



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Institut für Klinische Chemie
Klinikum rechts der Isar

NF- κ B Aktivierung durch Wachstumsfaktortyrosinkinasen

Stephanie Eva-Maria Lippl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland
2. Univ.-Prof. Dr. T. Misgeld

Die Dissertation wurde am 10.01.2014 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.07.2014 angenommen.

"The process of scientific discovery is, in effect, a continual flight from wonder."

by Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Der Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappa B.....	5
1.1.1	Funktion und Aufbau von NF-κB.....	5
1.1.2	Der klassische Aktivierungsweg von NF-κB.....	6
1.1.3	Der alternative Aktivierungsweg von NF-κB.....	6
1.1.4	Die Regulationsmechanismen der NF-κB-Aktivierung.....	7
1.1.4.1	Regulationsmechanismen des kanonischen Aktivierungswegs.....	8
1.1.4.2	Regulationsmechanismen des nicht-kanonischen Aktivierungswegs.....	10
1.1.5	Dysregulation von NF-κB und dessen Folgen.....	12
1.2	Malt1 und Bcl10.....	13
1.2.1	Aufbau und Funktion von Bcl10.....	13
1.2.2	Aufbau und Funktion von Malt1.....	14
1.2.3	Die Bedeutung von Bcl10/Malt1 in lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen.....	15
1.2.3.1	T-Zell Rezeptor vermittelte NF-κB-Aktivierung.....	15
1.2.3.2	B-Zell Rezeptor vermittelte NF-κB-Aktivierung.....	16
1.3	Rezeptortyrosinkinasen.....	18
1.3.1	Aufbau und Funktionsweise von Rezeptortyrosinkinasen.....	18
1.3.2	Epidermal growth factor Rezeptor.....	19
1.3.3	Platelet-derived growth factor Rezeptor.....	21
1.3.4	Fibroblast growth factor Rezeptor.....	25
1.4	Problemstellung.....	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Materialien.....	28
2.1.1	Standardgeräte.....	28
2.1.2	Chemikalien und biogene Substanzen.....	29
2.1.3	Standardlösungen und Puffer.....	30
2.1.4	Zellen.....	32
2.1.5	Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	33
2.1.6	Antikörper.....	33
2.1.7	Enzyme.....	34
2.1.8	Oligonukleotide.....	34
2.1.9	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine.....	34
2.1.10	Molekularbiologische Kitsysteme.....	34
2.1.11	Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.12	Verwendete Software.....	35
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Haltung und Zucht der Mäuse.....	36
2.2.2	Zellkultur.....	36
2.2.2.1	Generierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs).....	36
2.2.2.2	Kultur und Passagierung primärer MEFs.....	37
2.2.2.3	Zellkultur und Passagierung von Phoenixzellen.....	37
2.2.2.4	Einfrieren.....	38
2.2.2.5	Auftauen.....	38
2.2.2.6	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung.....	38
2.2.2.7	Retrovirale Infektion von MEFs.....	39
2.2.3	Stimulationsexperimente.....	39
2.2.3.1	Stimulation der MEFs mit Wachstumsfaktoren.....	39
2.2.3.2	Survival-/Proliferationsassay.....	40
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	40

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.1	DNA-Extraktion	40
2.2.4.2	Polymerasekettenreaktion.....	41
2.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.4.4	Herstellung nukleärer Zellextrakte	42
2.2.4.5	NF- κ B ELISA mit Kernextrakten.....	43
2.2.4.6	Herstellung zytoplasmatischer Zellysate	43
2.2.4.7	Bestimmung des Proteingehalts mit der Bradford-Methode.....	44
2.2.4.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
2.2.4.9	Immunoblot (Western Blot).....	45
2.2.4.10	Detektion der transferierten Proteine.....	46
2.2.4.11	Entfernen von Antikörpern auf der Membran (Stripping).....	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Die Rolle von Bcl10 in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren	48
3.1.1	Bcl10 abhängige Degradation von I κ B α	48
3.1.2	Bcl10-abhängige Translokation von NF- κ B in den Zellkern.....	49
3.1.3	NF- κ B Aktivierung nach retroviraler Rekonstruktion von Bcl10.....	50
3.1.4	Bcl10-unabhängige Aktivierung von MAPK und Akt	51
3.1.5	Akt als Regulator der NF- κ B Aktivierung.....	52
3.2	Die Rolle von Malt1 in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren	53
3.2.1	Malt1-abhängige Degradation von I κ B α	53
3.2.2	Malt1-abhängige Translokation von NF- κ B in den Zellkern.....	54
3.2.3	Malt1-unabhängige Aktivierung von MAP-Kinasen.....	55
3.3	Bcl10-abhängige Expansion von MEFs nach Wachstumsfaktor-stimulation.....	55
3.4	Schematische Zusammenfassung	57
4	Diskussion	59
4.1	<i>Bcl10</i> - und <i>Malt1</i> -abhängige NF- κ B-Aktivierung nach Rezeptortyrosinkinase-stimulation.....	59
4.2	Ausblick.....	63
5	Zusammenfassung	65
6	Verzeichnisse	67
6.1	Literaturverzeichnis.....	67
6.2	Abbildungsverzeichnis	72
6.3	Tabellenverzeichnis	73
6.4	Abkürzungsverzeichnis	74
7	Lebenslauf.....	78
8	Danksagung.....	80

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappa B

1.1.1 Funktion und Aufbau von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappa B (NF- κ B) spielt in verschiedenen biologischen Prozessen eine Rolle. NF- κ B reguliert zum einen Zellwachstum, -überleben sowie -ausreifung, zum anderen ist NF- κ B Bestandteil von Signalwegen der Immunabwehr und der Inflammation [26, 60, 68].

Die NF- κ B-Familie besteht bei Säugern aus fünf verschiedenen Proteinen: NF- κ B1 (p50 und sein Vorläuferprotein p105), NF- κ B2 (p52 und sein Vorläuferprotein p100), RelA (p65), RelB und c-Rel. Gemeinsam ist diesen die N-terminale, aus 300 Aminosäuren bestehende sogenannte Rel-Homologie-Domäne, welche die Dimerisierung von 2 Untereinheiten vermittelt. Darüberhinaus ist diese auch notwendig für die Interaktion mit den Inhibitor-of-kappa-B (I κ B)-Proteinen und die Bindung an spezielle DNA-Sequenzen. RelA, RelB und c-Rel besitzen neben der Rel-Domäne auch eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, durch die sie im Gegensatz zu NF- κ B1 und NF- κ B2 eine aktivierende Wirkung haben und die Transkription spezifischer Zielgene fördern [17, 26, 68].

Wie bereits oben erwähnt, ist NF- κ B in ruhenden Zellen an I κ Bs gebunden. I κ Bs stellen eine Familie dar, bestehend aus den „klassischen“ Unterformen I κ B α , I κ B β sowie I κ B ϵ sowie I κ B-ähnlichen Proteinen wie I κ B ζ , BCL3 und I κ BNS [68]. Durch die Bindung an I κ B an NF- κ B wird eine Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern durch die Maskierung des Kernlokalisationsabschnitts verhindert.

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt v.a. durch zwei verschiedene Signalkaskaden, dem klassischen bzw. kanonischen Signalweg einerseits und dem alternativen bzw. nicht-kanonischen andererseits. Diese beiden Aktivierungswege sowie deren Regulationsmechanismen sollen im Folgenden detaillierter dargestellt werden.

1.1.2 Der klassische Aktivierungsweg von NF- κ B

Der klassische Aktivierungsweg wird auch als kanonischer Weg bezeichnet. Dabei führt die Stimulation einer Zelle zur Aktivierung des I κ B Kinasen (IKKs)-Komplexes, bestehend aus IKK α , IKK β sowie IKK γ . Während IKK α und IKK β katalytische Eigenschaften besitzen, stellt IKK γ , auch NF- κ B essential modulator (NEMO) genannt, eine regulatorische Untereinheit dar. Der Aktivierungsmechanismus von IKK ist je nach Rezeptor unterschiedlich [68]. Gemeinsam ist ihnen allerdings, dass es infolge der Aktivierung des IKK-Komplexes zur Phosphorylierung und Polyubiquitinierung von I κ B am N-Terminus kommt. Dies führt zum Abbau von I κ B im Proteasom und die Kernlokalisationsdomäne von NF- κ B wird freigelegt [17, 68].

Die Aktivierung des kanonischen Signalwegs führt v.a. zur Aktivierung von Heterodimeren bestehend aus p50 (= NF- κ B1), p52 (= NF- κ B2) und RelA.

1.1.3 Der alternative Aktivierungsweg von NF- κ B

Neben dem oben beschriebenen kanonischen Weg führt der alternative, auch nicht-kanonisch genannte, Aktivierungsweg ebenfalls zu einer Aktivierung von NF- κ B. Hierbei kommt es v.a. zur Translokation des RelB/p52-Komplexes in den Zellkern [49, 60]. Während I κ B und dessen Degradation im klassischen Weg eine zentrale Rolle zukommt, ist die NF- κ B-Untereinheit p100 im nicht-kanonischen Aktivierungsweg von essentieller Bedeutung. Die Untereinheit p100 fungiert ähnlich wie I κ B als Translokationsinhibitor von RelB [57, 60]. Die Aktivierung von NF- κ B-inducing kinase (NIK) und nachfolgend von IKK α führt zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung sowie Prozessierung von p100. Dadurch kommt es zur Freilegung der Translokationsdomäne und somit zur Translokation in den Zellkern [60].

Rezeptoren, welche diesen Aktivierungsweg von NF- κ B anschalten, gehören meist der Familie der Tumor-necrosis-factor receptors (TNFRs) an. Dazu zählen u.a. folgende Rezeptoren: B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor (BAFFR), lymphotoxin β -receptor (LT β R), receptor activator of nuclear factor κ B (RANK), TNFR2, CD 40 und Fn14 [60].

Abbildung 1 zeigt schematisch diese beiden Aktivierungswege von NF- κ B.

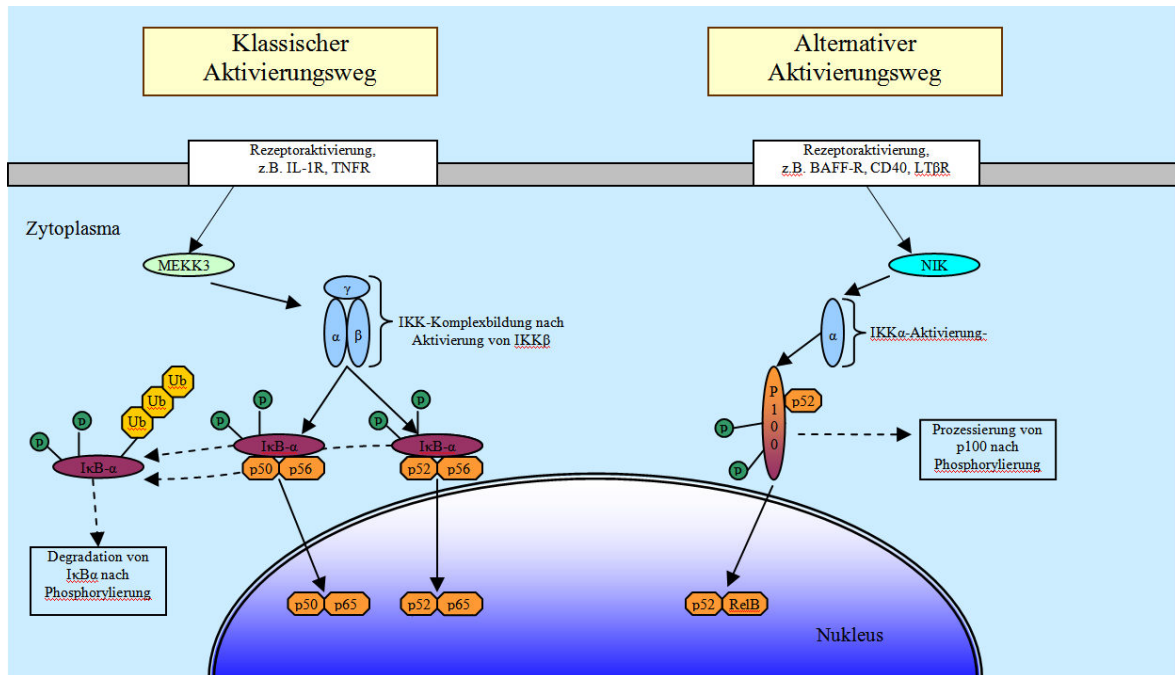


Abbildung 1: Kanonischer und nicht-kanonischer Signalweg zu NF-κB (nach Pomerantz et al., 2002) [49]

Oben links dargestellt ist der kanonische Aktivierungsweg, in welchem es nach Aktivierung des IKK-Komplexes und Phosphorylierung von IκBα zur Translokation von NF-κB, bestehend aus den Untereinheiten p50/RelA oder p52/RelA, kommt.

Rechts sieht man schematisch den nicht-kanonischen Aktivierungsweg, bei dem eine IKKα-induzierte Prozessierung von p100 zu p52 zu einer NF-κB-Translokation (bestehend aus RelB und p52) führt.

1.1.4 Die Regulationsmechanismen der NF-κB-Aktivierung

Die Aktivierung bzw. die Aktivität von NF-κB wird durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Dabei sind v.a. folgende Aktivierungsschritte Angriffspunkte für Regulationsmechanismen: Erstens die Formierung eines aktivierenden Proteinkomplexes am Rezeptor und dessen Stabilität, zweitens die Stabilität von NIK im Falle des alternativen Aktivierungsweges, drittens der IKK-Komplex im klassischen Aktivierungsweg, viertens IκB bzw. die p100-Untereinheit, fünftens die Wirkung von NF-κB im Zellkern. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über einige dieser zentralen Regulationsmechanismen gegeben werden. Da Rezeptoren nach Ligandenbindung meist unterschiedliche Proteine rekrutieren oder zum Teil auch beide Aktivierungswege anschalten, ist das Augenmerk v.a. auf die wesentlichsten Angriffspunkte gerichtet.

1.1.4.1 Regulationsmechanismen des kanonischen Aktivierungswegs

Wie unter 1.1.2 erwähnt spielt I κ B im klassischen Aktivierungsweg eine zentrale Rolle und stellt somit einen wichtigen Regulationspunkt dar. Die Phosphorylierung der klassischen I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ) führt zur Ubiquitinierung mit anschließender Degradation im Proteasom. Dadurch wird die Kernlokalisationsdomäne von NF- κ B freigelegt und der Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern. Die Resynthese der I κ Bs geschieht in Abhängigkeit von NF- κ B. Die Degradationsgeschwindigkeit sowie die Kinetik der Resynthese ist dabei je nach Unterform unterschiedlich. Während I κ B α sehr schnell abgebaut und auch resynthetisiert wird, läuft dies bei I κ B β oder I κ B ϵ wesentlich langsamer ab [68]. Im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus fungieren neu synthetisiertes I κ B α und I κ B ϵ im Weiteren als negative Regulatoren der NF- κ B-Aktivierung. Nachgebildetes I κ B α wandert dazu in den Zellkern und bindet an NF- κ B-Dimere, welche an DNA gebunden sind. Dies bewirkt eine Auswanderung von NF- κ B aus dem Zellkern, der Transkriptionsfaktor liegt somit wieder in inaktiver Form, an I κ B α gebunden, im Zytoplasma vor [53, 68]. Neu synthetisiertes und anschließend in den Zellkern transloziertes I κ B ϵ besitzt, durch Unterdrückung der I κ B α -induzierten Oszillationen, darüber hinaus noch eine zusätzliche regulierende Eigenschaft, welche die NF- κ B-Aktivität reduziert [53]. I κ B β hingegen ist durch Bindung an NF- κ B im Zellkern in der Lage, die inhibierende Wirkung von I κ B α zu verhindern und somit die NF- κ B-Wirkung zu verlängern. Eine identische Wirkung erzielt eine vermehrte Acetylierung von RelA [53].

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die I κ B-Unterformen, trotz ähnlicher Struktur, unterschiedlich stark an die verschiedenen NF- κ B-Komplexe binden und es somit je nach phosphorylierter Unterform zur Transkription unterschiedlicher Gene kommt [68, 74]. So bindet I κ B α bevorzugt an RelA/p50-Komplexe, I κ B ϵ an RelA/RelA- oder RelA/p50- Komplexe [68].

Doch I κ B stellt nicht den einzigen Regulationspunkt dar. Wie unter 1.1.2 beschrieben führt erst die Aktivierung des IKK-Komplexes zur Phosphorylierung von I κ B. In stimulierten Makrophagen konnte gezeigt werden, dass der IKK-Komplex nach Aktivierung nicht nur I κ B phosphoryliert, sondern IKK α auch RelA und c-Rel phosphorylieren kann, welche zu diesem Zeitpunkt noch im Zytoplasma lokalisiert sind. Nachdem die phosphorylierten Transkriptionsfaktoren dann in den Zellkern gewandert sind, werden sie schneller degradiert und die NF- κ B-Aktivität somit beendet [35, 68]. In früheren Untersuchungen

konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass die Aktivierung von RelA, welches an einen Promoter gebunden hat, durch proteosomalen Abbau beendet werden kann [42, 68].

Aber auch oberhalb des IKK-Komplexes gibt es unterschiedliche negative Regulationsmechanismen. Nach Rezeptorstimulation kommt es zur Rekrutierung rezeptorspezifischer Proteine und deren Aktivierung. Bevor es zur Aktivierung des IKK-Komplexes kommt, stellt die Polyubiquitinierung von Proteinen an Lysin 63 (K63-linked ubiquitination) durch Ligasen einen essentiellen Schritt dar. Diese ist jedoch reversibel [26, 53]. Zahlreiche Deubiquitinasen wie z.B. A20 spielen dabei eine Rolle. Da A20 ebenfalls NF- κ B-abhängig exprimiert wird, kommt es im Rahmen der Aktivierung des Transkriptionsfaktors zur de novo Synthese des Enzyms. Dies trägt zu einem negativen Feedbackmechanismus bei, indem A20 die Polyubiquitinierung an K63 rückgängig macht. Darüberhinaus führt A20 durch seine parallel bestehende E3 ubiquitin ligase domain zur Polyubiquitinierung von unterschiedlichen Signalproteinen und somit auch zu deren Abbau im Proteosom. Der IKK-Aktivierungskomplex wird dadurch instabil. Dieser negative Feedbackmechanismus sei an der Proteinkinase RIP1 beispielhaft dargestellt. Nach Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor 1 kommt es zur Rekrutierung des Adaptorproteins TRADD an den Rezeptor, was zur Bildung eines Signalkomplexes bestehend aus den E3 Ubiquitin-Ligasen cIAP1, cIAP2 und TRAF2 sowie der Proteinkinase RIP1 führt. Im Folgenden kommt es durch cIAP zur aktivierenden Polyubiquitinierung von RIP1 an K63. Der IKK-Komplex formiert sich hierdurch und über weitere Zwischenschritte wird NF- κ B aktiviert. A20 wird nach Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern vermehrt exprimiert. Die aktivierende Polyubiquitinierung von RIP1 wird durch die Deubiquitinaseuntereinheit von A20 entfernt bzw. führt die E3 ubiquitin ligase domain zu einer Polyubiquitinierung an einer anderen Stelle des Proteins und induziert somit dessen Abbau im Proteosom [53]. A20 ist eine von mehreren bekannten Deubiquitinasen die eine ähnliche inhibitorische Wirkung auf die NF- κ B-Aktivierungskaskade haben, dazu zählen u.a. die Deubiquitinasen cellular zinc finger anti- NF- κ B (Cezanne) oder Cyclindromatosis (CYLD). Die Aktivität der Deubiquitinasen wird dabei durch weitere Proteine reguliert [53].

Ein weiterer Regulationspunkt stellt die Dissoziation des Aktivierungskomplexes vom Rezeptor durch Adaptorproteine dar, wodurch es zu einer Inhibition der NF- κ B-Aktivierung kommt. Dies soll am Beispiel des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) genauer dargestellt werden. Im Falle der Aktivierung von TLR4 kommt es u.a. zur Rekrutierung von MyD88 und TRIF an den Rezeptor. MyD88 aktiviert durch IRAKS (Interleukin-

Rezeptor assoziierte Kinasen) sowie zusammen mit TRAF6, welches von TRIF zusammen mit weiteren TRAF-Proteinen rekrutiert wird, letztendlich IKK und der kanonische Signalweg zu NF- κ B wird angeschaltet. Die Stimulation des Rezeptors führt aber auch, nach NF- κ B-Translokation in den Zellkern, zu einer vermehrten Expression von Inhibitoren. So kommt es erstens vermehrt zur de novo Synthese der MyD88 Kurzform, welche durch alternatives Splicen entsteht, zweitens wird vermehrt IRAK-M, ein inaktives IRAK Homolog, exprimiert wie auch drittens SARM. Gemein ist ihnen, dass sie die IKK-Aktivierung nach Rezeptorstimulation durch Interaktion mit den Adaptorproteinen inhibieren [53].

Darüberhinaus besitzen weitere Proteine der kanonischen Signalkaskade, wie z.B. IKK β nicht ausschließlich eine aktivierende Wirkung. Vielmehr sind sie z.T. in der Lage ihre „Aktivatoren“ zu phosphorylieren und somit deren Wirkung zu beenden [53].

Zuletzt kann die NF- κ B-Aktivität im kanonischen Aktivierungsweg im Zellkern selbst beendet werden. Neben dem bereits oben erwähnten negativen Regulationsmechanismus durch I κ B, gibt es noch weitere. So kann die Aktivität von NF- κ B durch Abtrennen des Transkriptionsfaktors von der DNA und anschließender proteolytischer Degradation beendet werden. Eine Rolle spielt dabei, wie bereits oben aufgeführt, u.a. IKK α . Zum einen ist es in der Lage NF- κ B-Untereinheiten nach eigener Aktivierung zu phosphorylieren und somit die Degradation von c-Rel bzw. RelA nach Translokation zu beschleunigen [53, 68]. Zum anderen interagiert IKK α mit SUMO E3 Ligasen wie PIAS1. Wird IKK α aktiviert, phosphoryliert es PIAS1. Die SUMO E3 Ligase dissoziiert von der Kinase und wandert in die Promotorregionen der NF- κ B-Zielgene. Die Transkription wird somit unterbunden. Zuletzt sind zwei E3 Ubiquitinligasen (PDLIM2, EC2S) bekannt, welche die Degradation von nukleärem RelA steuern und somit ebenfalls die NF- κ B-Aktivität terminieren [53].

1.1.4.2 Regulationsmechanismen des nicht-kanonischen Aktivierungsweges

Wie unter 1.1.3 beschrieben stellt die NF- κ B-inducing kinase (NIK) einen zentralen Schritt im Rahmen des nicht-kanonischen Aktivierungsweges von NF- κ B dar [53, 60]. Die Rezeptorstimulation führt dabei über die Stabilisierung von NIK zur Aktivierung von IKK α . Die Stabilität von NIK ist essentiell für die Aktivierung von NF- κ B. Verschiedene Mechanismen, welche zu einer Destabilisierung von NIK beitragen, führen zu einer

Signalabnahme bzw. zu einer Beendigung des Signalweges [60]. Im Folgenden werden einige Kontrollmechanismen von NIK aufgezeigt.

Ein wesentlicher negativer Regulator stellt TRAF3 dar. TRAF3 ist ein an NIK-bindendes Protein, welches als Bestandteil eines, aus mehreren Untereinheiten bestehenden, Ubiquitin-Ligase-Komplexes fungiert. Neben TRAF3 sind folgende Proteine Bestandteil dieses Komplexes: TRAF2 und die Ubiquitinligase cIAP1/2 (T3-T2-cIAP). Durch die Dimerisierung von TRAF2 mit TRAF3, welches an NIK gebunden hat, kommt es zur Rekrutierung der Ubiquitinligase an NIK. Dies resultiert in einer Ubiquitinierung von NIK mit anschließendem Abbau im Proteasom. Dieser Mechanismus trägt dazu bei, dass unter physiologischen Bedingungen die NIK-Konzentration im Zellinneren auf niedrigem Level konstant gehalten wird. Infolge einer Rezeptorstimulation kommt es zur Rekrutierung des T3-T2-cIAP-Komplexes an den Rezeptor, was zur Degradation von TRAF3 und/oder TRAF2 führt. Im Folgenden akkumuliert NIK in den Zellen, was zu einer vermehrten Signaltransduktion und Aktivierung von nachfolgenden Proteinen des alternativen Signalweges führt [60].

