

**Funktion von Malt1 in der Antigenrezeptor-
induzierten NF- κ B
Aktivierung in T-Lymphozyten**

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Fakultät für Biologie

vorgelegt von

Verena Welteke

München, 19.05.2009

Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Abteilung Zelluläre Signalintegration

1. Gutachter: PD Dr. Daniel Krappmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Boshart

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	NF- κ B – Ein pleiotroper Transkriptionsfaktor	1
1.1.1	Zentrale Komponenten in der Signaltransduktion zu NF- κ B	3
1.1.2	NF- κ B Aktivierung durch kanonische und alternative Signaltransduktion.....	3
1.1.3	Stimuli und Zielgene	5
1.1.4	Ubiquitinierung im NF- κ B-Signalweg	6
1.1.5	NF- κ B – Zentrale Stellung in der Immunantwort	8
1.2	Die Aktivierung von T-Zellen	9
1.2.1	Der TCR	9
1.2.2	Die MHC Korezeptoren CD4 und CD8	9
1.2.3	Kostimulatorische Signale.....	10
1.2.4	Proximale Signaltransduktion des TCR	11
1.3	TCR-abhängige NF- κ B Aktivierung	12
1.3.1	PKC θ	12
1.3.2	Der Carma1/Bcl10/Malt1 Komplex	12
1.4	Das COP9 Signalosom	19
1.4.1	Die vielfältigen Funktionen des CSN.....	20
1.4.2	Das COP9 Signalosom in T-Zellen	22
2	Zielsetzung	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Das COP9 Signalosom reguliert die Aktivität des CBM Komplexes in T-Zellen	24
3.1.1	Identifikation neuer Malt1 Interaktionspartner mittels <i>Yeast-Two-Hybrid</i>	24
3.1.2	CSN5 bindet an Malt1 und Carma1	26
3.1.3	Das COP9 Signalosom interagiert mit dem Carma1/Bcl10/Malt1 Modul in T-Zellen .	28
3.1.4	Das COP9 Signalosom steuert IKK Komplex Aktivierung in T-Zellen	32
3.1.5	Bcl10 wird lysosomal degradiert.....	35
3.1.6	Bcl10 Degradation wird durch das CSN reguliert.....	36
3.2	Malt1 Isoformen und ihre Paracaspase-Aktivität in der NF- κ B Aktivierung in T-Zellen.....	40
3.2.1	Malt1 Isoformen und deren Paracaspase-Aktivität in der CBM Komplex Ausbildung	41
3.2.2	Malt Isoformen aktivieren NF- κ B unterschiedlich stark	42
3.2.3	Die Funktion der Malt1 Paracaspase-Aktivität in T-Zellen	47
4	Diskussion	53
4.1	Das COP9 Signalosom reguliert die Integrität des CBM Komplexes.....	53

4.1.1	Ein neues Modell für die Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B.....	53
4.1.2	Das CSN ist ein neuer CBM Interaktionspartner	54
4.1.3	Das CSN reguliert Bcl10 Stabilität.....	57
4.1.4	CSN reguliert die T-Zell Rezeptor-induzierte IKK Aktivierung.....	60
4.1.5	CSN Untereinheiten haben unterschiedliche Bedeutung in der T-Zell Aktivierung	61
4.1.6	Einfluss der CSN/CBM Interaktion auf andere Malt1/Bcl10-abhängige Signalwege ..	63
4.2	Malt1 Isoformen und ihre Paracaspase-Aktivität in der Aktivierung von T-Zellen.....	63
4.2.1	Malt1 Isoformen haben unterschiedliches Potential zur NF- κ B Aktivierung	64
4.2.2	Malt1 Paracaspase-Aktivität reguliert die IL-2 Produktion unabhängig von initialer IKK/NF- κ B Aktivierung	67
4.3	Ausblick.....	70
5	Zusammenfassung	73
6	Material	75
6.1	Geräte und Zubehör	75
6.2	Chemikalien.....	76
6.3	Enzyme und Kits	77
6.4	<i>Escherichia coli</i> Stämme.....	78
6.5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	78
6.6	Eukaryotische Zelllinien.....	78
6.7	Nucleinsäuren.....	78
6.7.1	Plasmide	78
6.7.2	siRNAs	80
6.7.3	Primer für RT-PCR.....	80
6.8	Antikörper	80
6.8.1	Erstantikörper	80
6.8.2	Zweitantikörper	81
6.9	Puffer und Lösungen	81
7	Methoden.....	86
7.1	Kultivierung von Mikroorganismen	86
7.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	86
7.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	86
7.2	Yeast-Two-Hybrid (Y2H)	86
7.2.1	Transformation nach der Litiumacetat-Methode für einen Y2H Screen	87
7.2.2	β -Galaktosidase Filtertest	87
7.2.3	Plasmid-Isolation aus Hefe.....	88
7.2.4	Elektroporation von HB101	88

