedoch außerdem denkbar, dass nicht nur Integrine für die nSMase2-Aktivierung benötigt werden, sondern umgekehrt auch die nSMase2 an klassischen Integrinfunktionen beteiligt sein kann. Dafür spricht, dass die nSMase2 bei Studien mit MCF-7-Zellen in TNF-induzierte Adhäsion involviert war (Clarke et al., 2007). In Experimenten mit neutrophilen Granulozyten stellte sich außerdem heraus,

dass Adhäsion durch TNF auf der Aktivierung von Integrinen, insbesondere von ITGB2, beruhte (Bouaouina et al., 2004). TNF bindet nach bisherigem Wissen nur an die TNF-Rezeptoren TNF-R1 und -R2, nicht aber an Integrine (Aggarwal, 2003), weshalb dieses Phänomen auf Inside-Out-Signalling der Integrine zurückzuführen sein muss. Ebenfalls in Neutrophilen wurde eine deutliche Zunahme von ITGB2 an der Zelloberfläche durch erhöhte Ceramidmengen beobachtet. Da es dadurch jedoch noch nicht zu verstärkter Adhäsion kam (Feldhaus et al., 2002), reicht die Aktivität der nSMase2 alleine vermutlich nicht für die Induktion von Zelladhäsion aus. Um zu klären, inwiefern die nSMase2-Signaltransduktion tatsächlich in integrinvermittelte Adhäsion involviert ist, sind weiterführende Experimente notwendig, z. B. Untersuchungen zu einer möglichen Funktion der nSMase2-aktivierenden Moleküle bei TNF-induzierter Adhäsion.

4.4 nSMase2-Signaltransduktion und HIV

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) bedient sich für seine Vermehrung auf verschiedene Weisen der molekularen Maschinerie der jeweiligen Wirtszellen und interveniert dafür in intrazelluläre Signalkaskaden, um Virusproteine zu exprimieren (Duh et al., 1998). Die Ergebnisse früherer Studien führen zu der Annahme, dass auch N-SMase-Signalwege an Prozessen im Rahmen einer HIV-Infektion beteiligt sein können. Durch Stimulierung mit dem HIV-Hüllprotein gp120 konnte beispielsweise die N-SMase-Aktivität in Neuronen gesteigert und dadurch Apoptose ausgelöst werden (Jana et al., 2004). gp120 aktivierte in HBMEC-Zellen (human brain microvascular endothelial cells) zudem die PKC ζ (Kanmogne et al., 2007), welche als bekannter Ceramid-Interaktor (Wang et al., 2005) stromabwärts der N-SMase-Aktivierung wirkt und in der vorliegenden Arbeit als direkter nSMase2-Interaktionspartner identifiziert wurde.

Bislang wurde nicht beschrieben, ob und auf welche Weise die TNF-induzierte Signaltransduktion der nSMase2 in die Abläufe dieser Viruserkrankung involviert ist. TNF-induzierte HIV-Expression in infizierten Leukozyten wurde allerdings schon vor über 20 Jahren nachgewiesen, wobei die Aktivierung von NF- κ B eine entscheidende Rolle einnimmt (Duh et al., 1989). Ein direkter Zusammenhang von HIV, TNF und SMase-Aktivität konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, denn die Inkubation mit bakterieller SMase inhibierte zwar die HIV-Infektion in der HeLa-Zelllinie TZM-bl, führte bei bereits infizierten HL-60-Monozyten jedoch zu vermehrter HIV-Produktion. Dieser Effekt konnte durch TNF-

inhibierende Antikörper unterbunden werden (Rivas et al., 1994; Finnegan et al., 2004). In der gleichen Zelllinie wurde demonstriert, dass auch ITGB2 an TNF-induzierter HIV-Replikation beteiligt ist (Shattock et al., 1996). Da ITGB2 in der vorliegenden Arbeit als Komponente der TNF-induzierten Aktivierung der nSMase2 identifiziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass auch die *in vivo* als N-SMase agierende nSMase2 selbst zur HIV-Replikation beitragen könnte.

Durch Transfektion der Gliazelllinie U251MG mit der cDNA des HIV-Proteins Nef konnte eine deutlich erhöhte TNF-induzierte SMase-Aktivität beobachtet werden (Richard et al., 1997). Welche SMase für diesen Anstieg verantwortlich war, wurde dabei jedoch nicht untersucht. Interessanterweise wurde für das am nSMase2-Signalweg beteiligte Protein RACK1 gezeigt, dass es spezifisch an Nef bindet. RACK1 und Nef kolokalisierten in HEK 293-Zellen im Bereich des Golgi-Apparats und an der Zellmembran (Gallina et al., 2001). Die nSMase2 wurde in verschiedenen Zelltypen in den gleichen Kompartimenten beschrieben (Hofmann et al., 2000; Clarke et al., 2006; Milhas et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EED und COPB1, zwei weitere Nef-bindende Proteine (Witte et al., 2004; Benichou et al., 1994), direkt mit der nSMase2 interagieren. EED translozierte in Jurkat-T-Zellen durch TNF-Stimulation vermehrt an die Zellmembran, wo es mit RACK1 und der nSMase2 in Kontakt treten konnte. In der gleichen Zellart wurde ein vergleichbarer EED-Translokationsprozess nach Nef-Transfektion beschrieben und vermutet, dass Nef ebenso wie aktivierte Integrine die nukleäre Relokalisation von EED durch direkte Interaktion verhindert (Witte et al., 2004). Durch Nef-Bindung an RACK1 und EED könnten also auch die TNF-bedingte EED-Translokation zum membranständigen nSMase2-Signaltransduktionskomplex und die nSMase2-Aktivierung verstärkt werden. Die durch Nef erhöhte extranukleäre EED-Menge wäre dann vermutlich mitverantwortlich für die beschriebene gesteigerte TNF-bedingte SMase-Aktivität in U251MG-Zellen. Durch Experimente aus dieser Doktorarbeit konnte allerdings demonstriert werden, dass konstitutiv membranständiges EED alleine nicht die nSMase2-Aktivierung verstärkt. Es müssen also noch andere Faktoren auf die Signalkaskade einwirken. Die oben erwähnte Beteiligung von ITGB2 an TNF-induzierter HIV-Replikation lässt vermuten, dass die Interaktion von EED, RACK1 oder anderen Signalwegskomponenten mit aktivierten Integrinen auch für eine Nef-induzierte Aktivierung der nSMase2 ausschlaggebend sein könnte (s. Abb. 39). Demnach muss durch weitere Experimente geklärt werden, ob TNF-induzierte HIV-Replikation durch die nSMase2-Signaltransduktion vermittelt wird.