Desweiteren existiert ein negativer, $IKK\alpha$ -abhängiger Feedbackmechanismus, welcher in der Lage ist, das Ausmaß der NIK-Aktivierung zu regulieren. Nachdem $IKK\alpha$ durch NIK aktiviert worden ist, phosphoryliert das Protein selbst wiederum NIK, was zu dessen Destabilisierung und anschließender Proteolyse führt [53, 60].

Neben beiden bereits genannten Regulationsmechanismen, existieren einige Proteine, welche als negative oder auch positive Regulatoren von NIK oder $IKK\alpha$ fungieren. Beispiele für negative Regulatoren von NIK stellen das TRAF- and NIK-associated protein (TNAP) oder Monarch-1 dar. Erst genanntes interagiert mit NIK, TRAF2 und TRAF3 und führt nach Transfektion in Zellen zu einer Inhibition der NIK-Kinaseaktivität. Bei letzt genanntem kommt es nach CD40-Stimulation durch die Induktion eines vermehrten proteasomalen Abbaus von NIK zu einer Inhibition des nicht-kanonischen Signalwegs. Das Zinkfingerprotein 91 (Zfp91) hingegen kann ebenso wie MALT1 oder BCL10 zur Stabilisierung bzw. vermehrten Aktivierung von NIK beitragen. Im Falle von $IKK\alpha$ besitzt STAT3 regulatorische Eigenschaften. Während überexprimiertes STAT3 nach Acetylierung in der Lage ist, $IKK\alpha$ in Krebszelllinien zu aktivieren, haben spezifische microRNAs einen inhibierenden Einfluss auf dieses Protein [60].

Darüberhinaus wird vermutet, dass es auch auf nuklearer Ebene Mechanismen, wie z.B. bestimmte Adaptorproteine, existieren, welche einen regulatorischen Einfluss haben [60].

1.1.5 Dysregulation von NF- κ B und dessen Folgen

Die Dysregulation von NF- κ B, v.a. im Sinne einer unkontrollierten Aktivierung, trägt zur Entstehung unterschiedlicher Krankheiten bei. Im Folgenden werden beispielhaft einige Erkrankungen genannt, in denen eine Fehlregulation von NF- κ B eine Rolle spielt.

So kann eine Infektion mit onkogenen Viren oder Bakterien zu einer dauerhaften Aktivierung von NF- κ B und somit zu einer Gewebeschädigung führen. Im Weiteren Verlauf kann es zur Tumorgenese kommen [60]. Onkogene Viren kodieren dabei spezifische Proteine, die in der Lage sind, durch Interaktion mit unterschiedlichen Komponenten des NF- κ B-Signalweges, diesen dauerhaft anzuschalten [61]. Das humane T-lymphotrope Virus-1 (HTLV-1) z.B. kodiert das Onkoprotein Tax, welches in der Lage ist, in infizierten T-Zellen durch direkte Bindung an IKK γ den kanonischen und durch Interaktion mit p100 den alternativen Aktivierungsweg anzuschalten. Dieser Mechanismus trägt zu einer Transformation der infizierten T-Zellen bei und spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung des adulten T-Zelllymphoms/Leukämie [27, 62]. Ebenso kodiert das Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV), auch humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) genannt, eine virale Form des zellulären FLICE inhibitor Proteins (FLIP) namens vFLIP. Dieses ist in der Lage, durch eine dauerhafte Aktivierung von IKK, NF- κ B zu aktivieren [27, 60]. Eine Infektion mit KSHV ist in erster Linie assoziiert mit dem Auftreten des Kaposi Sarkoms bei HIV-Infizierten, spielt aber auch eine Rolle im Rahmen von lymphoproliferativen Erkrankungen [5, 60]. Darüberhinaus ist LMP1 (latent infection membrane protein 1), ein durch Epstein Barr Virus (EBV) kodiertes, transmembranöses Protein, in der Lage Signalwege zu NF- κ B anzuschalten. LMP1 besitzt eine intrazelluläre Domäne, welche eine große Homologie zur Signaldomäne des CD40-Rezeptors aufweist, und führt neben der Oligomerisation von TRAF2 und TRAF5 mit nachfolgender Aktivierung von IKK, auch zu einer Aktivierung beider NF- κ B-Signalwege. Eine Infektion mit EBV kann v.a. in immundefizienten Personen zur Entstehung von Lymphomen, wie z.B. Hodgkin Lymphomen, beitragen [27, 58, 60].

Neben unterschiedlichen onkogenen Viren, können auch bakterielle Infektionen zu einer dauerhaften NF- κ B-Aktivierung führen. *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) und *Legionella pneumophila* sind zwei solche Bakterien. Eine Infektion mit *H. pylori* ist assoziiert mit der Entstehung von mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-Lymphomen [77]. Im Rahmen des weiteren Tumorwachstums führen genetische Veränderungen zu einem Antigen-unabhängigen Wachstum. Zu diesen genetischen Aberrationen zählen u.a. die

Translokationen t(14;18)(q32;q21) sowie t(1;14)(p22;q32), welche zu einer Verbindung des *MALT1*-Gens bzw. des *BCL10*-Gens mit dem Immunglobulin-schwere-Kette (*IgH*) Gen auf Chromosom 14 führt [27]. Die Translokation t(11;18)(q21;q21) führt zur Fusion des apoptosis inhibitor 2 (*API2*) Gens auf Chromosom 11 mit *MALT1* auf Chromosom 18. Durch diese Translokationen kommt es zu einer deregulierten Proteinexpression und somit zu einer dauerhaften Aktivierung von NF- κ B verbunden mit einem überschießenden Zellwachstum [27, 76].

Darüberhinaus spielt eine überschießende Aktivierung von NF- κ B auch eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. So stellt die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors einen zentralen Punkt in der Entstehung der Rheumathoiden Arthritis dar, einer Autoimmunerkrankung aus dem rheumatologischen Formenkreis, bei der es durch eine chronische Gelenkentzündung zur Knorpelzerstörung kommt. Die Aktivierung von NF- κ B durch unterschiedliche Proteine, wie z.B. den proinflammatorischen Mediatoren Interleukin (IL)-1 und tumor necrosis factor (TNF) führt zur Transkription von ebenfalls entzündungsfördernden Genen. Langfristig kommt es somit durch die chronische Entzündung zu einer Gewebeschädigung [69].

1.2 Malt1 und Bcl10

1.2.1 Aufbau und Funktion von Bcl10

Das zelluläre Homolog zum equinen Herpesvirus 2-Gen E10 ist bei Säugetieren Bcl10 [67]. Die Sequenz des bei Menschen und Mäusen vorkommenden BCL10-Proteins ist zu 91% identisch [54]. Es besteht aus 233 Aminosäuren mit einer caspase recruitment domain (CARD) am N-terminalen Ende [54, 67]. Diese CARD Domäne vermittelt die eigene Oligomerisierung und ist allein verantwortlich für eine NF- κ B-Aktivierung. Die C-terminale Region ist hingegen reich an phosphorylierbaren Serin- und Threoninresten. BCL10 ist ein wichtiges Signalprotein für den Neuralrohrverschluss in der Embryogenese und in der T- und B-Zellaktivierung [54].

1.2.2 Aufbau und Funktion von Malt1

Malt1 wird gebildet aus 821 Aminosäuren. Das 92 kDa Protein besteht am N-terminalen Ende aus einer death Domäne (DD), zwei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, einer Kaspase-ähnlichen Region und am C-terminalen Ende nochmals einer Ig-Domäne [65, 67, 76]. Dreizehn Aminosäuren, die direkt auf den CARD-Abschnitt des BCL10-Proteins folgen, sowie ein minimaler Abschnitt innerhalb der CARD sorgen für eine Interaktion mit den beiden Ig-ähnlichen Domänen von MALT1. Ebenso ist die DD-Domäne für eine Komplexbildung der beiden Partner notwendig [34, 54, 65]. Eine schematische Darstellung des MALT1-Proteins zeigt Abbildung 2.

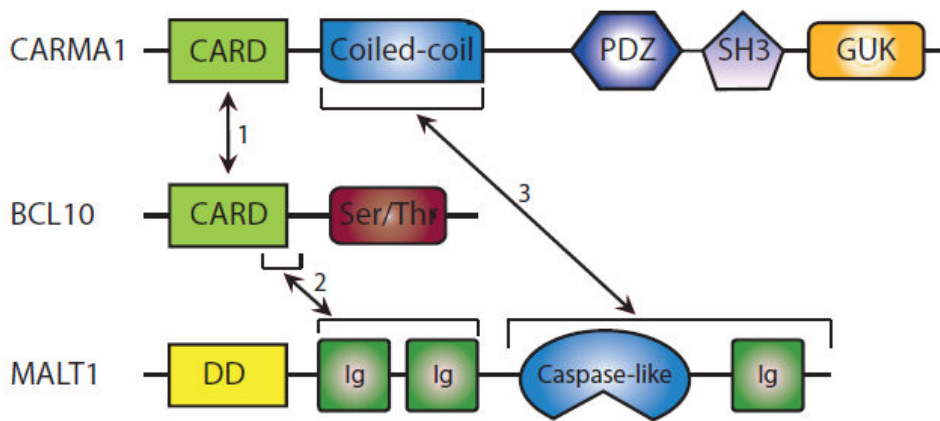


Abbildung 2: CARMA1-BCL10- und MALT1-Struktur und Interaktionsbereiche (nach Thome et al., 2010) [65]

CARMA1 setzt sich zusammen aus einer N-terminalen Caspase recruitment domain (CARD), gefolgt von einer coiled-coil (CC-) Region. Der daran anschließende Bereich, bestehend aus einer PDZ-, Src homology 3- (SH3) sowie Guanylatkinase-Region (GUK), ist ausschlaggebend für die Eingliederung in die Familie der „membrane-associated guanylate kinases“ (MAGUK). BCL10 besitzt ähnlich wie CARMA1 eine N-terminale CARD-Domäne. Malt1 setzt sich zusammen aus einer death Domäne (DD), 2 Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Abschnitten, einer Protease-Region sowie einer weiteren Immunglobulin Domäne.

Zur Ausbildung des CARMA1-BCL10-MALT1-Komplexes kommt es durch folgende Interaktionen:

1. CARMA1-BCL10 über die CARD-Domäne (hellgrün) von CARMA1 mit der CARD-Domäne von BCL10
2. BCL10-MALT1 durch den C-terminalen Bereich und ein daran anschließender kurzer Abschnitt von 13 Aminosäuren von BCL10 mit den beiden Ig-ähnlichen Regionen (dunkelgrün) von MALT1
3. CARMA1-MALT1 über die coiled-coil (blau) Region von CARMA1 mit dem C-terminalen Abschnitt von MALT1 (Protease (hellblau) und die dritte Ig-ähnlichen Region (grün))

1.2.3 Die Bedeutung von Bcl10/Malt1 in lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen

Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Bcl10 und Malt1 in der Regulation von B- und T-Zellen nach Rezeptorstimulation eine bedeutende Rolle zukommt [55]. Als Komplexpartner für diese beiden Proteine fungiert dabei ein Mitglied der CARMA-Familie. Im Falle von lymphoiden Zellen ist dieser Komplexpartner Carma1, dessen Struktur oben in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist [28, 55, 65]. Während Malt1 in T-Zellen unentbehrlich ist für die effektive Aktivierung von NF- κ B, ist es in B-Zellen nicht essentiell [55]. Die Aktivierung von NF- κ B im Falle einer T-Zellrezeptor- bzw. B-Zellrezeptorstimulation wird unter 1.2.3.1 bzw. 1.2.3.2 beispielhaft dargestellt.

Eine NF- κ B-Aktivierung in Abhängigkeit von Bcl10 bzw. Bcl10 und Malt1 ist allerdings nicht spezifisch für B-/T-Zellrezeptorsignalwege. So konnte eine NF- κ B-Aktivierung auch im Falle des Fc- [30], des NK-Zellrezeptors [22] sowie weiteren Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems [21, 24] gezeigt werden.

1.2.3.1 T-Zell Rezeptor vermittelte NF- κ B-Aktivierung

T-Zellen können auf zwei unterschiedliche Wege stimuliert werden. Erstens durch die Interaktion des T-Zellrezeptors mit MHC-Peptid-Komplexen, was für die Beendigung der G₀-Phase der T-Zellen essentiell ist. Zweitens agieren zum anderen Rezeptoren von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) oder Zytokine und Chemokine als sogenannte Co-Stimuli. Diese T-Zellaktivierung kann gleichzeitig oder zeitlich versetzt zu erst genannter Stimulation auftreten und sorgt für vermehrte Produktion von Makromolekülen in der Zelle, einem erhöhten Zellmetabolismus und ist verantwortlich für ein Vorantreiben des Zellzyklus [1].

Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer aus 2 unterschiedlichen Proteinketten, bei reifen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen meist aus einer α - sowie einer β -Kette, seltener aus einer γ - und δ -Kette bzw. im Falle von unreifen T-Zellen aus einer β - und einer Vorläufer- α -Kette. Diese interagieren mit Untereinheiten von CD3 (CD3 γ , δ , ϵ) und ζ -Untereinheiten. Jede einzelne Untereinheit besitzt mindestens ein „immune receptor tyrosine based activation motif“ (ITAM), was für die Signaltransduktion nach Antigenerkennung notwendig ist (siehe Abbildung 3) [38]. Eine zentrale Rolle kommt dabei der Phosphorylierung des ITAMs der ζ -Kette durch die Kinasen Lck und/oder Lyn zu. Dies führt zur Bindung eines 70kD

schweren Tyrosinphosphoproteins, ZAP70 genannt, an dieses ITAM [1, 38, 71, 72]. Das durch Phosphorylierung aktivierte ZAP70 phosphoryliert dann weitere Signalproteine wie „linker of activation T cells“ (LAT) und „SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa“ (SLP76) [1, 71]. Phosphoryliertes LAT und SPL76 sind ausschlaggebend für die Ausbildung multimolekularer Signalkomplexe in den lipid rafts der Zellmembran. Diese Komplexe sind in der Lage alle „Hauptsignalwege“ von T-Zellen anzuschalten [1, 72]. Sie enthalten u.a. Phospholipase C- γ (PLC γ) sowie den „nucleotide exchange factor“ Vav1, was für die Aktivierung von NF- κ B notwendig ist [72]. T-Zellrezeptorsignale können durch die Co-Stimulation von CD28 verstärkt werden. Aktive PLC γ bewirkt dann die Bildung von Inositol-3-Phosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 ist verantwortlich für eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, DAG rekrutiert seinerseits Proteinkinasen C (PKC) [1, 72]. PKC θ ist eine calciumunabhängige Proteinkinase C, die nach Co-Stimulation von CD3/CD28 in die immunologische Synapse rekrutiert und dann aktiviert wird. Die Kinase phosphoryliert das „membrane-associated guanylate kinase“ (MAGUK) Protein CARMA1, das dann einen Komplex mit B cell lymphoma 10 (BCL10) und mucosa associated lymphoid tissue 1 (MALT1) ausbildet (CBM-Komplex). Durch Rekrutierung des „TNF receptor-associated factor 6“ (TRAF6) kommt es zur Ubiquitinierung von BCL10 und MALT1 und damit zur Aktivierung von I κ B-Kinasen (IKK), die I κ B phosphorylieren. NF- κ B wird dadurch freigesetzt [34, 65]. Daneben kann auch das „receptor-interacting protein 2“ (RIP2), eine Serin/Threonin Kinase, eine Aktivierung von BCL10 nach T-Zellrezeptorstimulation und somit eine NF- κ B-Aktivierung bewirken [51, 72].

In Abbildung 3 werden die intrazellulären Vorgänge nach TCR-Stimulation skizziert [72].

1.2.3.2 B-Zell Rezeptor vermittelte NF- κ B-Aktivierung

Die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden läuft ähnlich ab wie beim T-Zellrezeptor. Neben dem B-Zellrezeptor selbst gibt es mehrere Co-Rezeptoren wie beispielsweise CD19-CD21, CD22 oder den „paired immunoglobulin-like receptor A“ (PIRA) [32]. Der B-Zellrezeptor ist ein Komplex bestehend aus schweren und leichten Ketten von Immunglobulinen und einem Heterodimer aus Ig α - sowie Ig β -Kette, welche ITAMs beinhalten (siehe Abbildung 3) [13, 14, 66]. Nach Ligandenbindung wandert der oligomerisierte B-Zellrezeptor in die „lipid rafts“ der Zellmembran. Dort werden nacheinander verschiedene zytosolische Phosphotyrosinkinasen rekrutiert. Nacheinander

kommt es zur Aktivierung von Lyn, Syk und Bruton's tyrosine kinase (BTK), was zur Aktivierung von Phospholipase γ (PLC γ) führt. Dies führt im Weiteren zur Rekrutierung von Proteinkinase C β (PKC β), welche ähnlich wie PKC θ in T-Zellen über die Bildung eines CARMA1-BCL10-MALT1-Komplexes NF- κ B aktiviert [13, 32, 72].

Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung der NF- κ B nach BCR-Stimulation.

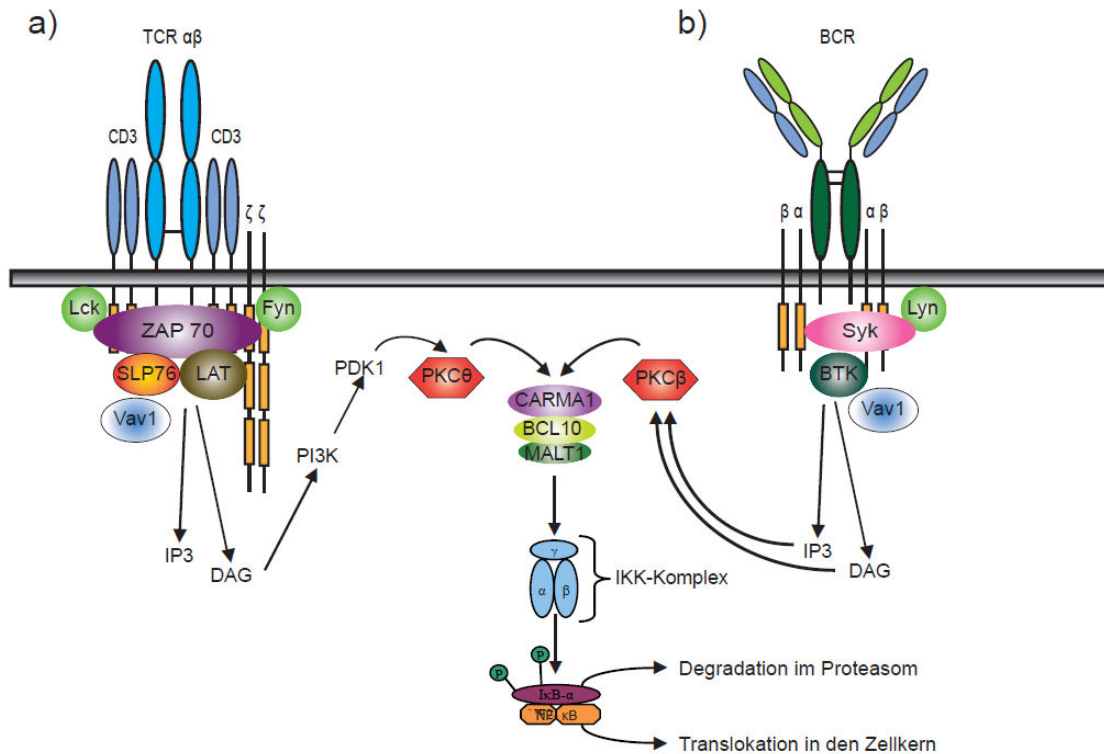


Abbildung 3: Aufbau des T- und B-Zellrezeptors sowie NF- κ B-Aktivierung in T- und B-Lymphozyten nach Antigenaktivierung (Kurzzusammenfassung nach Weil et al., 2004) [13, 38, 40, 41, 71, 72]

- a) Der T-Zellrezeptor reifer T-Lymphozyten setzt sich meist aus einer α - sowie einer β -Kette zusammen, seltener aus einer γ - oder δ -Kette. Dieses Heterodimer interagiert mit den Untereinheiten von CD3 (CD3 δ , γ , ϵ) und ζ -Untereinheiten. Nach Antigenerkennung und nachfolgender Phosphorylierung des TCR durch die Kinasen Lck und Fyn kommt es zur Rekrutierung von ZAP70 an den Rezeptor. ZAP70 phosphoryliert dann weitere Proteine, wodurch es zur Ausbildung unterschiedlicher Komplexe kommt. Diese Komplexe aktivieren ihrerseits wieder unterschiedliche Signalproteine. Die Aktivierung des PI3/Akt-Signalwegs sowie die Komplexbildung aus CARMA1, BCL10 und MALT1 führen dann zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern.
- b) Der B-Zellrezeptor setzt sich zusammen aus 2 schweren (hell- und dunkelgrün) und zwei leichten Ketten (blau). Die Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Der antigenbindende Abschnitt wird als Fab-Fragment (antigen binding fragment) bezeichnet. Er wird gebildet aus den beiden leichten Ketten (blau) und der variablen Region der schweren Ketten (hellgrün). Die konstante Region der schweren Kette (dunkelgrün) stellt das Fc-Fragment (fragment crystallizable) dar. Dieser Komplex interagiert mit einem Heterodimer bestehend aus I γ α und I γ β , welche ITAMs (gelb) tragen und für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Die Antigenbindung an den BCR führt hingegen zur Aktivierung der Proteinkinase Syk. Dies führt dann zu weiteren Phosphorylierungsschritten und Aktivierung anderer Signalproteine. Über die Ausbildung des CARMA1-BCL10-MALT1-Komplexes einerseits und der Aktivierung der PKC ζ andererseits kommt es wie in T-Zellen zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern.

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

1.3.1 Aufbau und Funktionsweise von Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) unterteilen sich in 20 Untergruppen mit insgesamt 58 verschiedenen Subtypen. Sie befinden sich an der Zellmembran und sind zentrale Regulatoren für Proliferation, Überleben, Metabolismus, Zellmigration und Zellzykluskontrolle. Gemeinsam ist ihnen die Struktur bestehend aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer einzigen transmembranen Helix und einer zytoplasmatischen Region mit der Tyrosinkinasedomain und zusätzlichen C-terminalen und juxtamembranen Regulatorproteinen. Mutationen von RTKs oder eine vermehrte Rezeptoraktivierung mit jeweils nachfolgender Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade sind pathogenetisch an der Entstehung unterschiedlicher Erkrankungen beteiligt [37]. Im Folgenden werden beispielhaft zwei Erkrankungen und die Bedeutung der Wachstumsfaktoren in deren Zusammenhang kurz dargestellt. So stellt die proliferative Retinopathie bei Diabetikern eine meist nach ca. 15 Jahren auftretende Folgeerkrankung dar. Dabei kommt es zu Gefäßneubildungen an der Retina bzw. im Bereich der Pupille. Diese Neovaskularisation wird durch Hochregulierung angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor β) sowie FGF (fibroblast growth factor), welche Liganden von Rezeptortyrosinkinasen darstellen, hervorgerufen [45]. Darüber hinaus spielt die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen eine Rolle bei malignen Erkrankungen. So findet man in ca. 89% aller Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) eine Überexpression der Rezeptortyrosinkinase FMS-related tyrosine kinase 3 (FLT3) bzw. in ca. 20-25% eine aktivierende Mutation dieses Rezeptors [9, 16]. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellen Rezeptortyrosinkinasen einen möglichen medikamentösen Angriffspunkt in der Behandlung dieser Erkrankungen dar [37]. Bindet ein Wachstumsfaktor an eine RTK führt dies zur Dimerisierung oder Oligomerisierung der extrazellulären Region bzw. zur Änderung der schon gebildeten Oligomerenstruktur [11, 37]. Die Bindung des Liganden führt zur Stabilisierung des Rezeptors in seiner aktivierten Form. Die ligandenvermittelte Dimerisierung/Oligomerisierung des Rezeptors kann einen unterschiedlichen Kontakt der extrazellulären Rezeptoranteile untereinander bewirken. Es gibt zwei Extremvarianten. Auf der einen Seite wird der Kontakt der Proteine nur durch den Liganden an sich hergestellt (=ligandenvermittelt), auf der anderen Seite führt die

Anlagerung des Wachstumsfaktors zu einer Zusammenlagerung der einzelnen Rezeptorproteine (=rezeptorvermittelt). Zwischen beiden Formen gibt es verschiedene Abstufungen [37].