7.2.5	Test auf Autoaktivierung.....	88
7.3	Molekularbiologische Methoden.....	89
7.3.1	Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion	89
7.3.2	PCR-basierte Mutagenese	89
7.3.3	RT-PCR	90
7.3.4	Restriktions-Analyse von DNA.....	90
7.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	91
7.3.6	Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	91
7.3.7	Bestimmung der DNA Konzentration	92
7.3.8	DNA Sequenzierung.....	92
7.3.9	Transformation von <i>E.coli</i>	92
7.3.10	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> nach der Methode der „Kochenden Lyse“	93
7.4	Zellkultur	94
7.4.1	Lagerung der Zellen	94
7.4.2	Kultivierung von Zelllinien	94
7.4.3	Transfektion.....	95
7.4.4	Primäre murine CD4+ T-Zellen	96
7.4.5	Primäre humane T-Zellen.....	100
7.4.6	Stimulation und Inhibition.....	102
7.5	Biochemische Methoden	103
7.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	103
7.5.2	SDS PAGE	103
7.5.3	Western Blot und Immunodetektion.....	103
7.5.4	Immunpräzipitation	104
7.5.5	Kern/Zytoplasma Extraktion	105
7.5.6	Bestimmung der Proteinkinaseaktivität.....	105
7.5.7	Bestimmung der NF- κ B DNA Bindung	106
8	Abkürzungen	107
9	Literaturverzeichnis.....	112
10	Appendix	124
10.1	Publikationen.....	124
10.2	Lebenslauf	125

1 Einleitung

Unser Körper begegnet ständig pathogenen aber auch kommensalen Mikroorganismen. Durch ein aktives Immunsystem ist er vor den meisten Mikroorganismen geschützt. Die erste Verteidigungslinie ist das angeborene Immunsystem. Es kann schädliche Mikroorganismen erkennen und eliminieren. Allerdings entkommen etliche Pathogene dieser ersten Immunantwort. Das adaptive Immunsystem hingegen führt zur spezifischen Erkennung von Pathogenen, so dass das angeborene und das adaptive Immunsystem sich gegenseitig unterstützen um auf äußere Einflüsse zu reagieren.

Für alle Bereiche der Immunantwort sind Oberflächenrezeptoren von großer Bedeutung, die durch Bindung eines Liganden ein extrazelluläres in ein intrazelluläres Signal umwandeln. Auf diese Weise wird ein definiertes Programm in der Zelle ausgelöst, das durch Änderung der Genexpression beeinflusst und reguliert werden kann. Für die Induktion von Genen durch Rezeptor-vermittelte Signale haben Transkriptionsfaktoren eine zentrale Stellung. Die intrazelluläre Signaltransduktion vom Rezeptor zum Transkriptionsfaktor wird meist durch große Proteinkomplexe vermittelt, die essentiell für das Funktionieren der Signalantwort sind. Fehlregulationen in Signaltransduktionsprozessen in Immunzellen führen zur Entstehung von Krebs, Autoimmunerkrankungen oder auch chronischen Entzündungen. Nur ein Verständnis der Signaltransduktionsprozesse ermöglicht es Medikamente zu entwickeln, die gezielt Fehlregulationen beheben.

1.1 NF- κ B – Ein pleiotroper Transkriptionsfaktor

NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) wurde als Protein identifiziert, das den *Enhancer* der Immunglobulin-leichten Kette κ in B-Zellen bindet [1]. NF- κ B reguliert Gene, die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zelle beeinflussen.