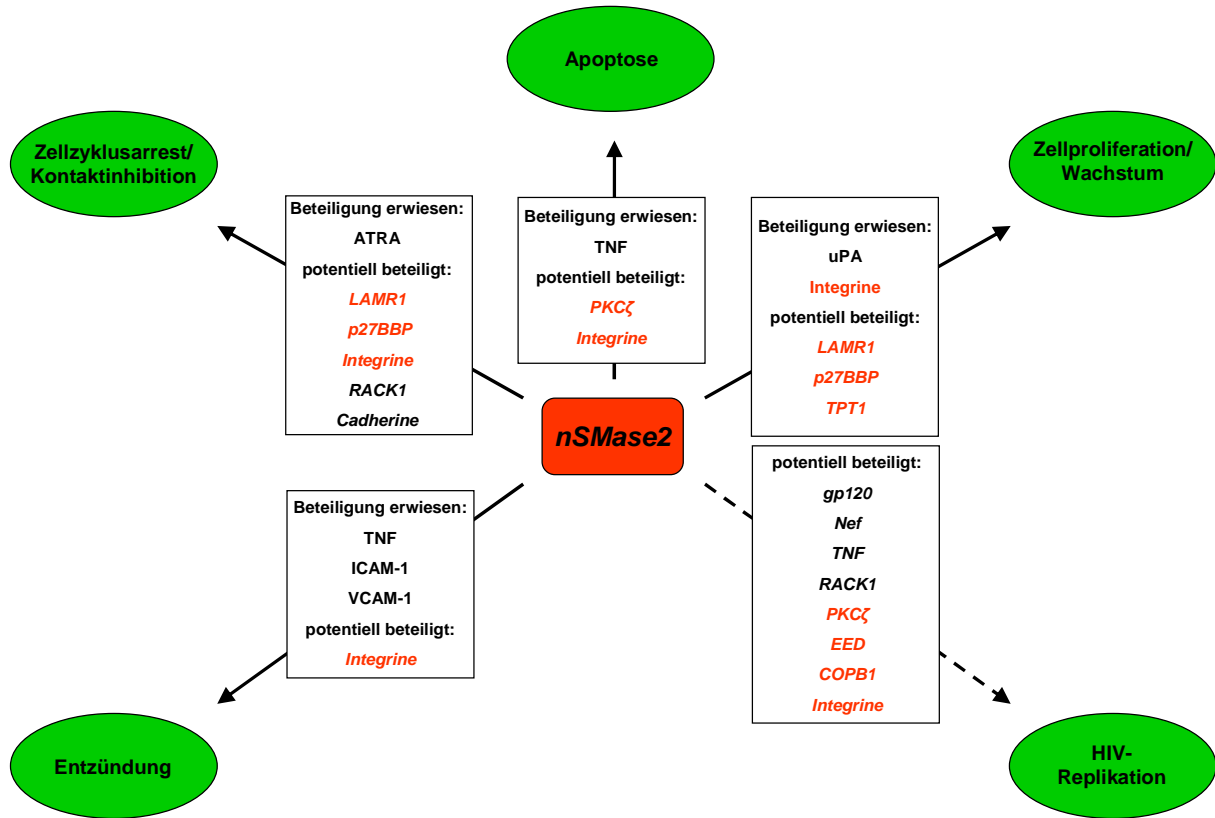


Abb. 39: nSMase2-Signaltransduktion ist an verschiedenen, teilweise gegensätzlichen Prozessen beteiligt. Die Aktivierung der nSMase2 führt je nach externem Stimulus (ATRA, TNF, uPA) zu Apoptose, Zellzyklusarrest/Kontaktinhibition, Zellproliferation/Wachstum oder Entzündung. Außerdem ist die nSMase2-Signaltransduktion eventuell an HIV-Replikation beteiligt. Rote Schrift kennzeichnet an Effektormechanismen beteiligte Moleküle, die in dieser Arbeit als nSMase2-Interaktoren und/oder als Komponenten der nSMase2-Signaltransduktion identifiziert wurden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die durch TNF aktivierbare Lipase neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase2) ist an Entzündungsreaktionen, Entwicklung, Wachstum, Zellzyklusarrest und Zelltod ebenso beteiligt wie an der Alzheimerschen Krankheit, Arteriosklerose oder kombinierter Hypophysenhormondefizienz.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten weitere Komponenten der bislang unvollständig verstandenen nSMase2-Signaltransduktion identifiziert werden. Das Polycomb-Group-Protein EED stellte sich als das letzte fehlende Glied in der TNF-abhängigen nSMase2-Aktivierungskaskade und als essentiell für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 heraus. EED translozierte in humanen Zellen nach TNF-Stimulation an die Plasmamembran, wo es die nSMase2 durch direkte Interaktion mit RACK1 und mit der nSMase2 zum TNF-R1·FAN·RACK1-Komplex rekrutierte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Integrin- β -Untereinheiten ITGB1, ITGB2, ITGB5 und ITGB7 ebenfalls essentielle Komponenten der TNF-induzierten nSMase2-Aktivierung darstellen. Durch Yeast Two-Hybrid Screens mit der vollständigen nSMase2 und einzelnen Domänen des Enzyms als Köderproteine wurden 31 Beuteproteine identifiziert, die in der Hefe spezifisch mit der katalytischen Domäne der nSMase2 interagierten. Für die Kandidaten p27BBP, LAMR1, PKC ζ und COPB1 wurde die Interaktion mit der vollständigen nSMase2 sowohl in der Hefe als auch in humanen Zellen verifiziert. p27BBP und LAMR1 interagierten zudem mit RACK1, wodurch sie zu weiteren potentiellen Komponenten der Signaltransduktion vom TNF-R1 zur nSMase2 wurden. In Bezug auf p27BBP konnte diese These bestätigt werden, da die nSMase2 nach Herunterregulation von p27BBP durch RNA-Interferenz nicht mehr durch TNF aktiviert werden konnte, während sich LAMR1 und COPB1 als nicht essentiell für die TNF-induzierte Aktivierung der nSMase2 herausstellten. Zukünftige Studien werden zeigen, ob LAMR1, PKC ζ , COPB1 oder die übrigen 27 Kandidaten der Y2H-Screens für Prozesse stromabwärts der nSMase2-Aktivierung benötigt werden, wie nSMase2-induzierte Apoptose, Entzündung, Proliferationskontrolle, HIV-Replikation oder TNF-Integrin-vermittelte Zelladhäsion. Ferner kann nun analysiert werden, ob im Umkehrschluss die nSMase2 zu den bislang bekannten Funktionen ihrer neu identifizierten Interaktionspartner beiträgt.

6. Summary and perspectives

The lipase neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) can be activated by TNF and participates in inflammation, development, growth, cell cycle arrest and cell death as well as in Alzheimer's disease, atherosclerosis and combined pituitary hormone deficiency.