Die Dimerisierung/Oligomerisierung der extrazellulären Region führt zur Aktivierung der intrazellulär lokalisierten Tyrosinkinase. Solange kein Wachstumsfaktor gebunden ist, wird die intrazellulär lokalisierte Tyrosinkinasedomäne durch eine *cis*Konfiguration des inaktiven Rezeptors autoinhibiert. Bei Anlagerung eines Liganden kommt es dann im Folgenden zur Konformationsänderung und das katalytische Zentrum wird durch die *trans*Konfiguration freigelegt. Dieser Mechanismus ist bei den verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren unterschiedlich. Gemeinsam ist ihnen die Bildung einer bestimmten Kristallstruktur, die für die Phosphorylierung anderer Proteine notwendig ist [37]. Zunächst phosphoryliert sich der Rezeptor dann selbst, was als Autophosphorylierung bezeichnet wird. Dies läuft in zwei Phasen ab. Zunächst werden meist juxtamembranöse Bereiche phosphoryliert, die zur Stabilisierung der aktivierten *trans*Konfiguration und somit zur vollständigen Entfaltung der katalytischen Aktivität des Rezeptors beitragen. In der zweiten Phase werden Bindungsstellen für Proteine mit einer Src homology-2 (SH)- oder Protein Tyrosin Bindungsdomäne (PTB) [7, 37] geschaffen. Die gebundenen Proteine werden dann meist ebenfalls phosphoryliert und dadurch aktiviert [37].

In dieser Arbeit wurde repräsentativ für die gesamte Gruppe der Wachstumsfaktoren die Signaltransduktion des EGF-, des FGF- sowie des PDGF-Rezeptors näher untersucht. Im Folgenden werden daher diese Rezeptoren sowie deren Liganden detaillierter beschrieben.

1.3.2 Epidermal growth factor Rezeptor

Die Familie der epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGF-Rezeptor), auch als ErbB bezeichnet, ist eine Untergruppe der Rezeptortyrosinkinasen bestehend aus vier verschiedenen Rezeptortypen: EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4. Mutationen, Überexpression oder Genveränderungen dieser Rezeptoren führt zu verschiedenen Tumorentitäten, z.B. zum kolorektalen (EGFR), Prostata (EGFR) - oder Mammakarzinom (ErbB2/HER2) sowie zum Glioblastom (EGFR). Dies macht sie zu einem Angriffspunkt in der medikamentösen Tumorthherapie [12].

Liganden dieser Rezeptoren sind 12 verschiedene Wachstumsfaktoren wie der epidermal growth factor (EGF), der transforming growth factor α (TGF- α) und Neureguline [12]. Für

die unten beschriebenen Versuche wurde ausschließlich EGF verwendet. Deshalb wird im Folgenden nur EGF als Stellvertreter aller möglichen Liganden genannt.

Der extrazelluläre Bereich des EGF-Rezeptors besteht aus 4 Subdomänen, welche mit I bis IV beziffert werden. Subdomäne I und III, die die Bindungsstelle für EGF bilden, sowie II und IV sind homolog zueinander (siehe Abbildung 4). Ist kein Ligand gebunden, bestehen sehr starke intramolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Dimerisierungsarm von Subdomäne II mit IV, welche bei Anlagerung von EGF gelöst werden [2, 12, 37]. Dies führt im Weiteren zur Dimerbildung mit einem anderen ligandengebundenen Rezeptor [37]. Dadurch kommt es schließlich zur Aktivierung der intrazellulär lokalisierten Tyrosinkinase. Durch direkten Kontakt der C-terminalen Schleife einer Tyrosinkinase (=„Aktivator“) mit der N-terminalen Schleife der anderen (=„Empfänger“) nach Rezeptordimerisierung kommt es zur Destabilisierung inhibitorischer Interaktionen in letzt genannter (=„Empfängertyrosinkinase“). Das katalytische Zentrum der „Empfängertyrosinkinase“ wird somit freigelegt [37, 75]. Nach Rekrutierung werden im Folgenden durch Rekrutierung von Signalproteinen unterschiedlicher Signalwege unterschiedliche Signalwege aktiviert (siehe Abbildung 5) [37, 47].

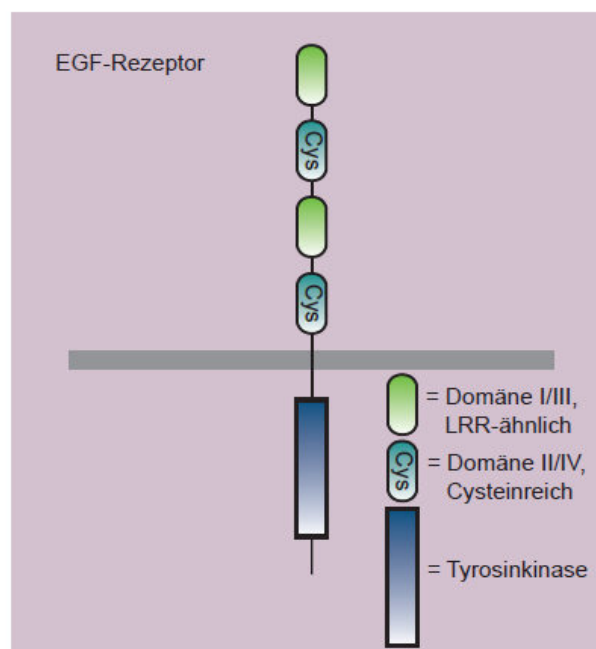


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des EGF-Rezeptors [37]

Der extrazelluläre Bereich des EGF-Rezeptors besteht aus 4 Subdomänen (I – IV), von denen jeweils zwei homolog zueinander sind (I und III = grün II und IV= türkis). Intrazellulär ist die Rezeptortyrosinkinase lokalisiert (=dunkelblau).

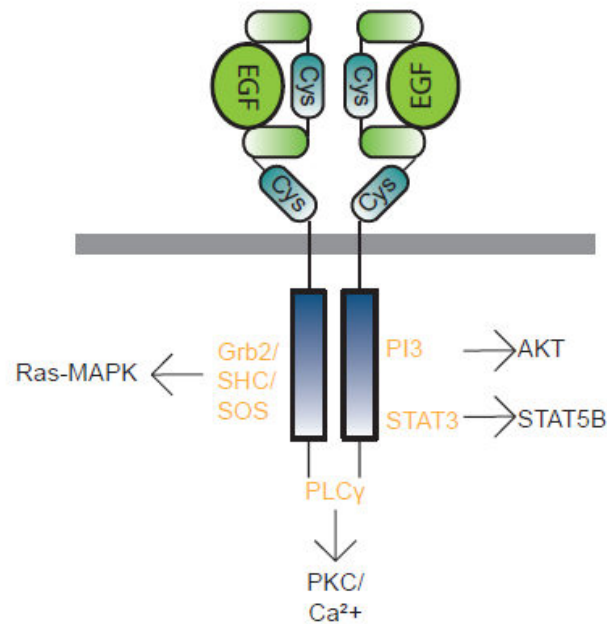


Abbildung 5: EGFR-Aktivierung und intrazelluläre Signalwege (nach Pines et al., 2010) [47]
 Die Bindung eines Liganden an die extrazellulären Domänen D1 und DIII (grün) führt zur Dimerisierung des EGFR. Somit kommt es auch zu einer Konformationsänderung des intrazellulären Abschnitts mit Freilegung des katalytischen Zentrums. Diverse Signalproteine (gelb) werden im Folgenden rekrutiert und aktiviert.

1.3.3 Platelet-derived growth factor Rezeptor

Der platelet-derived growth factor-Rezeptor (PDGF-Rezeptor) ist ebenfalls ein Vertreter der Rezeptortyrosinkinase. Es existieren 2 Unterformen PDGFR α und PDGFR β .

Abbildung 6 zeigt schematisch den Aufbau des Rezeptors, bestehend aus 5 extrazellulären Ig-ähnlichen Subdomänen und der intrazellulären Rezeptortyrosinkinase, welche in 2 Untereinheiten aufgeteilt ist [37].

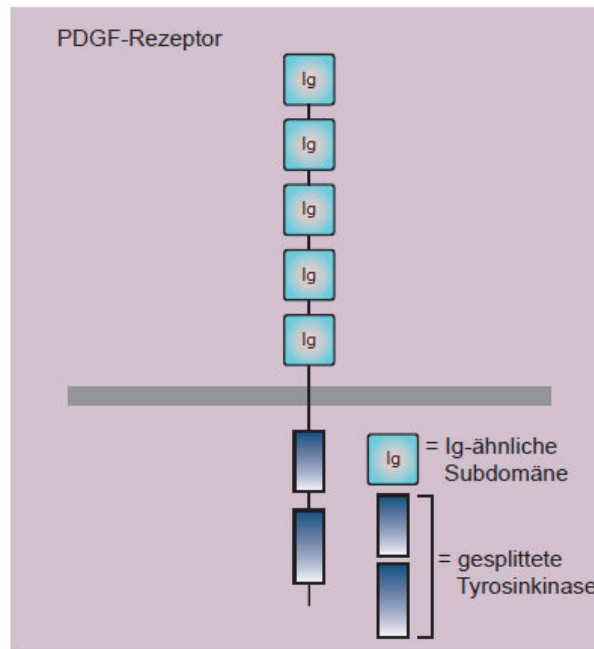


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des PDGF-Rezeptors [37]

Der extrazelluläre Abschnitt des PDGF-Rezeptors besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen (hellblau). Intrazellulär lokalisiert ist die geteilte Rezeptortyrosinkinasedomäne (dunkelblau).

Die Stimulation dieser Rezeptoren spielt u.a. eine wichtige Rolle in der Embryogenese (PDGFR α), in der frühen Hämatopoese (PDGFR β) und in der Blutgefäßbildung (PDGFR β). Autokrine Aktivierung des PDGF-Rezeptors ist beteiligt an der Entstehung maligner Erkrankungen wie Sarkomen, Gliomen oder Leukämien. Desweiteren spielt PDGF als Stimulator des Mesenchyms eine Rolle in der Entstehung/des Fortschreitens von Atherosklerose, pulmonaler Erkrankungen wie pulmonale Hypertension oder Fibrose, Erkrankungen der Retina, Leberzirrhose und vielen mehr. Daher setzen auch hier diverse Medikamente in der Behandlung all dieser Erkrankungen an [3].

Als Rezeptor-aktivierender Ligand fungiert v.a. PDGF, ein Dimer gebildet aus 2 Polypeptidketten. Es sind bisher vier verschiedene PDGF-Ketten (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D) bekannt. Ein PDGF-Dimer bindet immer an 2 PDGFRs, d.h. eine Polypeptidkette des Liganden interagiert mit einer extrazellulären Domäne des Rezeptors, wobei die verschiedenen PDGF-Isoformen eine unterschiedliche Affinität zu PDGFR α bzw. PDGFR β haben. So bindet PDGF-A ausschließlich an PDGFR α , während PDGF-B fähig ist an beide Rezeptorunterformen zu binden. Die Isoformen PDGF-C bzw. PDGF-D binden an PDGFR α bzw. PDGFR β . In Abbildung 7 sind die unterschiedlichen Affinitäten der Liganden zu den Rezeptorunterformen schematisch dargestellt. Die extrazelluläre Domäne des PDGFRs wird wie bei den RTKs c-KIT, FLT3, c-Fms, CSF-1 durch fünf Immunglobulinschleifen gebildet [3, 37].

Mögliche Ligand-Rezeptor Interaktionen:

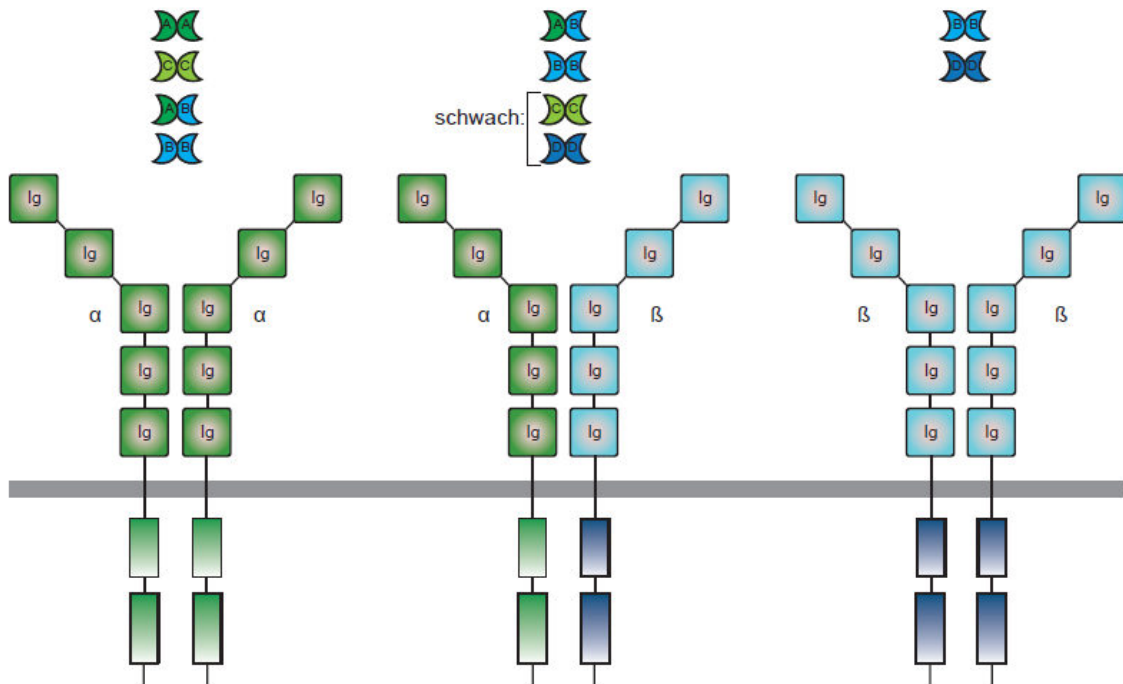


Abbildung 7: Mögliche Bindungen zwischen PDGF und PDGFR in vitro (nach Andrae et al., 2008) [3]

Der platelet-derived growth factor besteht aus 2 verschiedenen Ketten, die ein Dimer ausbilden. Die 4 unterschiedlichen Polypeptidketten (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D) werden durch vier verschiedene Gene kodiert. Zwei solche Ketten bilden über eine Disulfidbrücke einen Liganden. Jeweils eine Kette des Liganden interagiert mit einer Untereinheit des Rezeptors.

Nach Ligandenbindung kommt es zur Interaktion zwischen beiden Rezeptortyrosinkinasen und somit zur Aktivierung der intrazellulären Domäne, welche die Tyrosinkinaseaktivität besitzt [37]. Autophosphorylierung führt wie bei allen Rezeptortyrosinkinasen dann im Weiteren zur Aktivierung weiterer Signalproteine, so dass unterschiedliche Signalwege angeschaltet werden bzw. eine Verbindung zum Zytoskelett ausgebildet wird (siehe Abbildung 8) [3, 37].

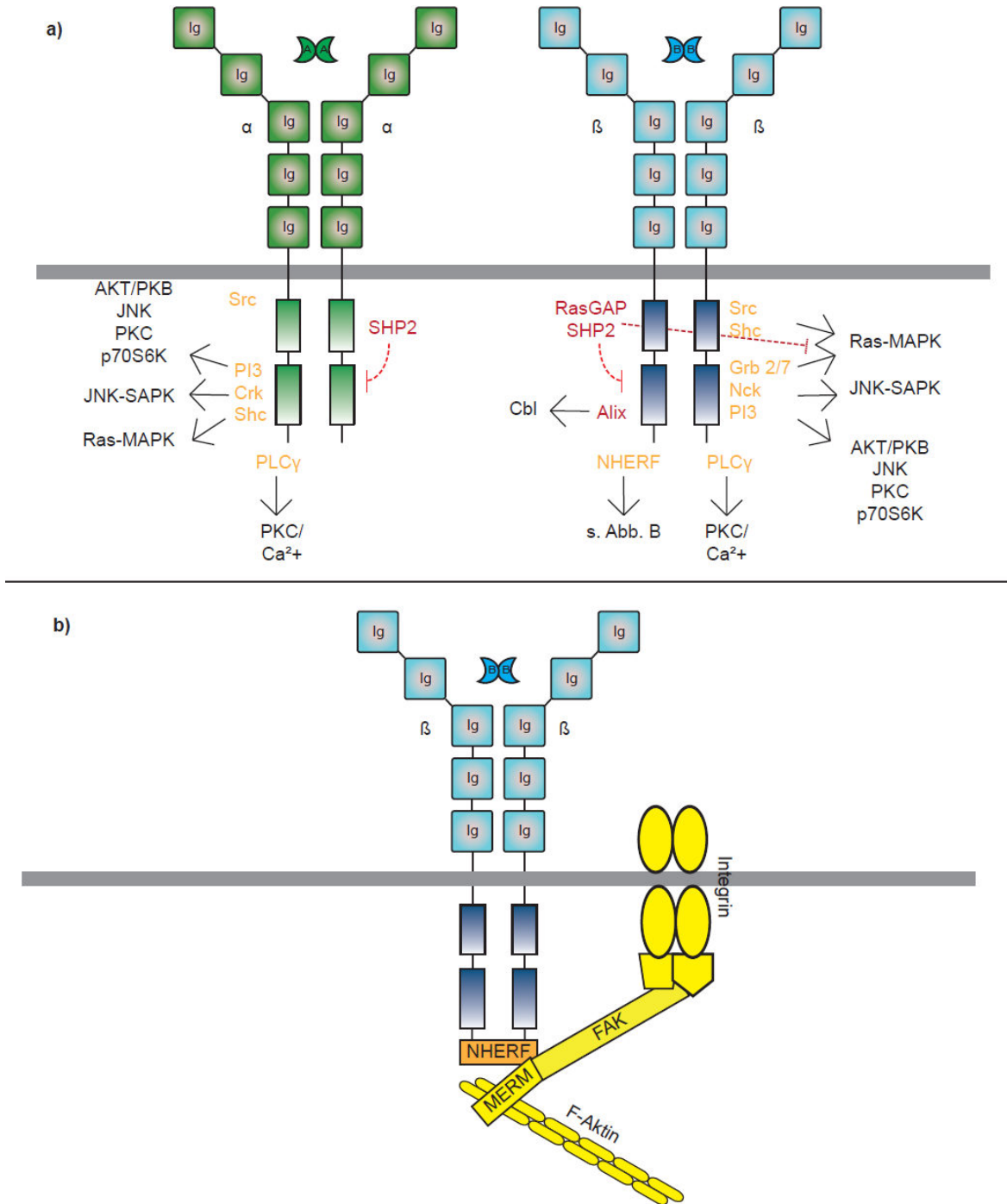


Abbildung 8: Beispiele für Signalwege (a) und Verbindung zum Zytoskelett einer Zelle (b) nach Ligandenbindung (aus Andrae et al., 2008) [3]

- a) Platelet-derived growth factor Rezeptor- α (PDGFR- α ; grün) und platelet-derived growth factor Rezeptor- β (PDGFR- β ; blau) interagieren bzw. aktivieren nach Ligandenbindung mit verschiedenen Signalproteinen, wodurch unterschiedliche Signalwege (schwarz) angeschaltet werden. Die rekrutierten Proteine sind gelb dargestellt bzw. im Falle eines negativen Feedback-Mechanismus rot
- b) PDGFR interagieren auch mit Bestandteilen des Zytoskeletts. So steht PDGFR- β über die Adaptorproteine NHERF (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factors), FAK (focal adhesion kinase) sowie MERM (merlin and ezrin/radixin/moesin family of cytoskeletal linkers) mit unterschiedlichen Bestandteilen des Zytoskeletts und mit anderen Regulatoren der fokalen Adhäsion in Verbindung.

1.3.4 Fibroblast growth factor Rezeptor

Ebenso zählt der fibroblast growth factor Rezeptor (FGFR) zu den Rezeptortyrosinkinasen. Stimulation der Rezeptoren durch den fibroblast growth factor (FGF) ist beteiligt an der Entwicklung von Geweben und anschließend an der dortigen Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Proliferation und Überleben einerseits sowie Zelltodinduktion andererseits. Fehlregulationen führen zur Tumorprogression und aufgrund der proliferativen Eigenschaften auch zur Entstehung von Metastasen [8]. Es konnten bisher folgende 4 Subtypen charakterisiert werden: FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4. Die extrazelluläre Domäne des FGFR besteht aus 3 Ig-like Domänen (D1-D3) sowie einer Säurebox, welche als Verbindungsdomäne, sog. Linker-Abschnitt fungiert (siehe Abbildung 9) [37, 48]. FGF kommt im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren ohne einen gebundenen Liganden ausschließlich als Monomer vor [48]. FGF bindet an die Domänen D2 und D3 sowie den „linker“-Abschnitt und geht dabei eine Verbindung mit zwei FGFRs ein, eine stärkere mit dem einen sowie eine schwächere mit dem anderen Rezeptor. Im Unterschied zu den beiden zuvor beschriebenen RTKs benötigt der FGFR neben der Bindung des Wachstumsfaktors FGF noch einen zusätzlichen Liganden zur Dimerisierung. So bindet Heparin oder heparan sulfate proteoglycan (HSPG) ebenfalls an beide Rezeptoren und an FGF, so dass folgende Interaktionen zur Stabilisierung des dimerisierten FGFRs führen: FGF-FGFR, Heparin-FGFR, FGF-Heparin, FGFR-FGFR (siehe Abbildung 10) [37, 44]. Darüberhinaus wurde eine weitere asymmetrische Anordnungsform beschrieben, in welcher Heparin die Verbindung zwischen 2 FGFR/FGF-Komplexen darstellt [37, 46].

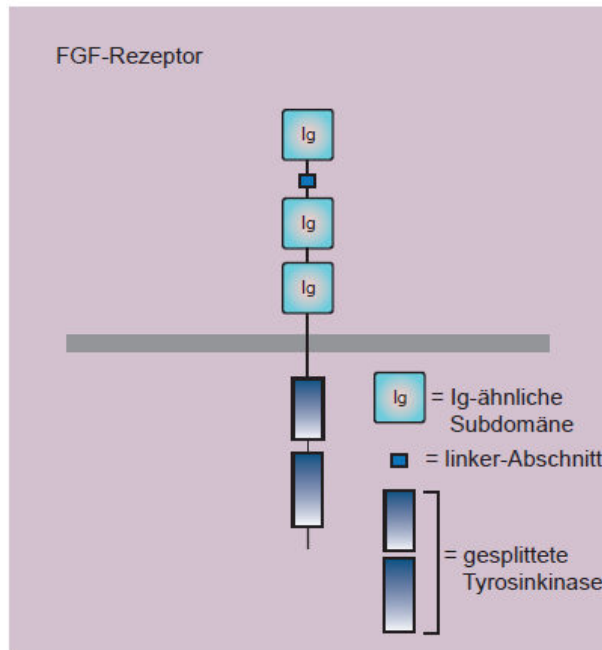


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des FGF-Rezeptors [37]

Im extrazellulären Abschnitt des FGF-Rezeptors befinden sich drei Immunglobulin-ähnliche (hellblau) Subdomänen sowie ein weiterer linker Abschnitt, welcher EGF ähnlich ist (türkis). Intrazellulär ist der Aufbau ähnlich dem PDGF-Rezeptor, mit ebenfalls einer geteilten Rezeptortyrosinkinasenuntereinheit (dunkelblau).