Zur Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren gehören p65 (RelA), RelB, cRel, p50 (NF- κ B1) und p52 (NF- κ B2) (Abbildung 1.1A). Alle NF- κ B Transkriptionsfaktoren haben eine N-terminale (NT) Rel-Homologie Domäne (RHD), die notwendig für DNA Bindung, Dimerisierung und I κ B (Inhibitor von NF- κ B) Interaktion ist [2, 3]. Die dimerisierten NF- κ B Proteine binden an κ B Regionen (Konsensus Sequenz 5' GGGRNWYYCC [4]) innerhalb von Promoter bzw. *Enhancer* Bereichen und regulieren die Transkription durch Rekrutierung von Kofaktoren. Eine aktivierende Wirkung der NF- κ B Dimere auf die Transkription wird durch

die C-terminale (CT) Transaktivierungsdomäne (TAD) vermittelt. Dimere aus p50 und p52, denen die TAD fehlt, können nicht allein Transkription induzieren [5, 6].

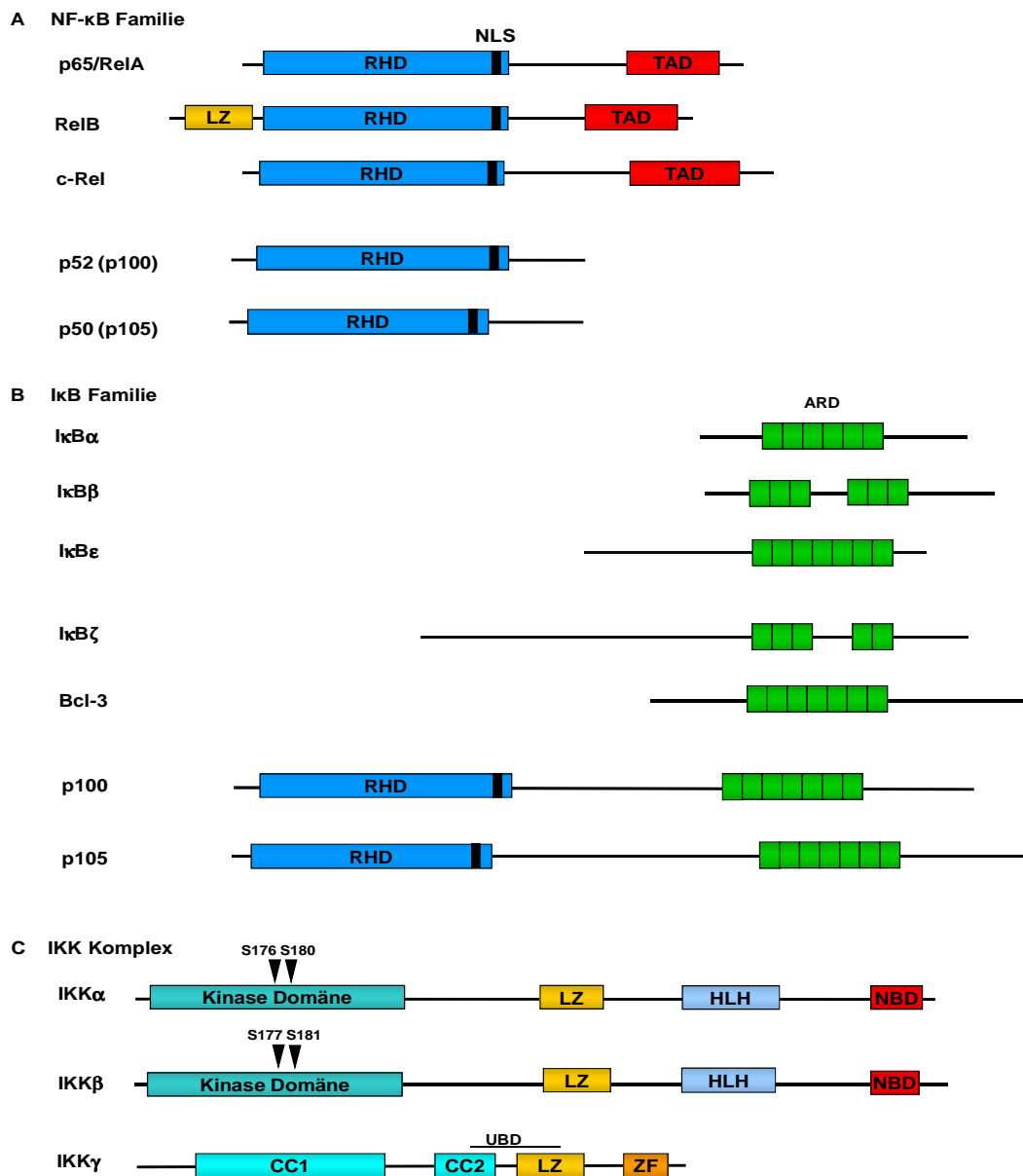


Abbildung 1.1 NF-κB, IκB und IKK Proteine. Gezeigt ist die Struktur der NF-κB (A) und IκB Proteine (B) sowie des IKK Komplexes (C). Die RHD Domäne ist charakteristisch für die NF-κB Familie und mit Ausnahme von p50 und p52 tragen alle Mitglieder eine transaktivierende Domäne (TAD). Für die IκB Familie sind ARD charakteristisch, die auch auf den p50 und p52 Vorläufern p105 und p100 zu finden sind. Der IKK Komplex besteht aus den zwei Kinasen IKKα und IKKβ sowie der regulatorischen Untereinheit IKKγ/NEMO. Die Phosphorylierung der markierten Serinreste (S) in der Kinasedomäne von IKKα oder IKKβ führt zur deren Aktivierung. RHD: Rel-Homologie Domäne, ARD: *ankyrin-repeat* Domäne, NLS: *nuclear localization signal*; LZ: *leucinezipper*; HLH: *helix-loop-helix* Domäne, NBD: NEMO Bindungsdomäne, CC: *coiled-coil* Domäne, ZF: *zinc-finger* Domäne, UBD: Ubiquitinbindungsdomäne

1.1.1 Zentrale Komponenten in der Signaltransduktion zu NF- κ B