During the present doctoral thesis new components of the nSMase2 signal transduction could be discovered. The polycomb group protein EED turned out to be the final missing link of the nSMase2 activating cascade initiated by TNF. EED was essential for TNF-induced nSMase2 activation. Following TNF stimulation, EED translocated to the plasma membrane in order to recruit nSMase2 to the TNF-R1·FAN·RACK1 complex due to direct interaction of EED with RACK1 and nSMase2. In addition, it could be demonstrated that the integrin β subunits ITGB1, ITGB2, ITGB5 and ITGB7 represent further essential components of the TNF-induced nSMase2 activation. By yeast two-hybrid screens using the full length nSMase2 as well as the enzyme's single domains as bait proteins, 31 prey proteins specifically interacting with the nSMase2 catalytic domain were identified. The interaction of the candidates p27BBP, LAMR1, PKC ζ and COPB1 with the full length nSMase2 could be verified in both, yeast and human cells. Additionally, p27BBP and LAMR1 interacted with RACK1, thus becoming further potential components of the signal transduction from TNF-R1 to nSMase2. This hypothesis could be confirmed for p27BBP, as p27BBP down-regulation by RNA interference resulted in abrogation of the TNF-induced nSMase2 activation, whereas LAMR1 and COPB1 turned out to be not essential for nSMase2 activation. Future studies will reveal whether LAMR1, PKC ζ , COPB1 or the other 27 candidates of the yeast two-hybrid screens are required for processes downstream of nSMase2 activation such as nSMase2-induced apoptosis, inflammation, proliferational control, HIV replication or TNF-integrin-mediated cell adhesion. Furthermore, it can now be analysed whether nSMase2 participates in the known functions of its new-identified interaction partners.

7. Literaturverzeichnis

Adam D., Wiegmann K., Adam-Klages S., Ruff A., Krönke 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., Krönke M. (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**:937-947.

Aggarwal B. B., Shishodia S., Ashikawa K., Bharti A. C. (2002) The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **1**:327-341.

Aggarwal B. B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756.

Alfano M., Mariani S. A., Elia C., Pardi R., Blasi F., Poli G. (2009) Ligand-engaged urokinase-type plasminogen activator receptor and activation of the CD11b/CD18 integrin inhibit late events of HIV expression in monocytic cells. *Blood* **113**:1699-1709.

Avdi N. J., Nick J. A., Whitlock B. B., Billstrom M. A., Henson P. M., Johnson G. L., Worthen G. S. (2001) Tumor necrosis factor-alpha activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway in human neutrophils. Integrin involvement in a pathway leading from cytoplasmic tyrosine kinases apoptosis. *J Biol Chem* **19**;276:2189-2199.

Bairati A., Biffo S., Corbetta S., Sala L. A. (2005) Immunocytochemical localization of protein p27BBP in human skin and invertebrate (*Sepia officinalis*) integument. *Cell Tissue Res* **321**:115-121

Barreiro O., Yanez-Mo M., Serrador J. M., Montoya M. C., Vicente-Manzanares M., Tejedor R., Furthmayr H., Sanchez-Madrid F. (2002) Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol* **157**:1233-1245

Benichou S., Bomsel M., Bodéus M., Durand H., Douté M., Letourneur F., Camonis J., Benarous R. (1994) Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem* **269**:30073-30076.