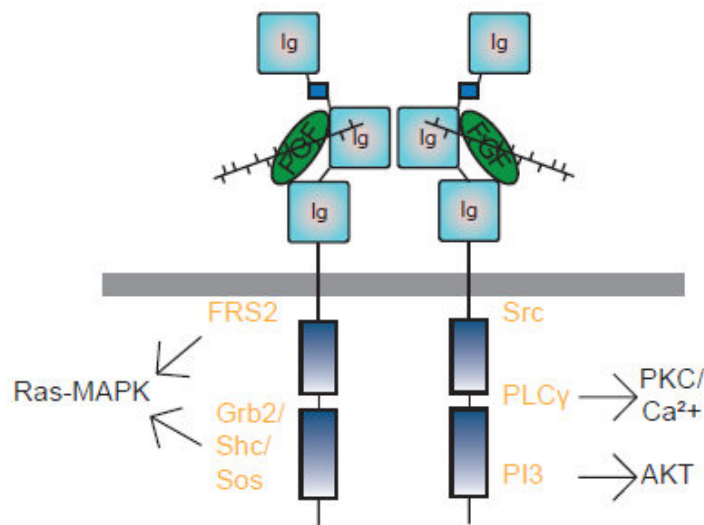


Abbildung 10: Beispiele für FGF-Signalwege nach Rezeptordimerisierung (nach Boilly et al., 2000 und Lee et al., 2006) [8, 36, 37]

Die immunglobulin-like (hellblau) Domäne D2 eines fibroblast growth factor receptors (FGFR) agiert in dimerisierter und damit aktiver Form direkt mit der D2-Domäne eines anderen Rezeptors. Darüber hinaus hat jeder FGFR über die D2- als auch die D3-Domäne einen Liganden, also einen fibroblast growth factor (FGF; dunkelgrün) gebunden. Desweiteren interagiert jede D2 Domäne mit einem Molekül Heparin oder einem Heparin Sulfat Proteoglycan (HSPG; schwarze Gitterstruktur). Der Ligand steht wiederum ebenfalls in Verbindung mit Heparin oder HSPG. Nach Rezeptordimerisierung infolge der Ligandenbindung werden unterschiedliche Signalproteine (gelb) zum Rezeptor rekrutiert, welche wiederum diverse Signalwege aktivieren (schwarz).

Die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden kann durch Veränderung der extrazellulären Struktur des Rezeptors verändert werden. Das Fehlen der extrazellulären Domäne D1 oder das Fehlen von acht Säureresten im D1-D2-linker-Abschnitt führt zu einer deutlich erhöhten Affinität. Diese Säurereste sind nämlich in der Lage mit Bereichen des Rezeptors zu interagieren, welche für die Bindung von HSPG bzw. Heparin verantwortlich sind [37]. Nach der Dimerisierung des Rezeptors kommt es wie bei den anderen Rezeptortyrosinkinasen zu Phosphorylierungsvorgängen und dadurch zum Anschalten unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege.

1.4 Problemstellung

Rezeptortyrosinkinasen regulieren verschiedene zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Überleben, Zellzyklus und Differenzierung [37]. Dazu schalten sie mehrere intrazelluläre Signalwege an, die u.a. zu einer Translokation von NF- κ B in den Zellkern führen [29]. Fehlfunktionen sowohl von Rezeptortyrosinkinasen als auch von NF- κ B resultieren in einem zellulären Ungleichgewicht und können somit zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie z.B. Krebs beitragen [27, 37].

Eine Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung von Bcl10 und Malt1 konnte bisher für verschiedene Rezeptoren nachgewiesen werden, so z.B. für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie den LPA-Rezeptor [31] oder für Rezeptoren des Immunsystems wie Antigenrezeptoren von Lymphozyten [54, 55], NK-Zellrezeptoren [22], Fc-Rezeptoren von Mastzellen [30] und Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems [21, 24, 39, 52, 73].

Aus folgenden Gründen wurde vermutet, dass die Formierung des Bcl10-Malt1-Komplexes einen wesentlichen Bestandteil der NF- κ B Aktivierung durch Wachstumsfaktoren darstellt.

Zum einen rekrutieren die oben genannten Immunrezeptoren allesamt eine Tyrosinkinase, um den Bcl10-Signalweg zu aktivieren, zum anderen konnte bereits für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, im Falle einer LPA-Stimulation, eine Abhängigkeit von Bcl10 und Malt1 gezeigt werden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass diese Proteine ebenfalls eine wichtige Funktion in der NF- κ B Aktivierung durch andere Nichtimmun-Rezeptoren haben.

Ziel dieser Arbeit ist es daher die Beteiligung des Bcl10-Malt1-Komplexes an der NF- κ B Aktivierung nach Rezeptortyrosinkinasenstimulation zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Standardgeräte

Acrylamidgel Elektrophorese Kammer	BioRad, München
Agarosegel Elektrophorese Kammer	BioRad, München
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
CCD-Kamera	
CO ₂ -Inkubator	Nunc GmbH&Co, Wiesbaden
Digitalwaage	Kern&Sohn GmbH, Tübingen
Entwickler Hyperprocessor	Protec, Oberestenfeld
GelDoc 2000 (+PC)	BioRad, München
Geltrockner Modell 583	Bio Rad, München
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Kryo Einfrierbehälter	Nalgene
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Laufkammer SUBCELL® GT	BioRad, München
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät	Ika GmbH&Co, Staufen
Neubauer Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	BioRad, München
pH-Meter F32	Beckman, Fullerton, USA
Pipetten	Abimed GmbH, Langenfeld
	Gilson, Bad Camberg
Pipettenhalter	Falcon, Heidelberg
	Hirschmann, Eberstadt
Protean II xi Cell	BioRad, München
Rollmischer	CAT, Staufen
Schüttler	Bibby Sterilin, Stone, UK
SDS-Elektrophorese Kammer	BioRad, München
Spectrophometer ND-1000	Peqlab, Erlangen
Sterile Werkbank Holten Lamin Air 1.8	Holten, Gydevang, Dänemark
Stromgenerator Powerpack 200/basic	BioRad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Abimed GmbH, Langenfeld
	PegLab GmbH, Erlangen
Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortex	Bibby Sterilin, Stone, UK
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

2.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen

2-Mercaptoethanol, 50 μ M	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid, 30%ige Lösung	BioRad, München
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Pfulingen
Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfulingen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA, Albumin Fraktion V	BioLabs, Ipswich MA, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche/Boehringer, Mannheim
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix 25mM	Bioline, Luckenwalde
Epidermal growth factor (EGF)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 0,7mg/ml	Eurobio, Les Ulis, Frankreich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykoldiamintetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Fibroblast Growth factor (FGF)	R&D Systems, Wiesbaden
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Lumigen TM TMA-6	Amersham Biosciences, Freiburg
L- α -lysophosphaticid acid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fluca, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Nonidet (NP40)	Fluka, Deisenhofen
Phosphat buffered saline (PBS), 10x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pierce ECL Western blotting Substrat	PIERCE, Rockford, USA
Platelet-derives growth factor- β (PDGF- β)	R&D Systems, Wiesbaden
Poly dIdC (20x)	PIERCE, Rockford, USA
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Protein Assay Dye Konzentrat	BioRad, München
Proteinase K	Sigma-Adrich Chemie, Deisenhofen
Puromycin	Calbiochem, Bad Soden
Random Primer (3 μ g/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
Rottlerin (PKC Inhibitor)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCL) 37%	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

TransFectin™ lipid reagent	BioRad, München
Trinatriumtetraoxovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trockenmilchpulver	Fluka, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tumor necrosis factor α (TNFα)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Wortmannin (PI3-Inhibitor)	Calbiochem, Bad Soden

2.1.3 Standardlösungen und Puffer

Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10%	1g APS ad 10ml Aqua dest.
Antikörper Inkubation und Blocking Puffer	5% Trockenmilchpulver in TBST (m/V), (pH 7,4) Für phosphorylierte Proteine: 5% BSA in TBST (m/V)
Bindepuffer (pro 96-well-Platte) (aus EZ-Detect™ Transcription Factor Kit NF-κB p65)	4,32 ml Reinstwasser (ultrapure) 1,152 ml NF-κB Bindepuffer 20x Poly dIdC
CHAPS Lysepuffer	10mM Tris (pH 7.5) 0.5% CHAPS (m/V) 1mM MgCl ₂ 1mM EGTA 10% Glycerin 100μM Na ₃ VO ₄ 50mM NaF 1 Tablette Complete Mini (=EDTA free Protease Inhibitor) pro 10ml Puffer
Digestion Solution Master Mix (aus: Wizard SC Genomic DNA Purification System)	200μl Nuclei Lysis Solution 50μl 0,5 M EDTA (pH 8,0) 20μl Proteinase K 20mg/ml 5μl RNase Solution 4mg/ml
Einfriermedium	20 % DMSO (V/V) 20 % FCS (V/V) in DMEM

Embryo-Lysis-Buffer	50mM KCl 10mM Tris (pH 8,3) 2mM MgCl ₂ 0,1 mg/ml Gelatine 0,54% NP40 (V/V) 0,45% Tween-20 (V/V) 0,1 mg/ml Proteinkinase K (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)
Laufpuffer Western Blot (10x)	30,2g Tris 144g Glycin 50ml 20% SDS (10g) ad 1000ml Aqua dest. (pH 8,3)
PBS	137 mM NaCl pH 7,2-7,4 2,7mM KCl 8,1mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄ ad Aqua dest.
PBST	0,05% Tween-20 (V/V) ad PBS (1x)
PCR-Puffer (10-fach)	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
Probenpuffer Western Blot (2x)	125 mM Tris/HCl, pH 6,8 20% Glycerin (V/V) 4% SDS (m/V) 0,2% Bromphenolblau (m/V) 10% Mercaptoethanol (V/V, unmittelbar vor Gebrauch zugeben) ad 50 ml Aqua dest.
Puffer A	10mM HEPES (pH 7,9) 10mM KCl 0,1mM EDTA 0,1mM EGTA 1mM DTT (unmittelbar vor Gebrauch zugeben) 1 Tablette Complete Mini (=EDTA free Protease Inhibitor) pro 10 ml Puffer in Aqua dest.

Puffer C	20mM HEPES (pH 7,9) 0,4 M NaCl 1mM EDTA 1mM EGTA 1mM DTT (unmittelbar vor Gebrauch dazugegeben) 1 Tablette Complete Mini (=EDTA free Protease Inhibitor) pro 10ml Puffer in Aqua dest.
Reaktionspuffer (10x)	Peqlab, Erlangen
Stripping buffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) 2% SDS (m/V) 0,7% β -Mercaptoethanol (V/V, unmittelbar vor Gebrauch zugeben) ad Aqua dest.
TAE-Puffer	0,4M Tris Base 1,1% Essigsäure (V/V) 0,5 M EDTA (pH 8,0) in Aqua dest.
TBS	20mM Tris Base 137 mM NaCl ad Aqua dest. (pH 7,4)
TBST	TBS 0,025% Tween 20 (pH 7,4)
Transferpuffer	50mM Tris 40mM Glycin 0,03% SDS (m/V) 20% Methanol (V/V, unmittelbar vor Gebrauch zugeben) ad Aqua dest

2.1.4 Zellen

MEFs	Murine embryonale Fibroblasten
Φ NX-Eco (Phoenix E)	Verpackungszelllinie zur retroviralen Infektion; transfizierte 293T (humane embryonale Nierenkarzinom-) Zellen

2.1.5 Zellkulturmedien und Medienzusätze

2-Mercaptoethanol, 50mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Fetal calf Serum (FCS) mit Endotoxin/LPS-Anteil < 0,2EU	Perbio, Bonn
L-Glutamin, 200mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin (10000U/ml)/ Streptomycin-Lösung (10000µg/ml)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS), 10x	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
TransFectin™ Lipid Reagenz	BioRad, München
Trypanblau, 0.4%ige Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin EDTA	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 Antikörper

Anti-IκBα, Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-Akt, Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-Bcl10 (H-197), Hase IgG, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Bcl10, Hase IgG, polyklonal	ProSci Inc., Lörrach
Anti-Malt1, Maus IgG, monoklonal	V. Dixit, San Francisco, CA, USA
Anti-Maus IgG HRP-konjugiert, Pferd	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-p38 MAP-Kinase, Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-p44/42 MAP-Kinase, Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-Phospho-Akt, Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-Phospho-JNK/SAPK (Thr183/Tyr185), Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204), Hase IgG, polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-rabbit IgG HRP-konjugiert, Ratte	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-SAPK/JNK, Hase IgG	Cell Signaling, Frankfurt a. Main
Anti-β-Actin, Hase IgG, polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

2.1.7 Enzyme

Taq DNA Polymerase

PeqLab GmbH, Erlangen

2.1.8 Oligonukleotide

In folgender Tabelle sind die verwendeten Primer mit Sequenz und Länge dargestellt. Alle Primer wurden zur Genotypisierung verwendet.

Name	Bp	Sequenz
<i>Bcl10</i> -Wildtyp-Primer	22	5`-TTG GCT CTC TGC TCT CCT CAC T-3`
<i>Bcl10</i> -com-Primer	22	5`-CGC TCT GAG GAC TGT GGG ACT G-3`
<i>Bcl10</i> -neo-Primer	26	5`-GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TC-3`
<i>Malt1</i> -Wildtyp-Primer	28	5`- ACT TTC ATC TTG CCA GCA CTC TTT CTT A-3`
<i>Malt1</i> -com-Primer	27	5`-CTG CTG CTG ACA TGC TAC AAT ATG CTG-3`
<i>Malt1</i> -neo-Primer	26	5`-GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TC-3`

Tabelle 1: Zur Genotypisierung verwendete Primer mit Angabe der Länge sowie der Sequenz

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

2.1.9 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

100bp DNA Molekulargewichtsmarker
PageRuler™
Prestained protein ladder

Peqlab, Erlangen
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.10 Molekularbiologische Kitsysteme

ECL Western blot detection Kit
EZ-Detect™ Transcription Factor Kit NF-κB p65
Wizard SC Genomic DNA Purification System

Amersham Biosciences, Freiburg
PIERCE, Rockford, USA
PIERCE, Rockford, USA
Promega, Mannheim

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Neolab, Heidelberg
Falcon 50ml Röhrchen	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Hybond P PVDF Transfermembran	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Kryoröhrchen 2ml	Hartenstein, Würzburg
MicroSpin™G-25 Column	Amersham Biosciences, Pittsburgh, USA
PCR-8er Röhrchen	Peske GmbH, Dortmund
Pipettenspitzen (Plastik)	BD Biosciences, Heidelberg
1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	
Pipettenspitzen gestopft	Fisher Scientific, Schwerte
10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	
Pipettenspitzen ungestopft	Hartenstein, Würzburg
10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	BD Biosciences, Freiburg
Whatman® 3 mm Gel-blotting-Papier	BioRad, München
Zellkulturplatten:	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
6-well, 12-well,	
6 cm, 10cm, 15cm im Durchmesser	
Zellkulturröhrchen 15ml, 50ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb (70µM, 100µM)	BD Biosciences, Freiburg

2.1.12 Verwendete Software

Adobe Illustrator®	Adobe Systems, San Jose, USA
Adobe Photoshop®	Adobe Systems, San Jose, USA
Microsoft Excel®	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung und Zucht der Mäuse

Die verwendeten *Bcl10*-defizienten und *Malt1*-defizienten Mäuse wurden wie beschrieben generiert [54, 55] und waren in der Zucht der Arbeitsgruppe Ruland vorhanden. Sie besaßen einen B6/129J Hintergrund.

Zur Generierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurde ein *Bcl10*^{-/-} bzw. *Malt1*^{-/-} Männchen mit *Bcl10*^{+/-} bzw. *Malt1*^{+/-} Weibchen verpaart. Anschließend wurden, im Abstand von jeweils 12 Stunden, sogenannte plug-Tests durchgeführt, um den Zeitpunkt der Trächtigkeitsentstehung zu bestimmen. War eine Maus plug-positiv wurde sie aus der Verpaarung genommen. Am 13. Tag post conceptionem konnten dann die MEFs generiert werden (siehe Gliederungspunkt 2.2.2.1).

Die Genotypisierung der Mäuse und der MEFs erfolgte über eine spezifische Polymerasekettenreaktion (siehe Gliederungspunkt 2.2.4.2).

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Generierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs)

Zur Gewinnung primärer MEFs wurden an einer Sterilbank schwangere Mäuse am dreizehnten Tag post conceptionem möglichst keimfrei eröffnet. Die Embryonen wurden vorsichtig von der Plazenta gelöst und in eine Kulturschale mit angewärmtem Medium (DMEM mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% β -Mercaptoethanol) gegeben. Dort wurden die Embryonen vorsichtig voneinander getrennt und in jeweils separate Kulturschalen gegeben. Nach Abtrennen des Kopfes und Entnahme der Leber wurden der verbleibende Teil durch ein Sieb gemasht und nach mehrmaligem Resuspendieren in ein 15ml Falcon gegeben. Diese Schritte wurden mit allen Embryonen getrennt vollzogen. Anschließend zentrifugierte man die Zellen ab und entfernte den Überstand. Das Zellpellet wurde abschließend in 5ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellen auf 5cm²-Platten ausgesät. Nach ungefähr 24h nahm man das alte Medium ab und gab es in ein 15ml Falcon. Auf die Platten kam 5ml frisches Kulturmedium. Die toten

Zellen aus dem abgenommenen Überstand konnten mittels Zentrifugation gewonnen und zur Genotypisierung verwendet werden. Anschließend wurden die Zellen wie unter Gliederungspunkt 2.2.2.2 beschrieben weiter kultiviert.

2.2.2.2 Kultur und Passagierung primärer MEFs

Primäre MEFs wurden in DMEM mit 10% FCS (fetal calf serum), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% β -Mercaptoethanol bei 37°C im Inkubator kultiviert. Jeden 2.-3. Tag hatten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-90% und mussten ungefähr 1:4 gesplittet werden.

Dafür wurde unter sterilen Bedingungen zunächst das alte Medium abgesaugt, die Zellkulturplatte bzw. das Well einmal mit PBS vorsichtig gewaschen und eine vorher im Wasserbad leicht erwärmte Trypsin/EDTA-Lösung hinzugefügt. Diese löste die Zellen enzymatisch vom Boden der Zellkulturplatte ab. Nach einer Inkubationszeit von 5-10min bei 37°C konnte man eine Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop erkennen. Die Inkubation durfte nicht zu lange sein, da sonst eine Zerstörung der Zellmembran einsetzt. Nach Zugabe von Medium und mehrmaligem rauf und runter pipetieren, um Zellverklumpungen zu lösen, wurden die Zellen in ein Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 300facher Erdbeschleunigung (300g) und 4°C für 5min abzentrifugiert, um das Trypsin/EDTA-Gemisch zu entfernen. Die Zellen wurden dann wieder in frischem Medium aufgenommen und auf einer neuen Zellkulturplatte ausplattiert.

Ab Passage 8 stellten die primären MEFs ihr Wachstum ein.

2.2.2.3 Zellkultur und Passagierung von Phoenixzellen

Ekotrope Phoenixzellen (Φ NX-Eco) sind eine Verpackungszelllinie für die retrovirale Transfektion von Maus- bzw. Rattenzellen. Sie entstehen aus 293T (humane embryonale Nierenkarzinom-) Zellen und gehören wie die MEFs zu den adhären Zellen. Sie werden ebenfalls in DMEM mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% β -Mercaptoethanol kultiviert. Da Phoenixzellen sehr empfindlich bezüglich einer zu hohen Zelldichte sind, wurden sie täglich 1:2 gesplittet. Dazu wurde wie unter Gliederungspunkt 2.2.2.2 beschrieben das Medium entfernt, die Mediumreste mit PBS abgewaschen,

anschließend die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und dann mit frischem Medium auf neue Zellkulturplatten ausgesät.

2.2.2.4 Einfrieren

In Kultur befindliche MEFs/Phoenixzellen konnten zu jedem Zeitpunkt eingefroren werden und längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierfür löste man die Zellen von der Platte, zentrifugierte sie ab (siehe Gliederungspunkt 2.2.2.2 und 2.2.2.3) und nahm sie dann in Kulturmedium ohne FCS auf. Von dieser Zellsuspension wurden 0,5ml mit einem äquivalenten Volumen an Einfriermedium (60% DMEM, 20% FCS , 20% DMSO) in einem Kryoröhrchen gemischt. Die Kryoröhrchen wurden abschließend in einen Kryoeinfrierbehälter, welcher zuvor mit 2-Propanol gefüllt worden war, geben und für 12-24h bei -80°C aufbewahrt. Danach konnten die Zellen in Flüssigstickstoff überführt werden.

2.2.2.5 Auftauen

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie im Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend in 5ml angewärmten Kulturmedium aufgenommen. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen wurden die Zellen bei 300g und 4°C für 5min zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert. Zuletzt säte man die Zellen auf neuen Zellkulturplatten aus.

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Um die Zellzahl bzw. den Anteil toter Zellen in einer Kultur zu bestimmen, wurden die Zellen wie unter Gliederungspunkt 2.2.2.2 und 2.2.2.3 beschrieben von der Zellkulturplatte gelöst. Im nächsten Schritt mischte man 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau und gab dies dann in eine Neubauer Zählkammer. Unter einem Phasenkontrastmikroskop wurden die Zellen ausgezählt. Das negativ geladene Trypanblau kann nur geschädigte Zellmembranen durchdringen, was eine Differenzierung zwischen lebenden und toten bzw.

sterbenden Zellen ermöglichte. Im Gegensatz zu den dunkelblau gefärbten toten Zellen stellten sich die lebenden Zellen unter dem Mikroskop hell dar.

2.2.2.7 Retrovirale Infektion von MEFs

Phoenixzellen, welche als Packaging Zellen fungierten, wurden in DMEM mit 10% FCS auf einer 6-Well-Platte ausgelegt und mit einem Vektor, der entweder Bcl10 enthielt (pBABE-puro-Bcl10) oder mit einem leeren retroviralen Vektor (pBABE-puro) transfiziert. Dazu wurde zunächst, wie in den Anweisungen des Herstellers beschrieben, 1µg DNA mit 10µl TransFectin™ Lipid Reagent und 500µl DMEM ohne FCS gemischt. Zur Transfektion wurde das Gemisch, bestehend aus DNA, TransFectin™ Lipid Reagent und DMEM ohne FCS, in ein Well einer 6-Well-Platte mit Phoenixzellen gegeben. Der virusenthaltende Überstand konnte nach 48h abgenommen werden. Nachdem Polybren (Endkonzentration 4µg/ml) hinzugegeben worden war, wurde der Überstand auf die MEFs gegeben. Die zu transfizierenden Zellen waren zuvor ebenfalls in einer 6-Well-Platte ausgelegt worden. Anschließend zentrifugierte man die Zellen bei 30°C und 2500rpm für 90min. Zur Selektion der infizierten Zellen wurde dem Kulturmedium der MEFs 10 Tage lang Puromycin (Endkonzentration: 1µg/ml) hinzugegeben.

2.2.3 Stimulationsexperimente

2.2.3.1 Stimulation der MEFs mit Wachstumsfaktoren

Zur Stimulation wurden 4×10^5 *Bcl10*^{+/-} und *Bcl10*^{-/-}-MEFs bzw. *Malt1*^{+/-} und *Malt1*^{-/-}-MEFs pro Stimulationszeitpunkt auf einer 10cm Schale in 8ml Kulturmedium (DMEM mit 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% β-Mercaptoethanol) ausplattiert und 12h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen gehungert. Hierzu wurde die Zellkulturplatte zunächst zweimal gründlich mit PBS gespült und anschließend 8ml DMEM ohne FCS, aber mit allen anderen Supplementen für 48h auf die Zellen gegeben. 60min vor Stimulationsbeginn wurde zunächst Cycloheximid (CHX) in einer Endkonzentration von 5µg/ml bei 37°C auf die Platten gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100ng/ml EGF, 10ng/ml PDGF oder 40ng/ml FGF für 60, 120 und 180min stimuliert.