Die Proteine der I κ B Familie und des IKK (I κ B Kinase) Komplexes sind die zwei zentralen Komponenten in der Signaltransduktion zu NF- κ B. In ruhenden Zellen werden NF- κ B Dimere durch die Bindung an I κ Bs im Zytoplasma gehalten. Die Aktivierung des IKK Komplexes führt zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation beziehungsweise Prozessierung von kleinen zytosolischen I κ Bs (α , β , ϵ), p100 oder p105 und zur Translokation von NF- κ B in den Kern.

I κ B Proteine haben fünf bis sieben Ankyrin Domänen (ARD), die mit der RHD von NF- κ B Proteinen interagieren (Abbildung 1.1B). Die kleinen zytosolischen I κ Bs [3, 7] halten NF- κ B Dimere im Zytoplasma, indem sie das Kernlokalisierungssignal (NLS) in der RHD maskieren. Auch der CT Teil der p100 und p105 Vorläufer von p52 und p50 hat I κ B-ähnliche Funktion [8-10]. p100 und p105 werden entsprechend den I κ Bs prozessiert, so dass dann p52- oder p50-beinhaltende NF- κ B Dimere frei sind, um in den Kern zu translozieren [8, 11-13]. Bcl-3 und I κ B ζ hingegen regulieren NF- κ B im Kern [14-16].

Der IKK Komplex besteht aus zwei homologen Kinaseuntereinheiten IKK α /IKK1 und IKK β /IKK2, sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ /NEMO (*NF- κ B essential modulator*) (Abbildung 1.1C und [17]). Phosphorylierung von IKK β an Serin (S) 177 und S181 und IKK α an S176 und S180 führt zur Aktivierung des Komplexes. Die Spezifität des IKK Komplexes kann abhängig von seiner Zusammensetzung variieren (siehe Abschnitt 1.1.2).

1.1.2 NF- κ B Aktivierung durch kanonische und alternative Signaltransduktion

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Signalwege zu NF- κ B, den kanonischen und den alternativen. Diese variieren durch die induzierenden Stimuli, die benötigten Komponenten des IKK Komplexes und die aktivierten NF- κ B Dimere, sowie das induzierte Programm in der Zelle (Abbildung 1.2).