Besson A., Wilson T. L., Yong V. W. (2002) The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility. *J Biol Chem* **277**:22073-22084.

Bezombes C., de Thonel A., Apostolou A., Louat T., Jaffrézou J. P., Laurent G., Quillet-Mary A. (2002) Overexpression of protein kinase C ζ confers protection against antileukemic drugs by inhibiting the redox-dependent sphingomyelinase activation. *Mol Pharmacol* **62**:1446-1455.

Literaturverzeichnis

- Biffo S., Sanvito F., Costa S., Preve L., Pignatelli R., Spinardi L., Marchisio P. C. (1997) Isolation of a novel beta4 integrin-binding protein (p27(BBP)) highly expressed in epithelial cells. *J Biol Chem* **272**:30314-30321.
- Bouaouina M., Blouin E., Halbwachs-Mecarelli L., Lesavre P., Rieu P. (2004) TNF-induced beta2 integrin activation involves Src kinases and a redox-regulated activation of p38 MAPK. *J Immunol* **173**:1313-1320.
- Brent R., Ptashne M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**:729-736.
- Bruns P. (1887) Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste. *Beitr Klin Chir* **3**, 443-446
- Ceci M., Gaviraghi C., Gorrini C., Sala L. A., Offenhäuser N., Marchisio P. C., Biffo S. (2003) Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* **426**:579-584.
- Charruyer A., Jean C., Colomba A., Jaffrézou J. P., Quillet-Mary A., Laurent G., Bezombes C. (2007) PKCzeta protects against UV-C-induced apoptosis by inhibiting acid sphingomyelinase-dependent ceramide production. *Biochem J* **405**:77-83.
- Chen C. C., Young J. L., Monzon R. I., Chen N., Todorović V., Lau L. F. (2007) Cytotoxicity of TNFalpha is regulated by integrin-mediated matrix signalling. *EMBO J* **26**:1257-1267.
- Clarke C. J., Snook C. F., Tani M., Matmati N., Marchesini N., Hannun Y. A. (2006) The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* **45**:11247-11256.
- Clarke C. J., Truong T. G., Hannun Y. A. (2007) Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *J Biol Chem* **282**:1384-1396.
- Clarke C. J., Wu B. X., Hannun Y. A. (2011a) The neutral sphingomyelinase family: Identifying biochemical connections. *Adv Enzyme Regul* **51**:51-58.
- Clarke C. J., Cloessner E. A., Roddy P. L., Hannun Y. A. (2011b) Neutral Sphingomyelinase-2 (nSMase2) is the Primary Neutral Sphingomyelinase Isoform Activated by Tumor Necrosis Factor- α in MCF-7 cells. *Biochem J* **435**:381-390.
- Clarke C. J., Mediwala K., Jenkins R. W., Sutton C. A., Tholanikunnel B. G., Hannun Y. A. (2011c) Neutral sphingomyelinase-2 mediates growth arrest by retinoic acid through modulation of ribosomal S6 kinase. *J Biol Chem* **286**:21565-21576.
- Coley W. B. (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas; with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* **105**:487-511.
- Coley W. B. (1896) The therapeutic value of mixed toxins of the streptococcus of erysipelas in the treatment of inoperable malignant tumors, with a report of 100 cases. *Am J Med Sci* **112**:251-281.

Literaturverzeichnis

- De Palma C., Meacci E., Perrotta C., Bruni P., Clementi E. (2006) Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:99-105.
- Duan R. D., Nyberg L., Nilsson A. (1995) Alkaline sphingomyelinase activity in rat gastrointestinal tract: distribution and characteristics. *Biochim Biophys Acta*. **1259**(1):49-55.
- 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.
- 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.
- Dumont F. J., Fischer P., Sirotina A. (1995) Increased LFA-1-mediated homotypic cell adhesion is associated with the G1 growth arrest induced by rapamycin in a T cell lymphoma. *Exp Cell Res* **219**:146-158.
- Fenton R. A., Komatsu S., Ikebe M., Shea L. G., Dobson J. G. Jr. (2009) Adenoprotection of the heart involves phospholipase C-induced activation and translocation of PKC-epsilon to RACK2 in adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**:H718-725.
- Feldhaus M. J., Weyrich A. S., Zimmerman G. A., McIntyre T. M. (2002) Ceramide generation in situ alters leukocyte cytoskeletal organization and beta 2-integrin function and causes complete degranulation. *J Biol Chem* **277**:4285-4293.
- Filla M. S., Woods A., Kaufman P. L., Peters D. M. (2006) Beta1 and beta3 integrins cooperate to induce syndecan-4-containing cross-linked actin networks in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:1956-1967.
- Finnegan C. M., Rawat S. S., Puri A., Wang J. M., Ruscetti F. W., Blumenthal R. (2004) Ceramide, a target for antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15452-15457.
- Fischer C., Sanchez-Ruderisch H., Welzel M., Wiedenmann B., Sakai T., André S., Gabius H. J., Khachigian L., Detjen K. M., Rosewicz S. (2005) Galectin-1 interacts with the {alpha}5{beta}1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem* **280**:37266-37277.
- 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.
- Gardam M. A., Keystone E. C., Menzies R., Manners S., Skamene E., Long R., Vinh D. C. (2003) Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis* **3**:148-155.
- Gassert E., Avota E., Harms H., Krohne G., Gulbins E., Schneider-Schaulies S. (2009) Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. *PLoS Pathog* **5**:e1000623.