Um die Stimulation zu beenden, wurde das Medium abgesaugt, 4ml gekühltes PBS auf die Platte gegeben und diese auf Eis gestellt.

Zum Lösen der adhärenen Zellen wurden diese vorsichtig von der Platte abgeschabt, die schwimmenden Zellen nach mehrmaligem Resuspendieren in ein 15ml Falcon überführt und die Platte mit 4ml PBS nachgespült. Anschließend wurden die Zellen für 5min bei 4°C mit 500g abzentrifugiert und auf Eis gelagert, bis alle Zeitpunkte geerntet waren.

Sollte in einem Experiment die Proteinkinase C (PKC) oder der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg gehemmt werden, so wurde Rottlerin (1µM) bzw. Wortmannin (3µM) zusammen mit Cycloheximid 1 Stunde vor Stimulation auf die Platte gegeben.

2.2.3.2 Survival-/Proliferationsassay

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden gezählt und in einer Dichte von 6×10^4 Zellen/Well auf eine 6-well Platte ausgelegt. Pro Stimulationszeitpunkt und Stimulus wurden je 6 wells (=eine 6-Well Platte) mit *Bcl10*^{+/-}, *Bcl10*^{-/-}, *Malt1*^{+/-} sowie *Malt1*^{-/-}-MEFs ausgelegt. Anschließend wurden die Zellen für 48h in DMEM mit 1% FCS gehungert. Zum Zeitpunkt Null wurden die ersten Wells gezählt und die restlichen MEFs für 24h, 48h oder 72h mit PDGF, EGF oder FGF, in unter 2.2.3.1 genannter Endkonzentration, stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Stimulation mit kaltem PBS beendet, die Zellen tyrsiniert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe Gliederungspunkt 2.2.2.6).

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 DNA-Extraktion

Murine DNA konnte aus einem 0,5cm langen Schwanzstück mittels des Wizard SC Genomic Purification System (von Promega, Mannheim), gemäß den Anweisungen des Herstellers gewonnen werden.

Das Schwanzstück wurde zunächst über Nacht bei 55°C mit 275µl Digestion Solution Mix inkubiert, wodurch zum einen die DNA freigesetzt, zum anderen Proteine und RNA eliminiert wurde. Zur Aufreinigung der DNA wurde ein Säulensystem verwendet. Bei

Raumtemperatur wurde die DNA dazu auf das Wizard Minicolumn Assembly gegeben und viermal mit Wizard SV Wash Solution gewaschen. Durch die Zugabe von 250µl Nuclease-Free Water wurde die DNA im letzten Schritt von der Säule gelöst.

Zur Gewinnung von DNA primärer MEFs wurden tote Zellen aus dem, am Tag nach der Generierung abgenommenem Überstand, verwendet. Dazu wurden die toten Zellen 5min bei 300g abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 0,5ml Embryo-Lysis-Buffer suspendiert und für mindestens 3h auf 55°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf 95°C zur Inaktivierung der Proteinkinase K erhitzt.

2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA in vitro. Dazu wird eine thermostabile DNA-Polymerase z.B. von *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polymerase) verwendet. Dieses Verfahren wurde benutzt, um den genauen Genotyp der Mäuse bzw. der MEFs zu bestimmen. Hierzu wurden in einem PCR-Röhrchen 1µl der aufgereinigten DNA vorgelegt, jeweils 1µl Wildtyp-Primer und 1µl Neo-Primer, 2,0µl dNTP-Mix 0,25mM, 2,0µl 10x Reaktionspuffer sowie 0,25µl Taq-Polymerase hinzugegeben und mit 12,75µl aqua ad injectabilia auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Zur Vervielfältigung des Erbguts wurde ein Thermocycler benutzt. Dieser erhitzte die DNA zur initialen Denaturierung für 5min auf 95°C. Dadurch wurde die doppelsträngige DNA aufgetrennt. Anschließend folgten 35 Zyklen in denen die DNA vervielfältigt wurde. Dabei wurden folgende Schritte zyklusmäßig wiederholt:

1. Denaturierung: Erhitzen der DNA für 30s auf 95°C, um die DNA-Doppelstränge jeweils voneinander zu trennen.
2. Primerhybridisierung/Annealing: Bei einer Temperatur von 62°C kam es zur Anlagerung des Primers an eine spezifische Sequenz. Dieser Schritt dauerte eine Minute.
3. Elogation/Polymerisation: Bei einer Temperatur von 72°C synthetisierte die DNA-Polymerase, vom 3`-Ende kommend, für eine Minute den komplementären DNA-Strang.
4. Anschließend folgte erneut die Denaturierung (entspricht 1.).
5. Nach dem letzten Zyklus wurde die DNA für 10min auf 72°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt.

2.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Entsprechend ihres Molekulargewichts wurde die gewonnene DNA mittels eines 1%-igen Agarosegels aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 200ml 1xTAE mit 2g Agarose in der Mikrowelle erhitzt und nach einer Abkühlung unter 55°C mit 25µl Ethidiumbromid versetzt.

Das getrocknete Gel wurde in eine mit 1x TAE als Laufpuffer gefüllte Kammer gelegt. In die Geltaschen des getrockneten Gels wurde je 18µl DNA und 2µl Farbstoff gegeben. In eine Geltasche kam ein 100bp Molekulargewichtsmarker. An die Laufkammer wurde eine Spannung mit 100V für ca. 90min angelegt, wodurch die negativ geladenen DNA Fragmente zur Anode des elektrischen Feldes wanderten. Die DNA Fragmente konnten unter UV-Licht (Wellenlänge 320nm) von GelDoc 2000 sichtbar gemacht werden.

Die zu erwartende *Bcl10*^{+/+}-Bande hatte eine Größe von 560 Basenpaaren (bp), die *Bcl10*^{-/-}-Bande 336 bp, die *Malt1*^{+/+}-Bande 660bp und die *Malt1*^{-/-}-Bande 400bp.

2.2.4.4 Herstellung nukleärer Zellextrakte

Zur Herstellung nukleärer Extrakte wurden die Zellen, wie unter Gliederungspunkt 2.2.3.1 beschrieben, stimuliert und anschließend die Stimulation mit kaltem PBS gestoppt. Nachdem alle Zellen geerntet waren, wurden die Falcons bei 300g und 4°C für 5min abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden die Zellpellets in 800µl hypoosmolarem Puffer A aufgenommen und die Zellen für 10min zur Lyse auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50µl 10% NP-40 wurde die Zellsuspension für 1min auf einem Vortex Mixer gemischt oder bei 4°C für 5min auf einen Eppendorf Mixer inkubiert. Dadurch wurden die Zellmembranen zerstört. Die Lysate wurden im Anschluss mit 14000rpm bei 4°C 10min zentrifugiert. Zur Dehydratation des Zellkerns wurden die erhaltenen Pellets in 30-40µl hyperosmolarem Puffer C resuspendiert und für 30min unter Bewegung bei 4°C inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt mit 14000rpm bei 4°C für 10min wurden abschließend die Zellreste von den Transkriptionsfaktoren im Überstand getrennt. Die Konzentration der Transkriptionsfaktoren wurde mit der Bradford-Methode bestimmt (siehe Gliederungspunkt 2.2.4.7). Abschließend wurden die Extrakte in Teilmengen von 10µl bei -80°C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

2.2.4.5 NF- κ B ELISA mit Kernextrakten

Zum Nachweis der Translokation von NF- κ B wurden Kernextrakte von den Zellen hergestellt (siehe Gliederungspunkt 2.2.4.4) und eine eventuelle Translokation von NF- κ B mittels Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) untersucht. Dazu wurde das EZ-DetectTM Transcription Factor Kit NF- κ B p65 verwendet, welches die p65 Untereinheit von NF- κ B nachweisen kann. Wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, musste als erstes das aktivierte NF- κ B p65 Protein der Extrakte an die, auf der Platte befindliche, Gegensequenz gebunden werden. Dazu wurde 50 μ l des zuvor hergestellten Binding Puffers in jedem Well vorgelegt und eine identische Menge (ungefähr 3-4 μ g) der Kernextrakte dazugegeben. Als Positivkontrolle wurden 2 μ l der im Kit enthaltenen, TNF α -aktivierten Hela-Zellen verwendet. Anschließend wurde die Platte für 1h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Gemisch danach verworfen worden war, wurde jedes Well dreimal, mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Als nächster Schritt erfolgte die Bindung des p65-Primärantikörpers. Der Primärantikörper wurde 1:1000 mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer verdünnt und 100 μ l davon in jedes Well gegeben. Nachdem die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert worden war, wurde der Erstantikörper abgekippt und die Platte wiederum dreimal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper 1:10000 verdünnt. Nachdem jeweils 100 μ l des verdünnten Sekundärantikörpers in jedes Well gegeben worden war, musste die Platte erneut für 1h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nachdem der Zweitantikörper entfernt worden war und man die Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen hatte, folgte die Detektion mittels Chemilumineszenz. Dazu wurden äquivalente Volumina von Luminol/Enhancer Solution und Stable Peroxide Solution gemischt und jeweils 100 μ l hiervon in jedes Well pipettiert. Die Chemilumineszenz konnte mit einer Charged-coupled Device (CCD) Kamera gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

2.2.4.6 Herstellung zytoplasmatischer Zelllysate

Die unstimulierten und stimulierten Zellpellets aus Gliederungspunkt 2.2.3.1 wurden in 1ml 1xPBS gelöst und bei 4°C für 14000rpm zum Aufbrechen der Zellmembran zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde der Niederschlag zur Lyse zunächst in Flüssigstickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Zellpellet in 50-100 μ l CHAPS-

Puffer gelöst und für 20min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt mit 14000rpm bei 4°C für 5min, um die im Überstand befindlichen Proteine vom Dendritus abzutrennen. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit der Bradford-Methode bestimmt (siehe Gliederungspunkt 2.2.4.7). Der abgenommene Überstand wurde mit demselben Volumen 2xSDS-Page-Proben-Puffer gemischt, 5min auf 100°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.7 Bestimmung des Proteingehalts mit der Bradford-Methode

1µl der neu hergestellten Proteinextrakte (zytoplasmatischen Lysate oder der Kernlysate) wurde mit 100µl des 1 zu 10 verdünnten Bradford-Reagenz auf einer 96-Well-Platte gemischt. Analog dazu wurde eine Kontrollverdünnungsreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0µg BSA/µl CHAPS Puffer (zytoplasmatische Lysate) bzw. /µl Puffer C (Kernextrakte)) aufgetragen und ebenfalls mit dem 1 zu 10 verdünnten Bradford-Reagenz gemischt. Jede Probe/Kontrolle wurde zweifach aufgetragen.

Das Bradford-Reagenz besteht aus Coomassie Brilliant Blue und lagert sich an Proteine an, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm (rot-braun) zu 595nm (blau) bewirkt. Diese Zunahme der Absorption bei 595nm verhält sich direkt proportional zur Proteinkonzentration. Diese Extinktionsveränderung wurde über ein Lesegerät bestimmt und die Daten mit dem Programm „Magellan“ erfasst. Mittels Microsoft Excel wurden die Ergebnisse ausgewertet und die Proteinkonzentration berechnet.

2.2.4.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine der zytoplasmatischen Zelllysate wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Eigentlich wandern die Proteine abhängig von ihrer Größe und ihrer elektrischen Ladung unterschiedlich schnell in einem elektrischen Feld. Für die SDS-PAGE wurden die Proteine jedoch mittels Zugabe von SDS-PAGE-Puffer (Laemmli-Puffer) denaturiert und erhielten durch Bindung von SDS an ihre Positivladungen eine einheitliche Negativladung. Somit wurde die Laufgeschwindigkeit eines Proteins im Gel allein durch seine Größe bestimmt. Dies bedeutet, dass kleinere Proteine eine weitere Laufstrecke in der gleichen Zeit zurücklegen

als größere Proteine [33]. Das Ausmaß der Proteinauftrennung konnte durch den Gehalt von Polyacrylamid im Trenngel bestimmt (7,5%, 10%, 12%) werden. Auf das Trenngel wurde ein 4%-iges Sammelgel geschichtet. Trenn- und Sammelgel wurden wie in unten stehender Tabelle angegeben hergestellt:

Komponenten	Sammelgel 4%	Trenngel		
		7,5%	10%	12%
30%Acrylamid/Bisacrylamid	0,7ml	2,5ml	3,3ml	4,0ml
1,5 M Tris/HCl, pH: 8,8	-	2,5ml	2,5ml	2,5ml
0,5 M Tris/HCl, pH: 6,8	1,2ml	-	-	-
Aqua bidest	3,0ml	4,9ml	4,1ml	3,4ml
10% SDS	50µl	100µl	100µl	100µl
TEMED	5µl	5µl	5µl	5µl
10% APS	25µl	50µl	50µl	50µl

Tabelle 2: Zusammensetzung für jeweils 2 Sammel- und Trenngele (Western blot)

Zunächst wurde das Trenngel hergestellt. Dazu wurde das Trenngel zwischen zwei Glasscheiben gegeben. Eine Schicht destilliertes Wasser darüber, sollte die Bildung von Luftblasen verhindern. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Wasser abgekippt und oben das Sammelgel hinzugefügt. In das Sammelgel wurde während der Polymerisation einen Gelkamm zur Ausbildung von Geltaschen gesteckt. Nachdem dieses polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das fertige Gel in einer Gelkammer befestigt. Die Kammer wurde mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Lysate (hergestellt wie unter Gliederungspunkt 2.2.4.6 beschrieben) wurden für 5min auf 56°C erhitzt. Anschließend wurde jede Geltasche mit ungefähr 5-15µg Protein (maximales Volumen 20µl) beladen. An die Gelkammer wurde zunächst eine Spannung von 80 Volt für ca. 20min angelegt und diese dann im weiteren Verlauf auf 120 Volt erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die blaue Bande des Probenpuffers ca. 0,5 - 1cm vom unteren Rand des Trenngels entfernt war.

2.2.4.9 Immunoblot (Western Blot)

Die Detektion der aufgetrennten Proteine (siehe Gliederungspunkt 2.2.4.10) erfolgte durch Immunoblot (Western Blot). Dazu wurde das elektrophoretisch aufgetrennte zytoplasmatische Zelllysate durch das semidry-blotting Verfahren auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen. Diese Membran ist in der Lage, Proteine zu binden. Hierzu wurden die beiden Glasplatten und das Sammelgel entfernt und

das verbleibende Trenngel für 5min bei Raumtemperatur in 1x Transferpuffer gegeben. Parallel dazu wurde die Membran aktiviert, indem man sie für 1min in Methanol gegeben und anschließend in 1x Transferpuffer gewaschen wurde. Ebenso wurden pro Gel 2 Stück Cellulose-Filter-Papier (Whatman Papier) in Transfer-Puffer gelegt. Anschließend wurde ein angefeuchtetes Filterpapier mit der Membran in die Blotting-Kammer gelegt, das Gel ohne Luftblasen darauf platziert und mit dem zweiten Filterpapier bedeckt. Es wurde für 90min eine Spannung von 25Volt angelegt. Zur Überprüfung, ob der Proteintransfer erfolgreich war, wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S-Reagenz angefärbt. Anschließend wurde die Membran zum Entfärben für ca. 30min in 1xTBST gegeben.

2.2.4.10 Detektion der transferierten Proteine

Nachdem die Membran mit TBST gewaschen worden war (siehe Gliederungspunkt 2.2.4.9), wurden unspezifische Bindungsmöglichkeiten eines Antikörpers blockiert, indem die Membran für ungefähr 1h in 5%ige TBST-Milch inkubiert wurde. Sollten phosphorylierte Proteine detektiert werden, wurde 5% BSA/TBST anstatt 5%ige TBST-Milch verwendet, um unspezifische Bindungen zwischen Milchproteinen und dem späteren Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit einem primären Maus- oder Hasenantikörper inkubiert, der sich gegen spezifische Bestandteile eines bestimmten Proteins richtete. Dazu wurde der Antikörper in 5%iger Milch oder 5%igem BSA verdünnt (meist 1:1000). Am nächsten Tag wurde der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit 1xTBST für jeweils 10min entfernt. Anschließend wurde die Membran für ca. 1h mit einem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000 in 5%iger Milch oder 5%igem BSA) inkubiert, der sich gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers richtete. Als nächstes musste die Membran erneut drei Mal für 10min mit 1xTBST und danach 1x 10min mit 1xTBS gewaschen werden. Für die Lumineszenz der Membran wurde 2ml ECL Western blotting Substrat (hergestellt durch eine 1:1 Mischung von Solution A und Solution B direkt vor dem Gebrauch) für 1-2min auf die Membran gegeben. Das ECL Western blotting Substrat wird durch die horseradish Peroxidase des Sekundärantikörpers in eine lumineszierende Substanz umgewandelt. Die lumineszierende Membran wurde dann im Dunkeln in einer Röntgenfilmkassette auf einen hypersensitiven chemilumineszenten Hyperfilm für eine bestimmte Zeit (30s - 30min) gelegt und anschließend entwickelt.

2.2.4.11 Entfernen von Antikörpern auf der Membran (Stripping)

Um mehrere Proteine auf derselben Membran nachweisen zu können, konnte der zuvor verwendete Antikörper mittels Inkubation für 20min auf 50°C mit Stripping-Puffer entfernt werden. Danach wurde die Membran vier Mal mit TBST gewaschen und anschließend erneut in 5% Milch/TBST oder 5% BSA/TBST geblockt. Die weiteren Schritte verliefen wie unter Gliederungspunkt 2.2.4.10 dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von Bcl10 in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren

Um die Aufgabe von Bcl10 im Signalweg der Wachstumsfaktoren genauer zu analysieren wurden murine embryonale Fibroblasten wie oben beschrieben aus *Bcl10*^{+/-} und *Bcl10*^{-/-} Mäusen gewonnen. Vor Stimulation mit EGF, PDGF oder FGF wurden die Zellen zwei Tage gehungert und dann 1h vor Stimulationsstart mit Cycloheximid zur Hemmung der De-novo-Proteinsynthese inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten stoppte man die Stimulation, erntete die Zellen und analysierte nach Lyse das Proteinmuster mittels Western blot.

3.1.1 Bcl10 abhängige Degradation von IκBα

Zunächst untersuchte man die Degradation von IκBα, ein bekanntes Zielprotein des Bcl10-Malt1-Komplexes. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben gehungert, stimuliert und geerntet. Nach Lyse wurde IκBα mittels Western Blot detektiert. In *Bcl10*^{+/-}-MEFs zeigte sich ein Abbau des Proteins, während in den *Bcl10*^{-/-}-MEFs IκBα unverändert nachweisbar war (siehe Abbildung 11a). Als Positivkontrolle wurden die murinen embryonalen Fibroblasten mit lysophosphaticid acid (LPA) stimuliert. LPA benötigt für eine effektive Aktivierung von IκBα ebenfalls die Anwesenheit von Bcl10 [31, 70]. Als Negativkontrolle fungierte die Stimulation mit tumor necrosis factor α (TNFα), einem Bcl10-unabhängigen IκBα-Aktivator (siehe Abbildung 11b) [54]. Dieses Ergebnis zeigt eine Abhängigkeit der IκBα-Degradation nach EGFR, PDGFR bzw. FGFR-Stimulation von Bcl10.

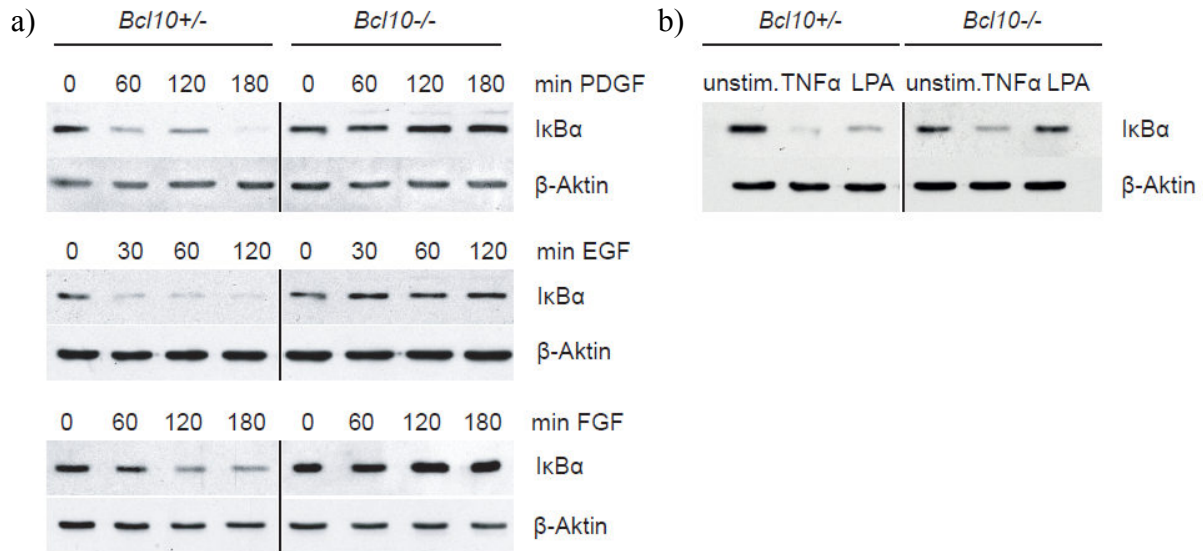


Abbildung 11: Bcl10-abhängige IκBα-Degradation in MEFs nach PDGF-, EGF- und FGF-Stimulation

- a) Murine embryonale Fibroblasten wurden für 48h gehungert, anschließend eine Stunde mit Cycloheximid inkubiert und dann mit EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) bzw. FGF (fibroblast growth factor) stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die Stimulation gestoppt und die Zellen geerntet. Die Proteinfractionen der Zelllysate wurden mittels Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die IκBα-Degradation wurde durch Zugabe von Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von β-Aktin.
 In *Bcl10*^{+/-}-MEFs zeigt sich nach Stimulation mit EGF, PDGF oder FGF eine IκBα-Degradation. Im Vergleich dazu findet der Abbau von IκBα in *Bcl10*^{-/-}-MEFs nicht statt. Dies zeigt, dass Bcl10 essentiell ist für die Degradation von IκBα.
- b) Kontrollstimulation mit LPA und TNFα
 Positivkontrolle: In *Bcl10*^{+/-}-MEFs zeigt sich im Vergleich zu *Bcl10*^{-/-}-MEFs eine regelrechte IκBα-Degradation.
 Negativkontrolle: TNF α führt sowohl in *Bcl10*^{+/-}- als auch in *Bcl10*^{-/-}-MEFs zu einem effektiven Abbau von IκBα.

3.1.2 Bcl10-abhängige Translokation von NF-κB in den Zellkern

Durch die Degradation von IκBα kommt es zur Freilegung der Kernlokalisationsdomäne von NF-κB. Zum Nachweis einer Abhängigkeit der Translokation von NF-κB in den Zellkern wurden erneut *Bcl10*^{+/-}- sowie *Bcl10*^{-/-}-MEFs gehungert, mit EGF oder PDGF stimuliert und anschließend geerntet. Nach Herstellung von Kernlysaten erfolgte die Detektion der p65-Untereinheit von NF-κB mittels ELISA. Im Falle einer Stimulation von *Bcl10*^{+/-}-MEFs mit EGF oder PDGF zeigte sich eine deutliche Präsenz von NF-κB im Zellkern, während man im Falle einer Stimulation von *Bcl10*^{-/-}-MEFs keine Translokation nachweisen konnte. Zur Kontrolle wurde im gleichen Versuchsansatz auch mit LPA und TNF α stimuliert. Erwartungsgemäß zeigte sich im Falle von LPA eine Abhängigkeit der

NF- κ B-Translokation von Bcl10 [31, 70]. TNF α stimulierte NF- κ B unabhängig von der Anwesenheit von Bcl10 [54].