Literaturverzeichnis

- Givant-Horwitz V., Davidson B., Reich R. (2004) Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor. *Cancer Res* **64**:3572-3579.
- Gyuris J., Golemis E., Chertkov H., Brent R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**:791-803.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Hannun Y. A., Obeid L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:139-150.
- Hayashi Y., Kiyono T., Fujita M., Ishibashi M. (1997) cca1 is required for formation of growth-arrested confluent monolayer of rat 3Y1 cells. *J Biol Chem* **272**:18082-18086.
- 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.
- Hynes R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**:673-687.
- Jin Y. J., Park I., Hong I. K., Byun H. J., Choi J., Kim Y. M., Lee H. (2011) Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin $\alpha(5)\beta(1)/\alpha(v)\beta(3)$ -dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Signal* **23**:125-134.
- Koulich E., Li X., DeMartino G. N. (2008) Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell* **19**:1072-1082.
- Kuzmichev A., Jenuwein T., Tempst P., Reinberg D. (2004) Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* **14**:183-193.
- Kreder D., Krut O., Adam-Klages S., Wiegmann K., Scherer G., Plitz T., Jensen J. M., Proksch E., Steinmann J., Pfeffer K., Krönke M. (1999) Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J* **18**:2472-2479.
- Krut O., Wiegmann K., Kashkar H., Yazdanpanah B., Krönke M. (2006) Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J Biol Chem* **281**:13784-13793.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lee H. S., Millward-Sadler S. J., Wright M. O., Nuki G., Al-Jamal R., Salter D. M. (2002) Activation of Integrin-RACK1/PKC α signalling in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Osteoarthritis Cartilage* **10**:890-897.
- 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.

- Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**:487-501.
- Luberto C., Hassler D. F., Signorelli P., Okamoto Y., Sawai H., Boros E., Hazen-Martin D. J., Obeid L. M., Hannun Y. A., Smith G. K. (2002) Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **277**:41128-41139.
- 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**(13):13775-13783.
- Marchesini N., Osta W., Bielawski J., Luberto C., Obeid L. M., Hannun Y. A. (2004) Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells. *J Biol Chem* **279**:25101-25111.
- Maupas-Schwalm F., Bedel A., Augé N., Grazide M. H., Mucher E., Thiers J. C., Salvayre R., Nègre-Salvayre A. (2009) Integrin $\alpha(v)\beta(3)$, metalloproteinases, and sphingomyelinase-2 mediate urokinase mitogenic effect. *Cell Signal* **21**:1925-1934.
- Milhas D., Clarke C. J., Hannun Y. A. (2009) Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett* **584**:1887-1894.
- Möhlig H, Mathieu S, Thon L, Frederiksen MC, Ward DM, Kaplan J, Schütze S, Kabelitz D, Adam D. (2007) The WD repeat protein FAN regulates lysosome size independent from abnormal downregulation/membrane recruitment of protein kinase C. *Exp Cell Res* **313**:2703-2718.
- Montfort A., de Badts B., Douin-Echinard V., Martin P. G., Iacovoni J., Nevoit C., Therville N., Garcia V., Bertrand M. A., Bessières M. H., Trombe M. C., Levade T., Benoist H., Ségui B. (2009) FAN stimulates TNF(α)-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *J Immunol* **183**:5369-5378.
- Morena A., Riccioni S., Marchetti A., Polcini A. T., Mercurio A. M., Blandino G., Sacchi A., Falcioni R. (2002) Expression of the beta 4 integrin subunit induces monocytic differentiation of 32D/v-Abl cells. *Blood* **100**:96-106.
- Moss M. L., Jin S. L., Milla M. E., Bickett D. M., Burkhart W., Carter H. L., Chen W. J., et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature* **385**:733-736.
- Myung S. J., Yoon J. H., Kim B. H., Lee J. H., Jung E. U., Lee H. S. (2009) Heat shock protein 90 inhibitor induces apoptosis and attenuates activation of hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* **330**:276-282.
- Nalla A. K., Asuthkar S., Bhoopathi P., Gujrati M., Dinh D. H., Rao J. S. (2010) Suppression of uPAR retards radiation-induced invasion and migration mediated by integrin β 1/FAK signaling in medulloblastoma. *PLoS One* **5**:e13006.

- Nelson J., McFerran N. V., Pivato G., Chambers E., Doherty C., Steele D., Timson D. J. (2008) The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci Rep* **28**:33-48.
- Neumeyer J., Hallas C., Merkel O., Winoto-Morbach S., Jakob M., Thon L., Adam D., Schneider-Brachert W., Schütze S. (2006) TNF-receptor I defective in internalization allows for cell death through activation of neutral sphingomyelinase. *Exp Cell Res* **312**:2142-53.
- Nielsen A. L., Oulad-Abdelghani M., Ortiz J. A., Remboutsika E., Chambon P., Losson R. (2001) Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* **7**:729-739.
- 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.
- Oprins A., Duden R., Kreis T. E., Geuze H. J., Slot J. W. (1993) Beta-COP localizes mainly to the cis-Golgi side in exocrine pancreas. *J Cell Biol* **121**:49-59.
- Paulsson K. M., Kleijmeer M. J., Griffith J., Jevon M., Chen S., Anderson P. O., Sjogren H. O., Li S., Wang P. (2002) Association of tapasin and COPI provides a mechanism for the retrograde transport of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **277**:18266-18271.
- Pennica D., Nedwin G. E., Hayflick J. S., Seeburg P. H., Derynck R., Palladino M. A., Kohr W. J., Aggarwal B. B., Goeddel D. V. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**:724-729.
- Peytavi R., Hong S. S., Gay B., d'Angeac A. D., Selig L., Bénichou S., Benarous R., Boulanger P. (1999) HEED, the product of the human homolog of the murine eed gene, binds to the matrix protein of HIV-1. *J Biol Chem* **274**:1635-1645.
- Philipp S., Puchert M., Adam-Klages S., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Mathieu S., Deerberg A., Kolker L., Marchesini N., Kabelitz D., Hannun Y. A., Schütze S., Adam D. (2010) The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:1112-1117.
- Ramgolam V. S., DeGregorio S. D., Rao G. K., Collinge M., Subaran S. S., Markovic-Plese S., Pardi R., Bender J. R. (2010) T cell LFA-1 engagement induces HuR-dependent cytokine mRNA stabilization through a Vav-1, Rac1/2, p38MAPK and MKK3 signaling cascade. *PLoS One* **5**:e14450.
- Ramström C., Chapman H., Ekokoski E., Tuominen R. K., Pasternack M., Törnquist K. (2004) Tumor necrosis factor alpha and ceramide depolarise the resting membrane potential of thyroid FRTL-5 cells via a protein kinase Czeta-dependent regulation of K⁺ channels. *Cell Signal* **16**:1417-1424.
- Richard A., Robichaud G., Lapointe R., Bourgoin S., Darveau A., Poulin L. (1997) Interference of HIV-1 Nef in the sphingomyelin transduction pathway activated by tumour necrosis factor-alpha in human glial cells. *AIDS* **11**:F1-7.

Literaturverzeichnis

- Rietzler M., Bittner M., Kolanus W., Schuster A., Holzmann B. (1998) The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *J Biol Chem* 1998 **273**:27459-27466.
- Rivas C. I., Golde D. W., Vera J. C., Kolesnick R. N. (1994) Involvement of the sphingomyelin pathway in autocrine tumor necrosis factor signaling for human immunodeficiency virus production in chronically infected HL-60 cells. *Blood* **83**:2191-2197.
- Romanov V., Sobel M. E., Pinto da Silva P., Menard S., Castronovo V. (1994) Cell localization and redistribution of the 67 kD laminin receptor and alpha 6 beta 1 integrin subunits in response to laminin stimulation: an immunogold electron microscopy study. *Cell Adhes Commun* **2**:201-209.
- Ross D., Joyner W. L. (1997) Resting distribution and stimulated translocation of protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta in response to bradykinin and TNF in human endothelial cells. *Endothelium* **5**:321-332.
- Salama R. H., Muramatsu H., Zou K., Inui T., Kimura T., Muramatsu T. (2001) Midkine binds to 37-kDa laminin binding protein precursor, leading to nuclear transport of the complex. *Exp Cell Res* **15**:270:13-20.
- Sanvito F., Piatti S., Villa A., Bossi M., Lucchini G., Marchisio P. C., Biffo S. (1999) The beta4 integrin interactor p27(BBP/eIF6) is an essential nuclear matrix protein involved in 60S ribosomal subunit assembly. *J Cell Biol* **144**:823-837.
- Sato M., Kinoshita K., Kaneda Y., Saeki Y., Iwamatsu A., Tanaka K. (1996) Analysis of nuclear localization of laminin binding protein precursor p40 (LBP/p40). *Biochem Biophys Res Commun* **229**:896-901.
- Sato T., Yamochi T., Yamochi T., Aytac U., Ohnuma K., McKee K. S., Morimoto C., Dang N. H. (2005) CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin beta1, adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaplastic large cell lymphoma Karpas 299. *Cancer Res* **65**:6950-6956.
- Sauvageau M., Sauvageau G. (2008) Polycomb group genes: keeping stem cell activity in balance. *PLoS Biol* **6**:e113.
- 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
- Schissel S. L., Keesler G. A., Schuchman E. H., Williams K. J., Tabas I. (1998) The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem* **273**:18250-18259.
- Schneider P. B., Kennedy E. P. (1967) Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease. *J Lipid Res* **8**:202-209.

- Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, Mentlein R, Kabelitz D, Schütze S. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* **21**:415-428.
- Shattil S. J., Kim C., Ginsberg M. H. (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:288-300.
- Shattock R. J., Rizzardi G. P., Hayes P., Griffin G. E. (1996) Engagement of adhesion molecules (CD18, CD11a, CD45, CD44, and CD58) enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in monocytic cells through a tumor necrosis factor-modulated pathway. *J Infect Dis* **174**:54-62.
- Simon J. A., Kingston R. E. (2009) Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:697-708.
- Sitrin R. G., Sassanella T. M., Petty H. R. (2011) An obligate role for membrane-associated neutral sphingomyelinase activity in orienting chemotactic migration of human neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**:205-212.
- 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.
- Somenzi G., Sala G., Rossetti S., Ren M., Ghidoni R., Sacchi N. (2007) Disruption of retinoic acid receptor alpha reveals the growth promoter face of retinoic acid. *PLoS One* **2**:e836.
- Stoffel W., Jenke B., Blöck 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.
- Stross C, Keitel V, Winands E, Häussinger D, Kubitz R. Expression and localization of atypical PKC isoforms in liver parenchymal cells. *Biol Chem* **390**:235-244.
- Su I. H., Dobenecker M. W., Dickinson E., Oser M., Basavaraj A., Marqueron R., Viale A., Reinberg D., Wülfing C., Tarakhovsky A. (2005) Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* **121**:425-36.
- Sullivan B. M., Harrison-Lavoie K. J., Marshansky V., Lin H. Y., Kehrl J. H., Ausiello D. A., Brown D., Druey K. M. (2000) RGS4 and RGS2 bind coatamer and inhibit COPI association with Golgi membranes and intracellular transport. *Mol Biol Cell* **11**:3155-3168.
- Swaminathan G., Cartwright C. A. (2011) Rack1 promotes epithelial cell-cell adhesion by regulating E-cadherin endocytosis. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2011.242. [Epub ahead of print]
- Tang P., Hung M-C., Klostergaard J. (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* **35**:8216-8225.