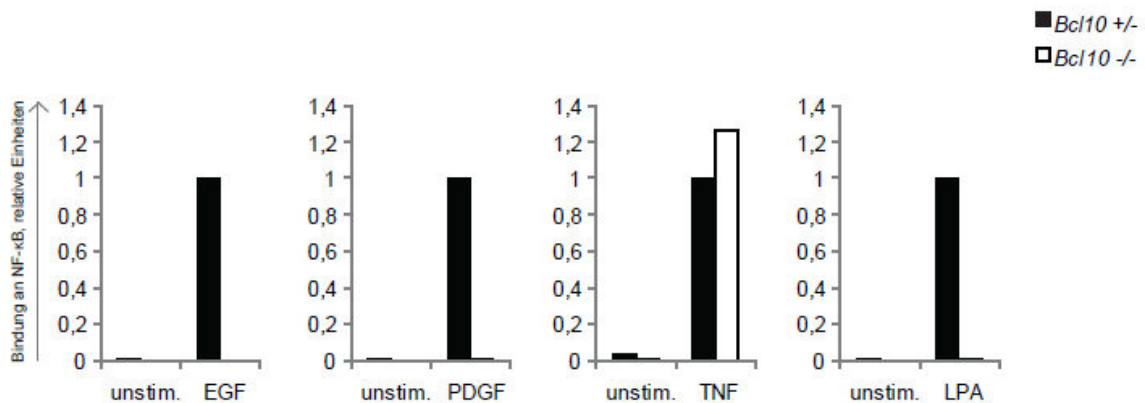


Abbildung 12: Bcl10-abhängige Translokation von NF- κ B in den Zellkern

Murine embryonale Fibroblasten wurden wie in Abbildung 11 beschrieben für 48h gehungert, mit Cycloheximid eine Stunde inkubiert und anschließend mit PDGF oder EGF stimuliert. Nach 60 Minuten im Falle von EGF und nach 120 Minuten im Falle von PDGF wurde die Stimulation beendet und die Zellen geerntet. Die NF- κ B- Translokation in den Zellkern wurde in den Zellkernlysaten durch Zugabe eines p56-Antikörpers mittels ELISA gemessen. Als Kontrolle wurden die MEFs mit tumor necrosis factor α (TNF α ; 30 Minuten) bzw. lysophosphaticid acid (LPA; 60 Minuten) stimuliert. TNF α stimuliert NF- κ B unabhängig von Bcl10, LPA, PDGF sowie EGF hingegen abhängig von Bcl10. Es zeigte sich, dass Bcl10 für eine Translokation von NF- κ B in den Zellkern nach Wachstumsfaktorstimulation benötigt wird.

3.1.3 NF- κ B Aktivierung nach retroviraler Rekonstruktion von Bcl10

Als nächstes erfolgte in *Bcl10*^{-/-}-MEFs eine retrovirale Rekonstruktion von Bcl10. Homozygote knock-out MEFs wurden mit einem Retrovirus infiziert, der entweder Bcl10 (pBabe-puro-Bcl10) oder einen Leervektor (pBabe) exprimierte. Retroviral infizierte MEFs konnten aufgrund ihrer Puromycin-Resistenz durch Zugabe des Antibiotikums über 10 Tage selektioniert werden. Anschließend wurden die Zellen stimuliert und die I κ B α -Degradation mittels Westernblot detektiert. Durch retrovirale Rekonstruktion von Bcl10 zeigte sich eine I κ B α -Degradation im Gegensatz zu den *Bcl10*^{-/-}-MEFs, die mit dem Leervektor infiziert worden waren. Dies postuliert einen direkten Zusammenhang zwischen Bcl10 und I κ B α -Degradation.

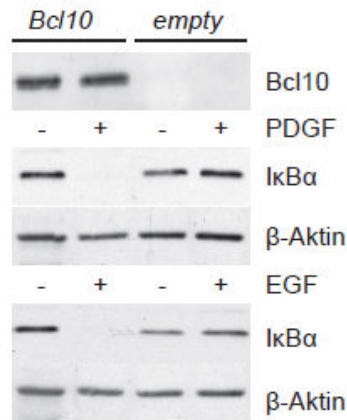


Abbildung 13: Retrovirale Rekonstruktion von Bcl10 in Bcl10-defizienten MEFs ermöglicht IκBα-Degradation nach Stimulation mit PDGF oder EGF

Bcl10-defiziente MEFs wurden mit einem retroviralen Virus (pBABE-puro) wie beschrieben infiziert. Dieser kodierte entweder Bcl10 (pBABE-puro-Bcl10) oder einen Leervektor (pBABE-puro). Retroviral infizierte MEFs wurden durch Zugabe von Puromycin über 10 Tage selektiert. Nach Selektion wurden die MEFs wie in Abbildung 11 beschrieben mit EGF für 60 Minuten oder PDGF für 120 Minuten stimuliert und geerntet. Die Zellysate wurden mittels Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den mit dem pBABE-puro-Bcl10-Vektor infizierten MEFs konnte Bcl10 nachgewiesen werden, während in den mit dem Leervektor infizierten MEFs kein Bcl10 nachweisbar war. Es zeigte sich, dass durch eine retrovirale Rekonstruktion von Bcl10 eine Degradation von IκBα in vorher Bcl10-defizienten MEFs möglich wurde.

3.1.4 Bcl10-unabhängige Aktivierung von MAPK und Akt

Als nächstes untersuchte man die Aktivierung von Proteinen oberhalb von Bcl10 wie mitogen-activated protein (MAP) Kinasen und Akt. In Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass Bcl10 ebenso wie Malt1 Regulatoren der Aktivierung von MAP-Kinasen wie JNK und p38 darstellen [55, 64], während sie nach Stimulation des FcεRI [30] oder des LPA-Rezeptors [31] entbehrlich sind.

Nachdem die Zellysate wie oben beschrieben von stimulierten *Bcl10*^{+/-}- und *Bcl10*^{-/-}-MEFs mittels Western Blot aufgetragen worden waren, erfolgte der Nachweis von p-ERK, p-JNK sowie p-Akt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung sowohl von MAP-Kinasen wie ERK1/2, JNK1 oder p38 als auch die der Proteinkinase B (Akt) in homozygoten *Bcl10*^{-/-}-MEFs identisch ist mit der von heterozygoten *Bcl10*^{+/-} nach Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF oder PDGF.

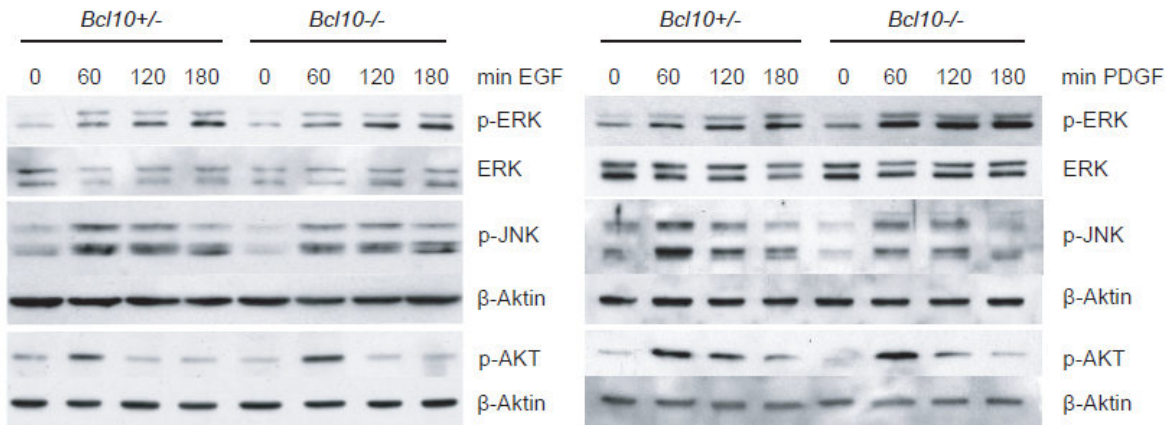


Abbildung 14: Unauffällige Aktivierung von ERK, JNK und AKT durch PDGF und EGF
Bcl10^{+/-} als auch *Bcl10*^{-/-}-MEFs wurden zunächst 48h gehungert und 1h vor Stimulation mit PDGF oder EGF mit Cycloheximid inkubiert. Nach 0, 60, 120, 180min bzw. nach 0, 30, 60, 120min die Stimulation gestoppt und die Zellen geerntet. Die Zellextrakte wurden auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach Zugabe von Antikörpern gegen p-ERK, p-JNK oder p-AKT zeigte sich sowohl in den heterozygoten als auch in den homozygoten knockout-MEFs ein unauffälliges Phosphorylierungsverhalten. Als Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von ERK bzw. β-Aktin.

3.1.5 Akt als Regulator der NF-κB Aktivierung

Unklar war bis hierher welches Signalprotein nach Wachstumsrezeptorstimulation zur Aktivierung von Bcl10 führt. Das Augenmerk wurde dabei auf die Phosphokinase C (PKC) sowie auf Akt gerichtet. Denn zum einen ist ein Zusammenhang zwischen Aktivierung von PKC und Formierung des Bcl10-Malt1-Komplexes aus Versuchen mit Zellen des Immunsystems [23, 63] und aus Stimulation von MEFs mit LPA [31] bekannt, zum anderen wurde eine Abhängigkeit der NF-κB-Aktivierung von Akt nach PDGF-Stimulation gezeigt [50]. Um eine solche Abhängigkeit zu beweisen bzw. auszuschließen präinkubierte man die Zellen entweder mit dem PKC-Inhibitor Rottlerin oder mit Wortmannin, einem Inhibitor der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), die zur Akt-Aktivierung führt. Im Falle einer PKC-Blockade zeigte sich eine regelrechte IκBα-Degradation während diese nach Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges ausblieb.

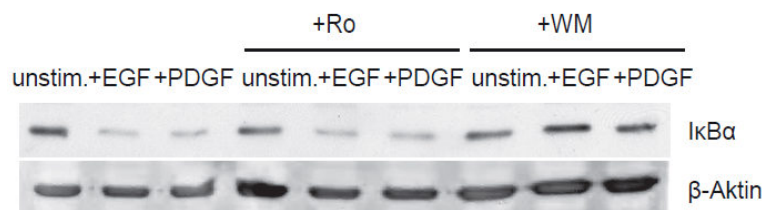


Abbildung 15: PI3/Akt, nicht PKC, reguliert die NF-κB-Aktivierung nach Wachstumsfaktor-stimulation

Nachdem die MEFs 48h gehungert waren, wurden die Zellen 1h vor PDGF-Stimulation mit Cycloheximid und Wortmannin (WM) oder Rottlerin (Ro) inhibiert. Die Zellen wurden mit EGF 1h und mit PDGF 2h stimuliert und anschließend geerntet.

Ro ist ein Inhibitor der Proteinkinase C (PKC). WM inhibiert den Phosphatidyl-Inositol-3/Akt-Signalweg. Als Kontrolle erfolgte eine Stimulation von *Bcl10*^{+/-}-MEFs ohne Anwesenheit von WM oder Ro. Es zeigte sich eine intakte IκBα-Degradation in der Anwesenheit des PKC-Inhibitors Rottlerin. Nach Zugabe von Wortmannin fand keine IκBα-Degradation statt.

3.2 Die Rolle von Malt1 in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Anwesenheit von Bcl10 essentiell ist für eine Aktivierung von NF-κB, interessierte im Weiteren die Rolle von Malt1. Denn nicht in allen Signalwegen ist die Anwesenheit sowohl von Bcl10 als auch von Malt1 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors notwendig. So hat die Abwesenheit von Malt1 keine großen Auswirkungen auf die Aktivierung von B-Zellen bzw. den Verschluss des Neuralrohrs. In T-Zellen hingegen ist die Ausbildung des Bcl10-Malt1-Komplexes unentbehrlich für eine effektive Aktivierung [55].

Zur Analyse des Einflusses von Malt1 wurden murine embryonale Fibroblasten aus Verpaarungen von *Malt1*^{+/-}- mit *Malt1*^{-/-}-Mäusen gewonnen. Nach Genotypisierung wurden die MEFs analog den Versuchen mit Bcl10-MEFs für 48h gehungert, anschließend 1h mit Cycloheximid inkubiert und dann mit Wachstumsfaktoren stimuliert. Zu festen Zeitpunkten wurde die Stimulation beendet und die MEFs geerntet. Zur Analyse wurden entweder Zell- oder Kernlysate hergestellt.

3.2.1 Malt1-abhängige Degradation von IκBα

Analog zu den Versuchen unter 3.1.1 wurden die *Malt1*^{+/-}- und *Malt1*^{-/-}-MEFs nach einer Hungerperiode und einer Inkubation mit Cycloheximid mit Wachstumsfaktoren stimuliert. Nachdem die Stimulation gestoppt und die Zellen geerntet worden waren, wurden Zelllysate hergestellt. Zur Untersuchung der IκBα-Degradation erfolgte die Auftrennung dieser Lysate mittels Western blot. In den *Malt1*^{+/-}-MEFs zeigte sich ein regelrechter IκBα-Abbau, während dieser in *Malt1*^{-/-}-MEFs ausblieb.

Dies zeigt, dass neben Bcl10 auch Malt1 für eine IκBα-Degradation benötigt wird.

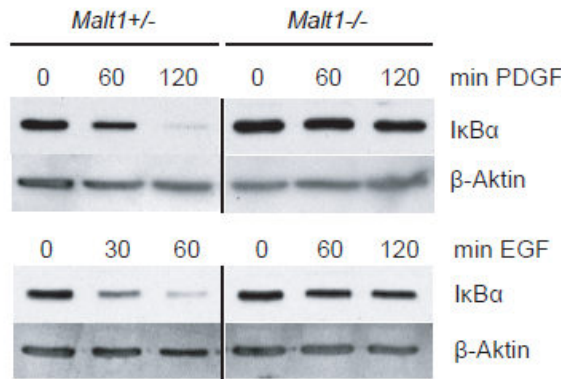


Abbildung 16: Malt1-abhängige IκBα-Degradation in MEFs nach PDGF- und EGF-Stimulation
 Für 48h gehungerte MEFs wurden zunächst für 1h mit Cycloheximid inkubiert, anschließend stimuliert und die Stimulation zu den angegebenen Zeitpunkten beendet. Geerntete und dann im Weiteren lysierte Zellen wurden mittels Western blot analysiert. In *Malt1*^{+/-}-MEFs kann ein Abbau von IκBα nach Stimulation nachgewiesen werden, was bei *Malt1*^{-/-}-MEFs nicht der Fall ist. Daher kann gefolgert werden, dass neben der Anwesenheit von Bcl10 auch Malt1 zur Initiierung der IκBα-Degradation notwendig ist.

3.2.2 Malt1-abhängige Translokation von NF-κB in den Zellkern

Als nächstes wurde in den stimulierten *Malt1*^{+/-}- sowie *Malt1*^{-/-}-MEFs die Translokation von NF-κB in den Zellkern untersucht. In Kernextrakten erfolgte mittels ELISA der Nachweis der p65-Untereinheit von NF-κB.

Eine Translokation des Transkriptionsfaktors konnte in den Kernextrakten von *Malt1*^{+/-}-MEFs im Gegensatz zu den Kernlysaten von *Malt1*^{-/-}-MEFs nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden auch bei diesem Versuch sowohl heterozygote als auch Malt1-defiziente Zellen mit lysophosphaticid acid (LPA) und tumor necrosis factor α (TNFα) stimuliert.

Dies zeigte neben der Anwesenheit des Signalproteins Bcl10 auch Malt1 notwendig ist, um eine NF-κB-Aktivierung zu bewirken.

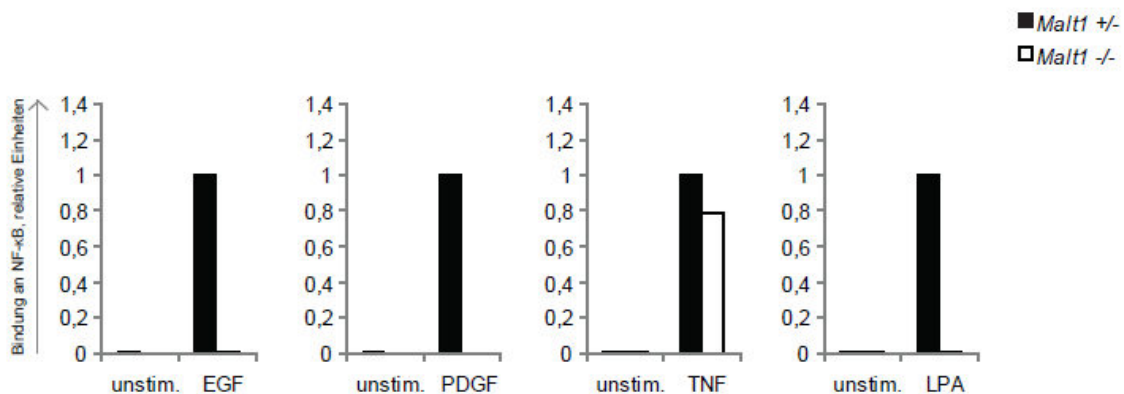


Abbildung 17: Malt1-abhängige Translokation von NF-κB in den Zellkern
 Murine embryonale Fibroblasten wurden wie in Abbildung 16 beschrieben für 48h gehungert, mit Cycloheximid eine Stunde inkubiert und anschließend mit PDGF für 120

Minuten oder EGF für 60 Minuten stimuliert. Im Anschluss wurde die Stimulation beendet und die Zellen geerntet. Die NF- κ B- Translokation in den Zellkern wurde in den Zellkernlysaten durch Zugabe eines p56-Antikörpers mittel Elisa gemessen. Als Kontrolle wurden die MEFs mit tumor necrosis factor α (TNF α) bzw. lysophosphaticid acid (LPA) stimuliert. TNF α stimuliert NF- κ B unabhängig von Malt1, LPA, EGF sowie PDGF hingegen abhängig von Malt1. Es zeigte sich, dass Malt1 für eine Translokation von NF- κ B in den Zellkern nach Wachstumsfaktorstimulation benötigt wird.

3.2.3 Malt1-unabhängige Aktivierung von MAP-Kinasen

Desweiteren interessierte eine eventuelle Abhängigkeit der Aktivierung von Signalproteinen oberhalb des Bcl10-Malt1-Komplexes wie die mitogen-activated protein Kinasen (MAPK) von der Anwesenheit von Malt1.

Gehungerte *Malt1*^{+/-}- sowie *Malt1*^{-/-}-MEFs wurden mit Cycloheximid inkubiert und anschließend stimuliert. Die zu gewissen Zeitpunkten geernteten Zellen wurden wiederum lysiert. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot aufgetrennt und es erfolgte der Nachweis von phosphoryliertem ERK. In heteroygoten *Malt1*^{+/-}-MEFs zeigte sich ebenso wie in *Malt1*^{-/-}-MEFs ein unauffälliges Phosphorylierungsmuster, so dass die Anwesenheit von Malt1 entbehrlich ist für die Aktivierung dieses Signalproteins.



Abbildung 18: Unauffällige Aktivierung von ERK durch PDGF und EGF in *Malt1*^{+/-} und *Malt1*^{-/-} *Malt1*^{+/-}- und *Malt1*^{-/-}-MEFs wurden 48h gehungert, 1h mit Cycloheximid inkubiert und anschließend stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Stimulation beendet und die Zellen geerntet. Anschließend erfolgte eine Proteinauftrennung mittels Western blot. Nach Inkubation mit Antikörper gegen p-ERK zeigte sich auch hier kein Einfluss von Malt1 auf die Phosphorylierung von ERK. Als Ladekontrolle erfolgte der Nachweis von ERK.

3.3 Bcl10-abhängige Expansion von MEFs nach Wachstumsfaktorstimulation

Ob diese Ergebnisse auch eine funktionelle Bedeutung hinsichtlich Überleben oder Proliferation haben wurde untersucht, indem man für zwei Tage gehungerte MEFs mit PDGF, EGF oder TNF α stimulierte und zum Zeitpunkt 0, 24, 48 und 72h (nach Stimulation) die Zellzahl auszählte. Die Anzahl von *Bcl10*^{-/-}-MEFs war unter Wachstumsfaktorstimulation im Vergleich zu der der *Bcl10*^{+/-}-MEFs nicht zunehmend.

Stimulierte man die Zellen mit TNF α war kein Unterschied zwischen *Bcl10*^{+/-}- und *Bcl10*^{-/-}-MEFs erkennbar.

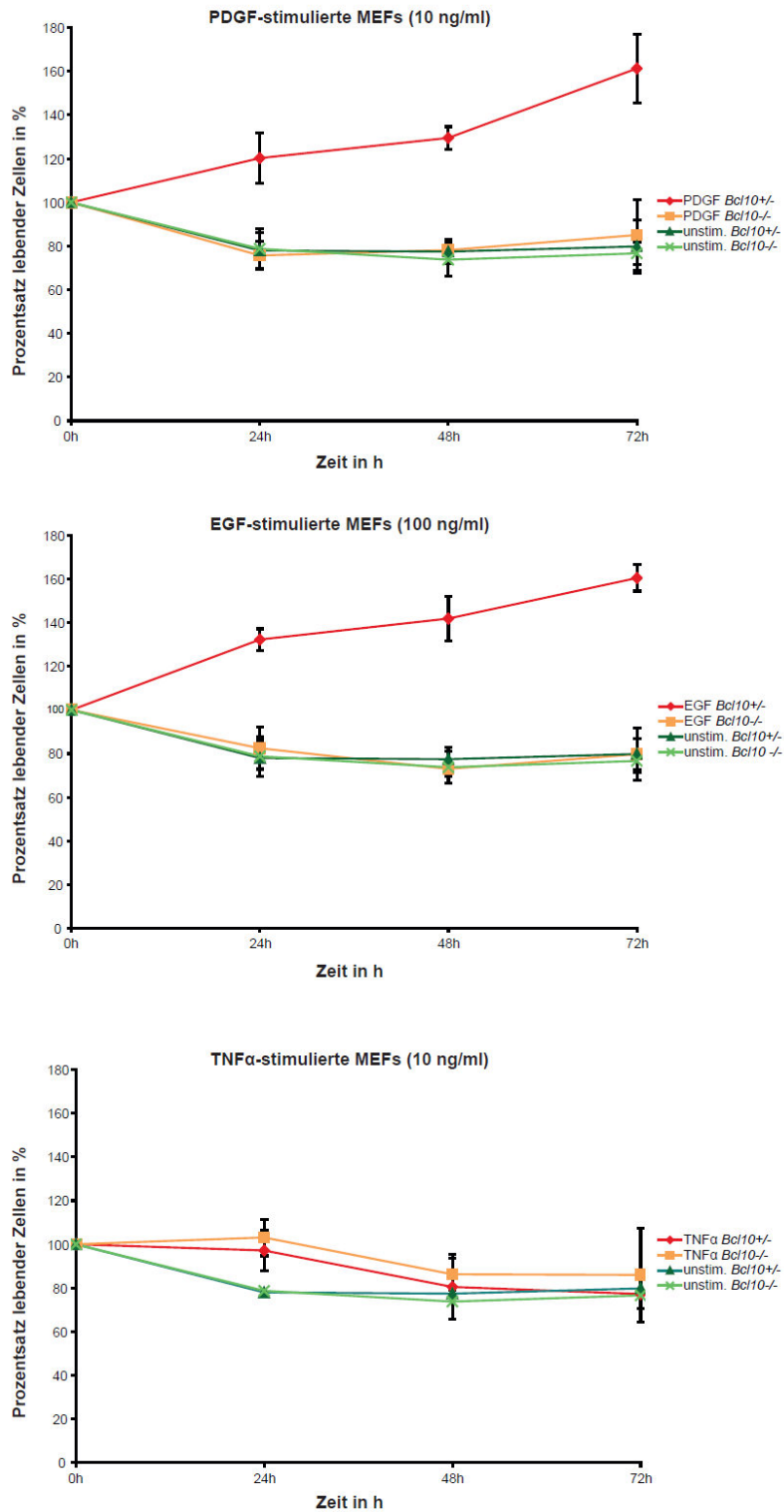


Abbildung 19: Verhinderung des Zelltods durch Zugabe von EGF oder PDGF in *Bcl10*^{+/-}-MEFs
 Die MEFs wurden zunächst mit einer Dichte von 6×10^4 pro Well ausgelegt und anschließend 48h in DMEM mit 1% FCS gehungert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit PDGF, EGF oder TNF α . Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Stimulation gestoppt und die Zellen geerntet. Anschließend wurden die MEFs mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Aus 3 voneinander unabhängigen Messungen

wurden jeweils die Mittelwerte sowie die zugehörigen Standardabweichungen berechnet, die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% gesetzt.