- Tcherkasowa A. E., Adam-Klages S., Kruse M. L., Wiegmann K., Mathieu S., Kolanus W., Krönke 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.
- Travali S., Ku D. H., Rizzo M. G., Ottavio L., Baserga R., Calabretta B. (1989) Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* **264**:7466-7472.
- Umeda D., Yano S., Yamada K., Tachibana H. (2008) Involvement of 67-kDa laminin receptor-mediated myosin phosphatase activation in antiproliferative effect of epigallocatechin-3-O-gallate at a physiological concentration on Caco-2 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **371**:172-176.
- Vocca I., Franco P., Alfano D., Votta G., Carriero M. V., Estrada Y., Caputi M., Netti P. A., Ossowski L., Stoppelli M. P. (2009) Inhibition of migration and invasion of carcinoma cells by urokinase-derived antagonists of alphavbeta5 integrin activation. *Int J Cancer* **124**:316-325.
- Wajant H. (2003) Death receptors. *Essays Biochem.* **39**:53-71.
- Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**:45-65
- Waldeck-Weiermair M., Zoratti C., Osibow K., Balenga N., Goessnitzer E., Waldhoer M., Malli R., Graier W.F. (2008) Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* **121**:1704-1717.
- Wang G., Silva J., Krishnamurthy K., Tran E., Condie B. G., Bieberich E. (2005) Direct binding to ceramide activates protein kinase Czeta before the formation of a pro-apoptotic complex with PAR-4 in differentiating stem cells. *J Biol Chem* **280**:26415-26424.
- Williams T. W., Granger G. A. (1968) Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* **219**:1076-1077.
- Williams S. A., Chen L. F., Kwon H., Fenard D., Bisgrove D., Verdin E., Greene W. C. (2004) Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem* **279**:42008-42017.
- Witte V., Laffert B., Rosorius O., Lischka P., Blume K., Galler G., Stilper A., Willbold D., D'Aloja P., Sixt M., Kolanus J., Ott M., Kolanus W., Schuler G., Baur A. S. (2004) HIV-1 Nef mimics an integrin receptor signal that recruits the polycomb group protein Eed to the plasma membrane. *Mol Cell* **13**:179-190.
- Wu P. S., Yang C. Y., Yen J. J., Chou C. H., Chen S. H., Wang C. K., Lai Y. G., Liao N. S., Yang-Yen H. F. (2009) Critical roles of translationally controlled tumor protein in the homeostasis and TCR-mediated proliferation of peripheral T cells. *J Immunol* **183**:2373-2381.
- Yamada A., Tsukagoshi N., Udaka S., Sasaki T., Makino S., Nakamura S., Little C., Tomita M., Ikezawa H. (1988) Nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of the gene coding for sphingomyelinase of Bacillus cereus. *Eur J Biochem* **175**:213-220.

Literaturverzeichnis

Jayadev S., Liu B, Bielawska A. E, Lee J. Y., Nazaire F., Pushkareva M. Yu., Obeid L. M., Hannun Y. A. (1995) Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* **270**:2047-2052.

Zeidan Y. H., Hannun Y. A. (2007) Translational aspects of sphingolipid metabolism. *Trends Mol Med* **13**:327-36.

Zumbansen M. (2001) Biochemische und molekularbiologische Studien zur Charakterisierung der murinen neutralen Sphingomyelinase *in vitro* und *in vivo*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

Philipp S.*, Puchert M.*, Adam-Klages S., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Mathieu S., Deerberg A., Kolker L., Marchesini N., Kabelitz D., Hannun Y. A., Schütze S., Adam D. (2010) The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:1112-1117.

* Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zur Publikation bei.

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dieter Kabelitz, Direktor am Institut für Immunologie der CAU Kiel, für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dieter Adam für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas, die sehr engagierte und intensive Betreuung sowie für all die fachlichen Ratschläge und Gespräche, die maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Supandi Winoto-Morbach für die Durchführung von N-SMase-Aktivitätsmessungen und Sabine Mathieu für die großartige Unterstützung im Laboralltag.

Dem Rest meiner Arbeitsgruppe und den übrigen Kollegen danke ich für ein sehr konstruktives und freundschaftliches Arbeitsklima, das mich den Arbeitsalltag am Institut in sehr positiver Erinnerung behalten lässt.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester, die mir in allen Situationen eine immense Unterstützung waren und sind, sowie meiner Partnerin Judith für ihre Liebe und Verbundenheit.