Es zeigte sich, dass *Bcl10*^{+/-}-MEFs durch Zugabe von PDGF und EGF einen deutlichen Überlebensvorteil hatten. *Bcl10*^{-/-}-MEFs hingegen konnten dem Zelltod durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren nicht entkommen. Erwartungsgemäß starben unter Stimulation mit TNF α annähernd gleich viele *Bcl10*^{+/-}-MEFs wie *Bcl10*^{-/-}-MEFs.

3.4 Schematische Zusammenfassung

Wachstumsfaktorrezeptoren wie PDGF-, EGF- und FGF-Rezeptoren aktivieren nach Ligandenbindung unterschiedliche Signalwege, die unter anderem zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern führen. In nachfolgender Abbildung ist die Rolle von Bcl10 und Malt1 dabei schematisch dargestellt.

Liganden binden an die extrazelluläre Domäne des Wachstumsfaktorrezeptors, dadurch wird die intrazelluläre Tyrosinkinase aktiviert und unterschiedliche Signalwege durch Rekrutierung und nachfolgender Aktivierung von Proteinen angeschaltet. So auch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase und Akt. Dies führt zur Formierung des Bcl10-Malt1-Komplexes. Dieser Komplex aktiviert I κ B Kinasen (IKK), welche im Folgenden wiederum I κ B α phosphorylieren. Nach Ubiquitinierung wird I κ B α im Proteasom der Zelle abgebaut. Der Kernlokalisationsabschnitt von NF- κ B wird dadurch freigelegt, worauf NF- κ B in den Zellkern wandert.

Nach Ligandenbindungen an den Rezeptor kommt es des Weiteren zur Aktivierung von MAP-Kinasen. Dieser Prozess ist jedoch unabhängig von Bcl10 oder Malt1.

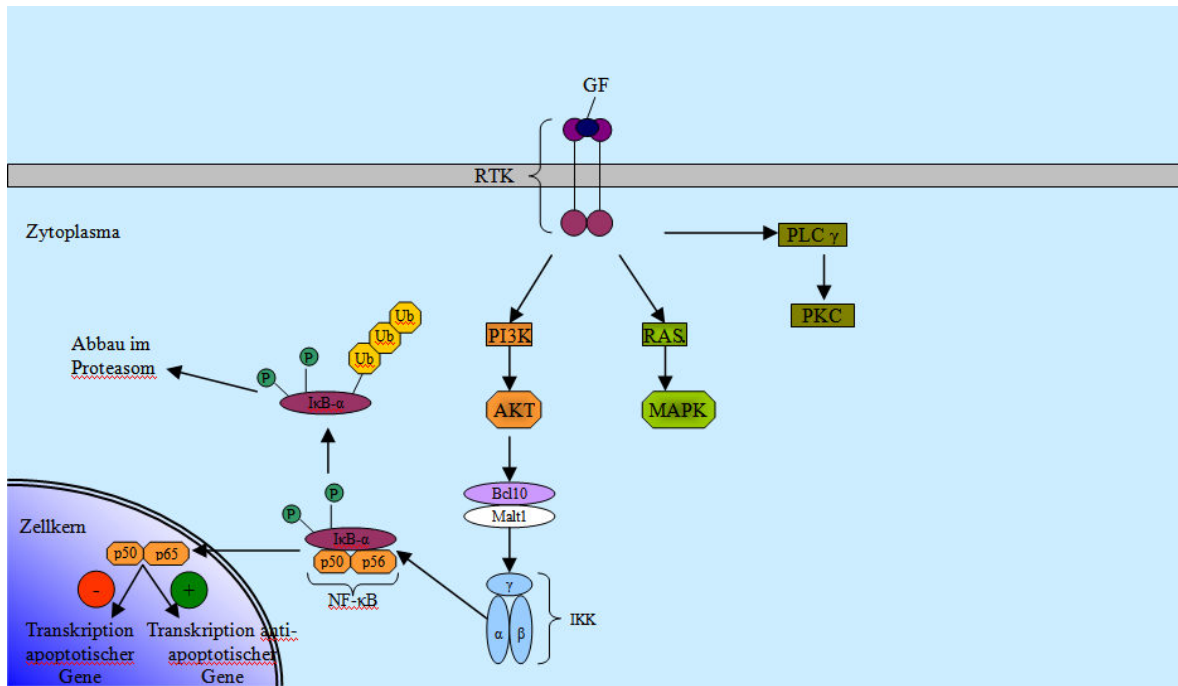


Abbildung 20: Schematische Darstellung der NF-κB-Aktivierung durch Wachstumsfaktor-stimulation

Durch Bindung eines Wachstumsfaktors (GF; dunkel lila) an seinen Rezeptor, eine Rezeptortyrosinkinase (RTK; lila) kommt es zur Dimerisierung/Oligomerisierung des Rezeptors. Dies wiederum führt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase. Durch Phosphorylierung unterschiedlicher Signalproteine wird der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3; orange)/Akt (orange)-Signalweg in Gang gesetzt. Die Formierung des Bcl10/Malt1-Komplexes führt zur Aktivierung der IκB Kinases (hellblau). Diese phosphorylieren IκBα (lila). Phosphoryliertes IκBα wird im Proteasom abgebaut. NF-κB wandert durch Freilegung der Kernlokalisationsdomäne in den Nucleus der Zelle. NF-κB unterstützt im Zellkern die Transkription anti-apoptotischer Gene und hemmt die Transkription apoptotischer Gene.

Die Ligandenbindung an die Rezeptortyrosinkinase führt des Weiteren noch zur Aktivierung der Phospholipase Cγ (PLCγ; olivgrün) und zum Anschalten des RAS-Signalweges (grün).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Bcl10 und Malt1 nach Rezeptortyrosinkinaseaktivierung durch Wachstumsfaktoren untersucht.

4.1 *Bcl10*- und *Malt1*-abhängige NF- κ B-Aktivierung nach Rezeptortyrosinkinaseaktivierung

Rezeptortyrosinkinase spielen eine entscheidende Rolle zur Erhaltung einer Balance zwischen Zellteilung und -wachstum auf der einen sowie Apoptose auf der anderen Seite in unterschiedlichen Geweben [7, 37]. Obwohl in der Vergangenheit bereits gezeigt werden konnte, dass dabei NF- κ B eine wesentliche Rolle spielt [29, 43, 50], war über den Signalweg kaum etwas bekannt. Eine Abhängigkeit von Bcl10 und Malt1 wurde aus mehreren Gründen als möglich erachtet.

So wird Bcl10 während der gesamten Entwicklung in allen Geweben exprimiert. Bei Abwesenheit von Bcl10 kam es bei 1/3 der Mäuseembryonen zu Defekten im Neuralrohrschluss mit Entwicklung eines Exencephalus, woran die Embryonen nach Tag 18,5 der Schwangerschaft verstarben [54]. Auch die ebenfalls ubiquitär vorkommenden Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. PDGFR, EGFR oder FGFR spielen in der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle und können bei Fehlregulation u.a. zu Tumoren des Nervensystems führen [3, 4, 59]. Ein Zusammenhang zwischen beiden konnte deswegen durchaus als möglich erachtet werden.

Darüberhinaus konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass Bcl10 und Malt1 neben den sehr gut untersuchten Abhängigkeiten in Signalwegen von lymphoiden Zellen [54, 55, 65] auch in nicht-lymphoiden Zellen eine Rolle spielen. So ist die NF- κ B-Aktivierung und Zytokinproduktion z.B. nach Fc ϵ RI-Stimulation in Mastzellen als Vertreter der myeloiden Zellreihe des Immunsystems [30] oder in murinen embryonalen Fibroblasten, als nicht-immun Zellen, nach G-Protein-gekoppelter Rezeptorstimulation durch LPA [31, 70] abhängig von Bcl10 und Malt1. Diese Ergebnisse wie auch der in der Embryogenese gesehene Neuralrohrschlussdefekt zeigen eine Rolle von Bcl10 und Malt1 nicht nur in lymphoiden Zellen sondern auch in zahlreichen anderen Zelltypen.

Der wesentlichste Punkt, warum ein Zusammenhang zwischen NF- κ B-Translokation in den Zellkern nach Rezeptortyrosinkinaseaktivierung durch Wachstumsfaktoren und Bcl10 bzw. Malt1 vermutet wurde, ist die Tyrosinkinaseaktivität der

Rezeptortyrosinkinasen. Betrachtet man die Signalwege von Fc-, NK-Zell-, T-Zell-, B-Zell- oder Lektin-Rezeptoren, fällt auf, dass all diese Rezeptoren zur Initiierung der Bcl10-abhängigen NF- κ B-Translokation in den Zellkern eine Tyrosinkinase aktivieren [21, 22, 24, 30, 54, 55]. So ist zu vermuten, dass auch im Falle einer NF- κ B-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren die Formierung des Bcl10/Malt1-Komplexes essentiell ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Mechanismus der NF- κ B Aktivierung nach Rezeptortyrosinkinasenstimulation durch Wachstumsfaktorenbindung genauer dargestellt werden.

Durch die Verwendung von *Bcl10*^{-/-}- und *Malt1*^{-/-}-MEFs konnte wie vermutet eine Abhängigkeit des Abbaus von I κ B α und eine daraus resultierende NF- κ B- Translokation in den Zellkern gezeigt werden. In MEFs, in denen kein Bcl10 bzw. Malt1 anwesend war, kam es zu keiner Degradation und auch keiner NF- κ B-Aktivierung. Konform mit früheren Untersuchungen hatte eine effektive NF- κ B-Aktivierung nach PDGFR-Stimulation einen anti-apoptischen Effekt auf die Zellen [50]. Dieser Zusammenhang konnte auch mit EGF stellvertretend für weitere Wachstumsfaktoren gesehen werden. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation des PDGFR durch PDGF-BB zur Transkription anti-apoptischer Gene als auch zur Induktion von c-Myc führt. C-Myc besitzt sowohl proliferative als auch eine apoptose-induzierende Wirkung, die durch die Anwesenheit verschiedener Cytokine wie z.B. PDGF unterdrückt werden kann [15, 25]. Interessanterweise konnte eine durch c-Myc-vermittelte Apoptose nicht durch Zugabe von EGF verhindert werden [25]. Hingegen konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass EGF in der Lage ist, den Zelluntergang nach Stimulation des Death receptors z.B. durch Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) zu verhindern. Dabei kommt es in Folge der NF- κ B-Aktivierung zu einer vermehrten Expression des anti-apoptischen Gens *Mcl1* [18, 20]. Die vermehrte Transkription von anti-apoptischen im Vergleich zu pro-apoptischen Genen nach Wachstumsfaktorstimulation ist bedingt durch einen unterschiedlichen Acetylierungs- und Phosphorylierungsgrad von NF- κ B bzw. hemmt die Transkription der anti-apoptischen Gene die apoptose-induzierende Wirkung z.B. von c-Myc. So kommt es im Falle einer NF- κ B-Aktivierung nach Wachstumsfaktorstimulation zu einer Komplexbildung des Transkriptionsfaktors mit einer Histon-Acetyltransferase (HAT) im Bereich anti-apoptischer Gene, während es im Bereich pro-apoptischer Gene zur Anlagerung einer Histon-Deacetylase (HDAC) kommt. Dadurch kommt es zu einem Überwiegen der Transkription von apoptose-verhindernden Genen (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22) [20, 50].

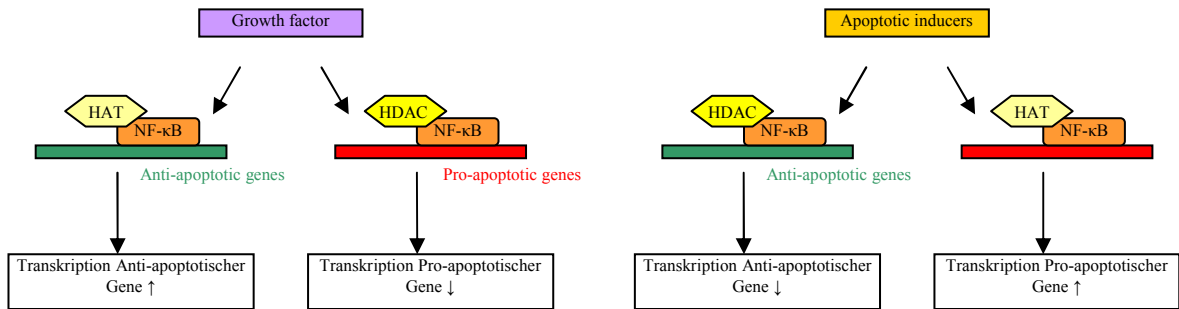


Abbildung 21: Regulation der Gentranskription nach NF-κB-Aktivierung [20]

Je nachdem, ob NF-κB (orange) einen Komplex mit einer Histon-Acetyltransferase (HAT; hellgelb) bildet oder mit einer Histon-Deacetylase (HDAC; dunkelgelb) wird die Transkription der Gene gefördert bzw. gehemmt. Im Falle einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren kommt es zur Ausbildung eines NF-κB-HAT-Komplexes im Bereich antiapoptotisch wirkender Gene (grün), wodurch diese Gene vermehrt abgelesen werden. Im Bereich von apoptoseinduzierenden Genen (rot) hingegen kommt es durch die Komplexbildung von NF-κB mit HDAC zu einer verminderten Transkription. Wird NF-κB jedoch durch einen zelltodinduzierenden Liganden aktiviert, bildet sich der NF-κB-HDAC-Komplex im Bereich antiapoptotisch wirkender Gene und der NF-κB-HAT-Komplex im Bereich apoptosefördernder Erbschnitte. Dadurch werden vermehrt Gene abgelesen, welche den Zelltod induzieren.

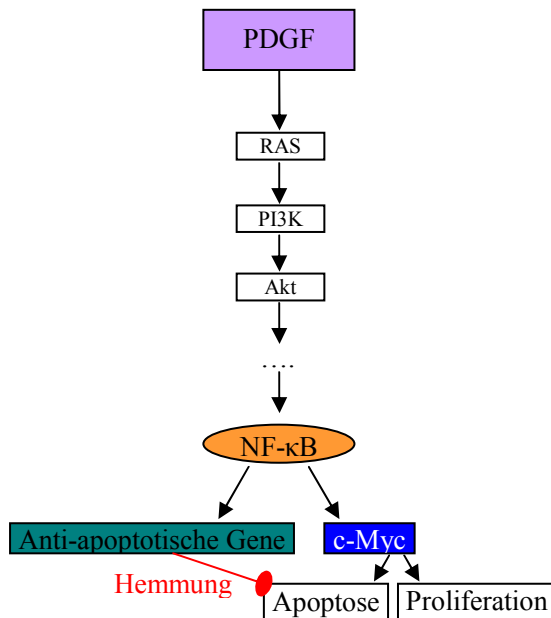


Abbildung 22: Modell zur Inhibition der c-Myc induzierten Apoptose im Falle einer PDGF-Stimulation in der Zelle [50]

Die Stimulation der Zelle mit PDGF führt zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3/Akt-Signalweges. Über mehrere Zwischenschritte kommt es schließlich zur Translokation von NF-κB in den Zellkern. Dies führt zum einen zur Induktion von cMyc, zum anderen zur vermehrten Transkription anti-apoptotischer Gene. Diese Transkriptionsprodukte hemmen die apoptose-induzierende Wirkung von cMyc, sodass es am Ende zu einem Überwiegen der anti-apoptotischen Signale kommt. Der c-Myc induzierte Zelltod wird somit verhindert.

Allerdings gibt es neben der Gemeinsamkeit der Bcl10/Malt1-Abhängigkeit auch Unterschiede in den NF- κ B-Aktivierungswegen nach Stimulation von Wachstumsfaktorrezeptoren, BCRs, TCRs, Fc ϵ Rs oder G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren durch LPA.

Zum einen unterscheiden sich die oben genannten Rezeptoren dahingehend, dass die Aktivierung von MAP-Kinasen nicht einheitlich bezüglich ihrer Abhängigkeit von Bcl10 und Malt1 stattfindet. So konnte in Lymphozyten gezeigt werden, dass die Formierung des Bcl10/Malt1-Komplexes nicht nur für die Aktivierung von NF- κ B entscheidend ist, sondern sie ist ebenfalls essentiell für eine Aktivierung der MAP-Kinasen Jnk und p38 [55, 64]. Hingegen ist die Phosphorylierung der MAP-Kinasen im Falle einer Stimulation des Fc ϵ R oder des LPA-Rezeptors unabhängig von der Anwesenheit jenes Signalkomplexes [30, 31]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Wachstumsfaktorstimulation ebenfalls unabhängig von Bcl10 bzw. Malt1 zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAP-Kinasen kommt. Konform zu diesen Erkenntnissen wurde in einer Publikation veröffentlicht, dass der PI3/Akt-Signalweg keinen Einfluss auf die ERK2-Phosphorylierung nach PDGF-Stimulation hat [10]. Jedoch ist die Aktivierung von Akt notwendig zur Formierung des Bcl10-Malt1-Komplexes, wie weiter unten dargestellt wird. Allerdings muss erwähnt werden, dass man aufgrund des verwendeten JNK-Antikörpers keine Aussage treffen kann, ob es einen möglichen Unterschied in der Aktivierung der einzelnen Jnk-Isoformen gibt. Konnte doch in einer Publikation gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von JNK2, aber nicht von JNK1 nach TCR-Stimulation abhängig ist von Bcl10. Daher muss davon ausgegangen werden, dass JNK1 und JNK2 unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen [6].

Zum anderen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung von Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase und Akt nach Stimulation der MEFs mit Wachstumsfaktoren verantwortlich ist für eine Degradation von I κ B α mit anschließender Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Wurde nämlich durch Zugabe von Wortmannin den PI3K/AKT-Signalweg gehemmt, kam es zu keiner Degradation von I κ B α . Interessanterweise hatte eine pharmakologische Inhibition der Proteinkinase C durch Rottlerin keine Auswirkungen auf die I κ B α -Degradation. Diese Ergebnisse sind konform mit früheren Erkenntnissen, die ebenfalls zeigten, dass eine Hemmung der Proteinkinase C-Aktivität keinen Einfluss auf die NF- κ B-Aktivierung nach Wachstumsfaktorstimulation hat [18, 43, 50]. Darüberhinaus konnte in publizierten Daten gezeigt werden, dass es im Rahmen der NF- κ B-Aktivierung nach PDGF-Stimulation über Akt zur Aktivierung des

IKK-Komplexes mit nachfolgender Phosphorylierung und Degradation von I κ B α kommt [50]. Dies steht im Gegensatz zu Erkenntnissen, die in lymphoiden, in Mastzellen bzw. MEFs nach LPA-Stimulation gefunden wurden. Hier konnte PKC als Signalprotein oberhalb des Bcl10/Malt1-Komplexes detektiert werden [23, 30, 31, 63].

4.2 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bcl10 und Malt1 eine zentrale Rolle bei Aktivierung von NF- κ B durch Wachstumsfaktoren spielt. Durch diesen genaueren Einblick in diesen Signalweg könnten neue Therapieoptionen durch die Blockade dieses Komplexes entstehen mit eventuell geringerem Nebenwirkungsprofil.

Asthma, rheumatoide Arthritis oder Krebserkrankungen sind Beispiele für Krankheiten, bei denen die Dysregulation bzw. die erhöhte Aktivität von NF- κ B eine Rolle in der Pathogenese spielt. Es wurden bisher verschiedene Therapeutika entwickelt, die den NF- κ B-Signalweg blockieren und somit ein Voranschreiten verhindern bzw. ein erhöhtes Ansprechen auf Chemotherapeutika vermitteln. Allerdings haben die meisten dieser Substanzen durch die Hemmung zahlreicher anderer Signalwege gravierende Nebenwirkungen, sodass sie medizinisch meist keine Bedeutung finden [20]. Daher ist es wichtig, die Details einzelner Signalwege noch genauer aufzuzeigen, um eine möglichst exakte Blockade eines Signalwegs zu erreichen. Der Bcl10/Malt1-Komplex könnte solch eine Zielstruktur darstellen. Durch die Blockade dieses Komplexes könnte eventuell das Ansprechen eines Tumors auf Chemotherapeutika erhöht bzw. wiederhergestellt werden. Denn es ist bekannt, dass der Zelltod von Tumorzellen, welcher durch diverse Substanzen, wie z.B. TNF α - oder tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) induziert werden kann, durch die Stimulation des EGFR, NF- κ B-vermittelt, verhindert werden kann [18, 56]. Durch eine Hemmung des hier aufgezeigten Signalweges könnte die, nach Wachstumsfaktorstimulation, überwiegende anti-apoptotische/proliferative Wirkung von NF- κ B gehemmt werden, wodurch es zu einer stärkeren Gewichtung des Zelltod-induzierenden Effekts kommt.

Desweiteren wird in Zukunft zu untersuchen sein, welche Rolle Bcl10 und Malt1 bei der Entstehung von bösartigen Tumoren spielen, bei denen bekannterweise eine Deregulation von Rezeptortyrosinkinasen vorliegt. So spielt z.B. das Fusionsprotein TEL/PDGFR β , welches durch die Translokation t(5;12)(q33;p13) entsteht, eine Rolle in der Pathogenese

der chronisch myelomonozytären Leukämie im Menschen. Dieses Fusionsprotein führt zu einer ständigen Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität des PDGFR β [19].

5 Zusammenfassung

Sowohl der Transkriptionsfaktor NF- κ B als auch Wachstumsfaktoren spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von Proliferation und Überleben einerseits sowie Apoptoseinduktion in einer Zelle andererseits.

So ist zum einen eine kontrollierte NF- κ B-Aktivierung entscheidend für eine effektive Immunantwort, zum anderen führt die Fehlregulation des Transkriptionsfaktors u.a. zur Entstehung von Lymphomen. Ähnlich verhält es sich im Falle der Wachstumsfaktoren. Durch die Bindung an ihre Rezeptoren setzen sie intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die für die Erhaltung des zellulären Gleichgewichts sorgen. Bekannterweise ist der „NF- κ B-Signalweg“ an dieser Signaltransduktion beteiligt. Kommt es allerdings z.B. zur Überexpression oder Mutationen der Rezeptoren, wird dieser empfindliche Mechanismus gestört. Dies führt u.a. zur Entstehung bösartiger Erkrankungen. Ein Beispiel hierfür ist das durch Translokation entstehende Fusionsprodukt TEL/PDGFR das zu einer ständigen Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität des PDGFR β führt. TEL/PDGFR spielt eine Rolle in der Pathogenese der myelomonozytären Leukämie.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine eventuelle Beteiligung der Adaptorproteine B cell lymphoma 10 (Bcl10) sowie Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (Malt1) an der NF- κ B-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren untersucht. Wachstumsfaktorrezeptoren sind Rezeptortyrosinkinasen und genau diese Tyrosinkinaseaktivität ließ eine Beteiligung dieser Signalproteine an der NF- κ B-Aktivierung vermuten. Denn in vielen Signalwegen in denen eine Formierung des Bcl10/Malt1-Komplexes essentiell für eine Translokation von NF- κ B im Zellkern ist, kommt es zur Aktivierung einer Tyrosinkinase. Durch Stimulation von Bcl10- sowie Malt1-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten konnte eine solche Abhängigkeit gezeigt werden. Stimulierte man Bcl10- bzw. Malt1-defiziente MEFs mit Wachstumsfaktoren kam es im Gegensatz zur Stimulation von MEFs, die diese Proteine exprimierten, zu keiner I κ B α -Degradation und somit auch zu keiner Freisetzung von NF- κ B. Desweiteren zeigte sich, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors abhängig von Akt ist. Eine Inhibition des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweges verhinderte den Abbau von I κ B α . Die Hemmung der Proteinkinase C hingegen hatte darauf keinen Einfluss.