Lebenslauf

Name:	Malte Puchert
Adresse:	Maßmannstraße 15 24118 Kiel
Geburtsdatum:	20.05.1981
Geburtsort:	Lübeck
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Allgemeine Hochschulreife, Thomas-Mann-Schule, Lübeck	Juni 2000
Zivildienst in der Chirurgie des Universitätsklinikums Lübeck	August 2000 bis Juni 2001
Biologiestudium (Diplomstudiengang) an der CAU Kiel	Oktober 2001 bis März 2008
Studentische Hilfskraft an der CAU Kiel	März 2003 bis Mai 2003; Mai 2005 bis Dezember 2005; Januar 2007; April/Mai 2007
Abschluss des Studiums als Diplom-Biologe	März 2008
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zoologischen Institut der CAU Kiel	April 2008 bis Mai 2008
Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Immunologie der CAU Kiel	Seit Juni 2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die wissenschaftliche Abhandlung mit dem Titel „Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der N-SMase-Signaltransduktion“ selbständig – abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Betreuer Professor Dr. Dieter Adam – und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Abhandlung ist nach Form und Inhalt die eigene Arbeit. Diese Dissertation wurde an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt und ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen. Ein Teil der Daten dieser Dissertation wurde bereits publiziert in: Philipp und Puchert et al., 2010 (s. Seite 125). Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Ort, Datum

Malte Puchert

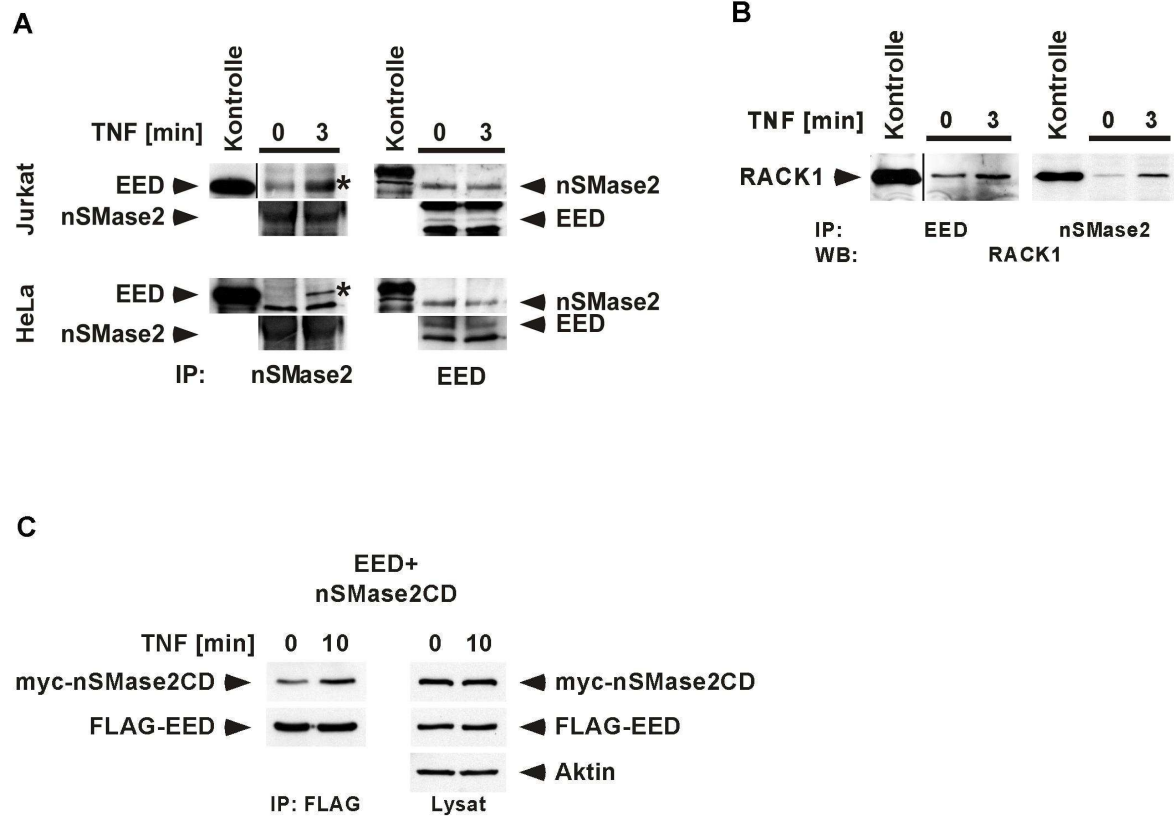
Anhang

Abb. Z1: EED, nSMase2 und RACK1 können nach TNF-Stimulation verstärkt miteinander koimmunpräzipitiert werden. IP: Immunpräzipitation; WB: Western Blot. A: Koimmunpräzipitationen von endogenem EED mit endogener nSMase2 und vice versa aus unbehandelten und aus 3 min. mit TNF stimulierten Jurkat- bzw. HeLa-Zellen. Koimmunpräzipitierte Proteine wurden durch Western Blot detektiert. pFLAG-CMV2.EED₂₋₄₄₁ bzw. pMYC.nSMase2 (erkennbar etwas oberhalb der endogenen nSMase2) überexprimierende 293-Zelllysate dienten als Positivkontrolle, die Darstellung der immunpräzipitierten Proteine als Ladekontrolle. B: Die Jurkat-Immunpräzipitate aus (A) wurden auf koimmunpräzipitiertes RACK1 hin überprüft. Endogenes RACK1 aus 293-Zelllysaten diente als Kontrolle. C: pFLAG-CMV2.EED₂₋₄₄₁ und pMYC.nSMase2₃₁₈₋₆₅₅ (nSMase2CD) überexprimierende 293-Zellen wurden für 0 und 10 min. mit TNF stimuliert. FLAG-EED wurde immunpräzipitiert und ebenso wie koimmunpräzipitierte myc-nSMase2CD durch Western Blot detektiert. Lysate aus unbehandelten und TNF-behandelten Zellen wurden auf gleiche Expression beider Proteine hin überprüft, mit Aktin-Detektion als Ladekontrolle. Diese Experimente wurden von Sabine Mathieu, Institut für Immunologie der CAU Kiel, durchgeführt.