Neben der Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung von Bcl10 und Malt1 wurde eine Funktion dieser Signalproteine in der Aktivierung der MAP-Kinasen analysiert. Die

Abwesenheit der beiden Proteine hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Kinasen nach MEF-Stimulation.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nach Rezeptortyrosinkinasestimulation durch Wachstumsfaktoren abhängig von Bcl10 und Malt1 zur Degradation von I κ B α und somit zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern führt. Somit konnte in dieser Arbeit der Bcl10/Malt1-Komplex als essentieller Bestandteil der NF- κ B-Aktivierung nach Rezeptortyrosinkinasestimulation identifiziert werden.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. Acuto, O. and Michel, F., *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 939-51.
2. Adak, S., DeAndrade, D., and Pike, L. J., *The tethering arm of the EGF receptor is required for negative cooperativity and signal transduction*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1545-55.
3. Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C., *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1276-312.
4. Ayuso-Sacido, A., Graham, C., Greenfield, J. P., and Boockvar, J. A., *The duality of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and neural stem cell phenotype: cell enhancer or cell transformer?* Curr Stem Cell Res Ther, 2006. **1**(3): p. 387-94.
5. Bagneris, C., Ageichik, A. V., Cronin, N., Wallace, B., Collins, M., Boshoff, C., Waksman, G., and Barrett, T., *Crystal structure of a vFlip-IKKgamma complex: insights into viral activation of the IKK signalosome*. Mol Cell, 2008. **30**(5): p. 620-31.
6. Blonska, M., Pappu, B. P., Matsumoto, R., Li, H., Su, B., Wang, D., and Lin, X., *The CARMA1-Bcl10 signaling complex selectively regulates JNK2 kinase in the T cell receptor-signaling pathway*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 55-66.
7. Blume-Jensen, P. and Hunter, T., *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
8. Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A. S., Hondermarck, H., Nurcombe, V., and Le Bourhis, X., *FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(4): p. 295-302.
9. Carow, C. E., Levenstein, M., Kaufmann, S. H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Borowitz, M. J., Civin, C. I., and Small, D., *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood, 1996. **87**(3): p. 1089-96.
10. Cartel, N. J., Liu, J., Wang, J., and Post, M., *PDGF-BB-mediated activation of p42(MAPK) is independent of PDGF beta-receptor tyrosine phosphorylation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(4): p. L786-98.
11. Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C., and Burgess, A. W., *Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30392-9.
12. Dawson, J. P., Berger, M. B., Lin, C. C., Schlessinger, J., Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M., *Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7734-42.
13. DeFranco, A. L., *Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(2): p. 163-75.
14. DeFranco, A. L., Richards, J. D., Blum, J. H., Stevens, T. L., Law, D. A., Chan, V. W., Datta, S. K., Foy, S. P., Hourihane, S. L., Gold, M. R., and et al., *Signal transduction by the B-cell antigen receptor*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **766**: p. 195-201.

15. Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C., *Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein*. Cell, 1992. **69**(1): p. 119-28.
16. Frohling, S., Schlenk, R. F., Breitruck, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Dohner, H., and Dohner, K., *Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4372-80.
17. Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B., *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
18. Gibson, E. M., Henson, E. S., Haney, N., Villanueva, J., and Gibson, S. B., *Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release*. Cancer Res, 2002. **62**(2): p. 488-96.
19. Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M., and Gilliland, D. G., *Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation*. Cell, 1994. **77**(2): p. 307-16.
20. Graham, B. and Gibson, S. B., *The two faces of NFkappaB in cell survival responses*. Cell Cycle, 2005. **4**(10): p. 1342-5.
21. Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J., *Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity*. Nature, 2006. **442**(7103): p. 651-6.
22. Gross, O., Grupp, C., Steinberg, C., Zimmermann, S., Strasser, D., Hanneschlager, N., Reindl, W., Jonsson, H., Huo, H., Littman, D. R., Peschel, C., Yokoyama, W. M., Krug, A., and Ruland, J., *Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF-kappaB and MAPK activation to selectively control cytokine production*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2421-8.
23. Guo, B., Su, T. T., and Rawlings, D. J., *Protein kinase C family functions in B-cell activation*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 367-73.
24. Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., Morris, S. W., Inui, M., Takai, T., Shibuya, A., Saijo, S., Iwakura, Y., Ohno, N., Koseki, H., Yoshida, H., Penninger, J. M., and Saito, T., *The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 619-29.
25. Harrington, E. A., Bennett, M. R., Fanidi, A., and Evan, G. I., *c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines*. EMBO J, 1994. **13**(14): p. 3286-95.
26. Hayden, M. S. and Ghosh, S., *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
27. Jost, P. J. and Ruland, J., *Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2700-7.
28. Jun, J. E., Wilson, L. E., Vinuesa, C. G., Lesage, S., Blery, M., Miosge, L. A., Cook, M. C., Kucharska, E. M., Hara, H., Penninger, J. M., Domashenz, H., Hong, N. A., Glynn, R. J., Nelms, K. A., and Goodnow, C. C., *Identifying the MAGUK protein Carma-1 as a central regulator of humoral immune responses and atopy by genome-wide mouse mutagenesis*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 751-62.
29. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.

30. Klemm, S., Gutermuth, J., Hultner, L., Sparwasser, T., Behrendt, H., Peschel, C., Mak, T. W., Jakob, T., and Ruland, J., *The Bcl10-Malt1 complex segregates Fc epsilon RI-mediated nuclear factor kappa B activation and cytokine production from mast cell degranulation*. J Exp Med, 2006. **203**(2): p. 337-47.
31. Klemm, S., Zimmermann, S., Peschel, C., Mak, T. W., and Ruland, J., *Bcl10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 134-8.
32. Kurosaki, T., *Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 354-63.
33. Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
34. Langel, F. D., Jain, N. A., Rossman, J. S., Kingeter, L. M., Kashyap, A. K., and Schaefer, B. C., *Multiple protein domains mediate interaction between Bcl10 and MALT1*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32419-31.
35. Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G. Y., Nizet, V., and Karin, M., *IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1138-43.
36. Lee, J. G. and Kay, E. P., *FGF-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells*. Exp Eye Res, 2006. **83**(6): p. 1309-16.
37. Lemmon, M. A. and Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
38. Love, P. E. and Hayes, S. M., *ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a002485.
39. Mocsai, A., Ruland, J., and Tybulewicz, V. L., *The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 387-402.
40. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zellrezeptoren*, in *Janeway Immunologie*, Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (Ed.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009. 7, p.140-179.
41. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Signalgebung durch Rezeptoren des Immunsystems*, in *Janeway Immunologie*, Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (Ed.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009. 7, p.275-323.
42. Natoli, G. and Chiocca, S., *Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation*. Sci Signal, 2008. **1**(1): p. pe1.
43. Olashaw, N. E., Kowalik, T. F., Huang, E. S., and Pledger, W. J., *Induction of NF-kappa B-like activity by platelet-derived growth factor in mouse fibroblasts*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(10): p. 1131-9.
44. Ornitz, D. M. and Itoh, N., *Fibroblast growth factors*. Genome Biol, 2001. **2**(3): p. REVIEWS3005.
45. Paine, S. K., Basu, A., Mondal, L. K., Sen, A., Choudhuri, S., Chowdhury, I. H., Saha, A., Bhadhuri, G., Mukherjee, A., and Bhattacharya, B., *Association of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta, and interferon gamma gene polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 2749-57.
46. Pellegrini, L., Burke, D. F., von Delft, F., Mulloy, B., and Blundell, T. L., *Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin*. Nature, 2000. **407**(6807): p. 1029-34.
47. Pines, G., Kostler, W. J., and Yarden, Y., *Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy*. FEBS Lett, 2010. **584**(12): p. 2699-706.

48. Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R., and Mohammadi, M., *Structural basis for FGF receptor dimerization and activation*. Cell, 1999. **98**(5): p. 641-50.
49. Pomerantz, J. L. and Baltimore, D., *Two pathways to NF-kappaB*. Mol Cell, 2002. **10**(4): p. 693-5.
50. Romashkova, J. A. and Makarov, S. S., *NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 86-90.
51. Ruefli-Brasse, A. A., Lee, W. P., Hurst, S., and Dixit, V. M., *Rip2 participates in Bcl10 signaling and T-cell receptor-mediated NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1570-4.
52. Ruland, J., *CARD9 signaling in the innate immune response*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 35-44.
53. Ruland, J., *Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 709-14.
54. Ruland, J., Duncan, G. S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D. G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P. S., and Mak, T. W., *Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure*. Cell, 2001. **104**(1): p. 33-42.
55. Ruland, J., Duncan, G. S., Wakeham, A., and Mak, T. W., *Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling*. Immunity, 2003. **19**(5): p. 749-58.
56. Shant, J., Cheng, K., Marasa, B. S., Wang, J. Y., and Raufman, J. P., *Akt-dependent NF-kappaB activation is required for bile acids to rescue colon cancer cells from stress-induced apoptosis*. Exp Cell Res, 2009. **315**(3): p. 432-50.
57. Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D., and Paya, C. V., *RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1405-18.
58. Soni, V., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E., *LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways*. Adv Exp Med Biol, 2007. **597**: p. 173-87.
59. Stevens, H. E., Smith, K. M., Maragnoli, M. E., Fagel, D., Borok, E., Shanabrough, M., Horvath, T. L., and Vaccarino, F. M., *Fgfr2 is required for the development of the medial prefrontal cortex and its connections with limbic circuits*. J Neurosci, 2010. **30**(16): p. 5590-602.
60. Sun, S. C., *Non-canonical NF-kappaB signaling pathway*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 71-85.
61. Sun, S. C. and Cesarman, E., *NF-kappaB as a target for oncogenic viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **349**: p. 197-244.
62. Sun, S. C. and Yamaoka, S., *Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation*. Oncogene, 2005. **24**(39): p. 5952-64.
63. Takeda, K., Harada, Y., Watanabe, R., Inutake, Y., Ogawa, S., Onuki, K., Kagaya, S., Tanabe, K., Kishimoto, H., and Abe, R., *CD28 stimulation triggers NF-kappaB activation through the CARMA1-PKCtheta-Grb2/Gads axis*. Int Immunol, 2008. **20**(12): p. 1507-15.
64. Thome, M., *CARMA1, BCL-10 and MALTI in lymphocyte development and activation*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 348-59.
65. Thome, M., Charton, J. E., Pelzer, C., and Hailfinger, S., *Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALTI*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(9): p. a003004.
66. Tolar, P., Sohn, H. W., Liu, W., and Pierce, S. K., *The molecular assembly and organization of signaling active B-cell receptor oligomers*. Immunol Rev, 2009. **232**(1): p. 34-41.

67. Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V., and Dixit, V. M., *Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 961-7.
68. Vallabhapurapu, S. and Karin, M., *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
69. van Loo, G. and Beyaert, R., *Negative regulation of NF-kappaB and its involvement in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(3): p. 221.
70. Wang, D., You, Y., Lin, P. C., Xue, L., Morris, S. W., Zeng, H., Wen, R., and Lin, X., *Bcl10 plays a critical role in NF-kappaB activation induced by G protein-coupled receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 145-50.
71. Wang, H., Kadlecsek, T. A., Au-Yeung, B. B., Goodfellow, H. E., Hsu, L. Y., Freedman, T. S., and Weiss, A., *ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a002279.
72. Weil, R. and Israel, A., *T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 374-81.
73. Werninghaus, K., Babiak, A., Gross, O., Holscher, C., Dietrich, H., Agger, E. M., Mages, J., Mocsai, A., Schoenen, H., Finger, K., Nimmerjahn, F., Brown, G. D., Kirschning, C., Heit, A., Andersen, P., Wagner, H., Ruland, J., and Lang, R., *Adjuvant activity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 89-97.
74. Whiteside, S. T. and Israel, A., *I kappa B proteins: structure, function and regulation*. Semin Cancer Biol, 1997. **8**(2): p. 75-82.
75. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J., *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1137-49.
76. Zhou, H., Du, M. Q., and Dixit, V. M., *Constitutive NF-kappaB activation by the t(11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin ligase activity*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 425-31.
77. Zucca, E., Bertoni, F., Roggero, E., and Cavalli, F., *The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type*. Blood, 2000. **96**(2): p. 410-9.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kanonischer und nicht-kanonischer Signalweg zu NF- κ B (nach Pomerantz et al., 2002) [49]	7
Abbildung 2:	CARMA1-BCL10- und MALT1-Struktur und Interaktionsbereiche (nach Thome et al., 2010) [65]	14
Abbildung 3:	Aufbau des T- und B-Zellrezeptors sowie NF- κ B-Aktivierung in T- und B- Lymphozyten nach Antigenaktivierung (Kurzzusammenfassung nach Weil et al., 2004) [13, 38, 40, 41, 71, 72]	17
Abbildung 4:	Schematischer Aufbau des EGF-Rezeptors [37]	20
Abbildung 5:	EGFR-Aktivierung und intrazelluläre Signalwege (nach Pines et al., 2010) [47]	21
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau des PDGF-Rezeptors [37]	22
Abbildung 7:	Mögliche Bindungen zwischen PDGF und PDGFR in vitro (nach Andrae et al., 2008) [3]	23
Abbildung 8:	Beispiele für Signalwege (a) und Verbindung zum Zytoskelett einer Zelle (b) nach Ligandenbindung (aus Andrae et al., 2008) [3]	24
Abbildung 9:	Schematischer Aufbau des FGF-Rezeptors [37]	26
Abbildung 10:	Beispiele für FGF-Signalwege nach Rezeptordimerisierung (nach Boilly et al., 2000 und Lee et al., 2006) [8, 36, 37]	26
Abbildung 11:	Bcl10-abhängige I κ B α -Degradation in MEFs nach PDGF-, EGF- und FGF- Stimulation	49
Abbildung 12:	Bcl10-abhängige Translokation von NF- κ B in den Zellkern	50
Abbildung 13:	Retrovirale Rekonstruktion von Bcl10 in Bcl10-defizienten MEFs ermöglicht I κ B α -Degradation nach Stimulation mit PDGF oder EGF	51
Abbildung 14:	Unauffällige Aktivierung von ERK, JNK und AKT durch PDGF und EGF	52
Abbildung 15:	PI3/Akt, nicht PKC, reguliert die NF- κ B-Aktivierung nach Wachstumsfaktorstimulation	52
Abbildung 16:	Malt1-abhängige I κ B α -Degradation in MEFs nach PDGF- und EGF- Stimulation	54
Abbildung 17:	Malt1-abhängige Translokation von NF- κ B in den Zellkern	54
Abbildung 18:	Unauffällige Aktivierung von ERK durch PDGF und EGF in <i>Malt1</i> ^{+/-} und <i>Malt1</i> ^{-/-}	55
Abbildung 19:	Verhinderung des Zelltods durch Zugabe von EGF oder PDGF in <i>Bcl10</i> ^{+/-} - MEFs	56
Abbildung 20:	Schematische Darstellung der NF- κ B-Aktivierung durch Wachstumsfaktorstimulation	58
Abbildung 21:	Regulation der Gentranskription nach NF- κ B-Aktivierung [20]	61
Abbildung 22:	Modell zur Inhibition der c-Myc induzierten Apoptose im Falle einer PDGF- Stimulation in der Zelle [50]	61

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zur Genotypisierung verwendete Primer mit Angabe der Länge sowie der Sequenz	34
Tabelle 2:	Zusammensetzung für jeweils 2 Sammel- und Trenngele (Western blot)	45

6.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	10 ⁻⁶ g (Mikrogramm)
µl	10 ⁻⁶ l (Mikroliter)
µM (µmol/l)	10 ⁻⁶ mol/l
Abb.	Abbildung
Akt/PKB	Proteinkinase B
AML	akute myeloischen Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zelle
<i>API2</i>	Apoptosis inhibitor 2 Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumsulfat
BAFFR	B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor
Bcl10	B cell lymphoma 10
<i>Bcl10^{-/-}</i>	zwei mutierte Bcl10 Allele
<i>Bcl10^{+/-}</i>	ein Bcl10 Wildtypallel und ein mutiertes Allel
BCL3	B cell CLL/lymphoma 3
BCR	B-cell receptor
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BTK	Bruton's tyrosine kinase
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Ionisiertes Calcium
CARD	Caspase recruitment Domain
Carma1	Card-membrane associated guanylate kinase 1
CBM-Komplex	Komplex bestehend aus Carma1, Bcl10 und Malt1
CC	Coiled-coil domain
CCD	Charged-coupled Device
CD	Cluster of differentiation
Cezanne	Deubiquitinasen cellular zinc finger anti- NF-κB
CHAPS	Cholic acid sulfobetaine –propanaminium,N,N dimethyl-3-sulfo-N(3-(((3alpha,5beta,7alpha,12alpha)-3,7,12-trihydroxy-24-oxocholan-24-yl)amino)propyl)-,hydroxide, inner salt
CHX	Cycloheximid
cm	10 ⁻² m (Zentimeter)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-terminal	Carboxy-terminal
CYLD	Cyclindromatosis
Cys	Cystein
d	Tag
DAG	Diacylglycerol
DD	death Domäne
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Bar Virus
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Verzeichnis

EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor Rezeptor
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ErbB	Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fab	Antigen binding fragment
FAK	Focal adhesion Kinase
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetal calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLIP	FLICE inhibitor protein
FLT3	FMS-related tyrosine kinase 3
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ² /g)
GUK	Guanylatkinase
h	Stunde (60min)
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HRP	Horseradish peroxidase
HSPG	Heparan sulfate proteoglycan
HTLV-1	Humanes T-lymphotrope Virus-1
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgH	Immunglobulin heavy chain
IKK	I κ B Kinasen
IL-1	Interleukin-1
IP3	Inositol-3-Phosphat
IRAK	Interleukin-receptor associated kinase
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
I κ B	Inhibitor of kappa B
JNK	c-JUN N-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
kD/kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KSHV	Kaposi`s sarcoma associated herpes virus
l	Liter
LAT	linker of activated T cells
LMP1	Latent Infection Membrane Protein 1
LPA	L- α -lysophosphaticid acid
LRR	Leucine rich region
LT β R	lymphotoxin β -receptor
Lyn	Lck/Yes related Novel Tyrosine Kinase
m	Gewicht
M (mol/l)	Molar

Verzeichnis

MAGUK	Membrane-associated guanylate Kinase
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
Malt1	mucosa associated lymphoid tissue 1
Malt1 ^{-/-}	zwei mutierte Malt1 Allele
Malt1 ^{+/-}	ein Malt1 Wiltypallel und ein mutiertes Allel
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEFs	Murine embryonale Fibroblasten
MERM	Merlin and ezrin/radixin/moezin family of cytoskeletal linkers
mg	10 ⁻³ g (Milligramm)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	10 ⁻³ l (Milliliter)
mM (mmol/l)	10 ⁻³ mol/l
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Trinatriumtetraoxovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NEMO	NF-κB essential modulator
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
ng	10 ⁻⁹ g (Nanogramm)
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIK	NF-κB-inducing kinase
NK-Zellen	Natural killer Zellen
nm	10 ⁻⁹ m (Nanometer)
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Amino-terminal
p-	phosphoryliert
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate-buffer saline mit Tween 20
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGR	Platelet-derived growth factor Rezeptor
PI3	Phosphatidyl-Inositol-3
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIAS	Protein inhibitor of activated STATs
PIRA	paired immunoglobulin-like receptor A
PKC	Proteinkinase C
PLCγ	Phospholipase C-γ
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTB	Protein Tyrosin Bindungsdomäne
PVDF	Polyvinylidifluorid
RANK	receptor activator of nuclear factor κB
RelA	NF-κB Untereinheit p65
RIP2	Receptor-interacting protein 2
RNA	Ribonukleinsäure
Ro	Rottlerin
rpm	round(s) per minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.	siehe

Verzeichnis

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH3	Src homology 3
SLP76	SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
stim.	stimuliert
Syk	Spleen tyrosine kinase
TAE	Diethylcarbamoymethyl-2-methylbenzoate
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween 20
TCR	T-cell receptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor β
TLR 4	Toll-like Rezeptor 4
TNAP	TRAF- and NIK-associated protein
TNFR	Tumor-necrosis-factor receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u.a.	unter anderem
unstim.	unstimuliert
V	Volt
V	Volumen
v.a.	vor allem
Vav1	nucleotide exchange factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
WM	Wortmannin
z.B.	zum Beispiel
ZAP70	70 kD schweres Tyrosinphosphoprotein
Zpf91	Zinkfingerprotein 91

7 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Lippl, geb. Zimmermann
Vorname: **Stephanie** Eva-Maria
Geburtsdatum: 17.12.1983
Geburtsort: Augsburg
Familienstand: verheiratet, keine Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang:

seit 01.10.2010 Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik III für Hämatologie und Onkologie am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Studium:

Jun 2010 Approbation als Ärztin

Apr 2010 – Jun 2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)

Apr 2009 – Jul 2009 3. Tertial des Praktischen Jahres
III. Medizinischen Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie und
I. Medizinischen Klinik für Kardiologie am Klinikum Rechts der Isar

Dez 2008 – Apr 2009 2. Tertial des Praktischen Jahres
Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar

Aug 2008 – Dez 2008 1. Tertial des Praktischen Jahres
Institut für Anästhesie des Universitätsspitals Zürich und
Klinik für Anästhesiologie des Klinikums Rechts der Isar

Mrz 2008 – Apr 2008 Famulatur III. Medizinische Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie am Klinikum Rechts der Isar

Feb 2008 – Apr 2008 Famulatur Klinik für Anästhesiologie des Klinikums Rechts der Isar

Aug 2007 – Sep 2007 Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin von Feil Peter

Mrz 2006 Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin von Feil Peter

Okt 2005 – Jun 2010 Studium der Medizin an der Technischen Universität München

Aug 2005 – Sep 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3,5)

Okt 2003 – Sep 2005 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
und Technischen Universität München

Schulbildung:

Mai 2003 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Note 1,6)

Sep 1994 – Mai 2003 Simpert-Kraemer-Gymnasium Krumbach

Sep 1990 – Aug 1994 Anton-Höfer Grundschule Thannhausen

Wissenschaftliche Publikationen:

Klemm, S., **S. Zimmermann**, et al. (2007). "Bcl10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production." Proc Natl Acad Sci U S A

Gross O, Grupp C, Steinberg C, **Zimmermann S**, Strasser D, Hanneschläger N, Reindl W, Jonsson H, Huo H, Littman DR, Peschel C, Yokoyama WM, Krug A, Ruland J (2008). **"Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF-kappaB and MAPK activation to selectively cytokine production."**
Blood

8 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Ruland, der es mir ermöglicht hat unter sehr guten Arbeitsbedingungen diese Dissertation anzufertigen. Insbesondere möchte ich bei ihm für seine fachkundige Unterstützung bedanken.

Dr. rer. nat. Stefanie Klemm danke ich für ihre freundliche Art und die gute Einarbeitung zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. rer. nat. Andreas Gewies für seine fachkundigen Ratschläge und seine stete Hilfsbereitschaft. Bei Constanze Pechloff möchte ich mich für ihre seelische Unterstützung bedanken. „Stanzi“ Du warst mir eine große Hilfe!

Bei Thomas Patzelt, Mercedes Castineiras, Olaf Gross, Katrin Finger, Stefanie Weiss, Uta Ferch, Dominik Starsser, Nicole Hanneschläger, Marc Schweneker, Hendrick Pöck, Stefan Wanninger, Christina Grupp, Vera Pfänder, Kristina Brunner und Verena Laux möchte ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern Jutta und Franz Zimmermann sowie meinem Ehemann Joachim Lippl. Ohne ihre Unterstützung und ihre aufbauenden Worte wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!