In der kanonischen Signaltransduktion zu NF- κ B, aktiviert durch proinflammatorische Zytokine, Pathogen-assoziierte Moleküle oder auch Antigenrezeptoren, sind vor allem IKK γ und IKK β für die Phosphorylierung von I κ Bs erforderlich. Der aktivierte IKK Komplex phosphoryliert I κ Bs an zwei Serinresten (S32 und S36 in I κ B α , S19 und S32 in I κ B β sowie S18 und S22 in I κ B ϵ) [18-21]. Diese werden dadurch von einer SCF (Skp1/Cullin1/F-box)

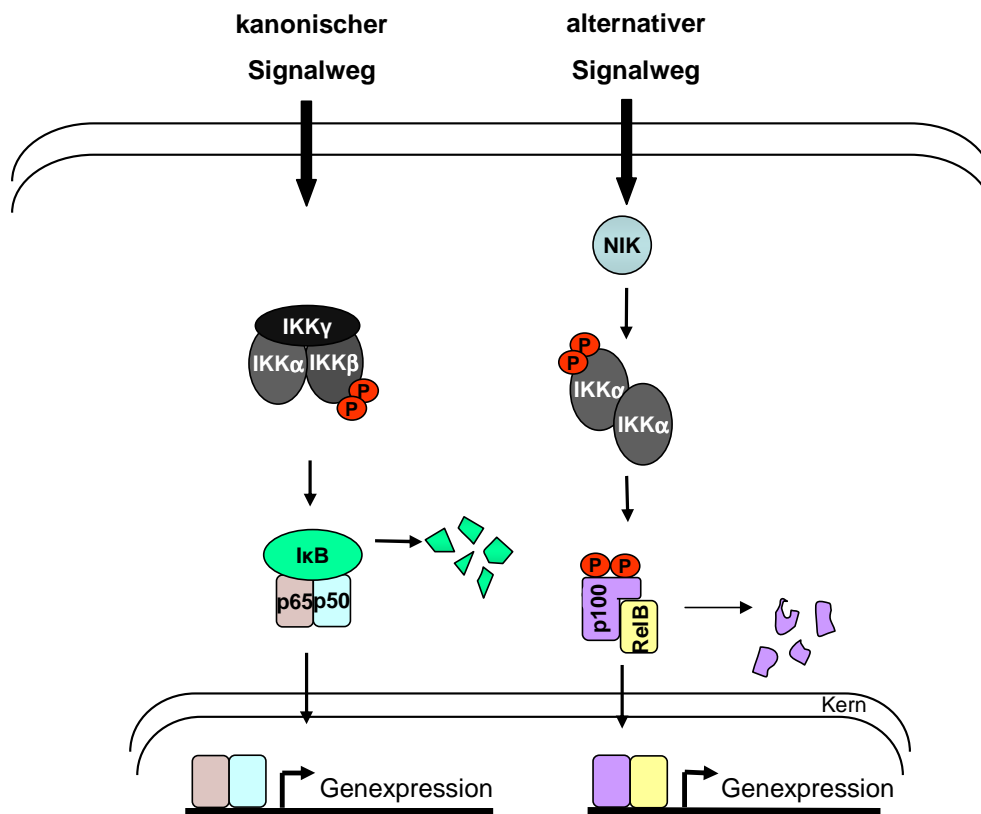


Abbildung 1.2 Modell der kanonischen und alternativen NF- κ B Aktivierung. In der kanonischen und alternativen NF- κ B Aktivierung sind unterschiedliche IKK Komplexe und NF- κ B Dimere im Einsatz. P: Phosphorylierung

Ubiquitinligase erkennt [22]. β -TRCP (*β -transducin repeat containing protein*), die Rezeptoruntereinheit dieser SCF Ubiquitinligase, bindet an phosphorylierte I κ Bs und induziert die proteasomale Degradation durch Assemblierung von K48-verknüpften Ubiquitinketten. Durch die Degradation von I κ Bs werden NF- κ B Dimere (hauptsächlich p65/p50) freigesetzt, können in den Kern translozieren [3] und Genexpression induzieren (siehe nächster Abschnitt).

Die alternative Signaltransduktion zu NF- κ B wird durch bestimmte Mitglieder der TNFR (TNF Rezeptor) Superfamilie und deren Liganden wie z.B. Lymphotoxin- β , CD40 Ligand und BAFF (*B cell activating factor belonging to the TNF family*) induziert. Sie wird ausschließlich von IKK α beeinflusst und weist eine verlangsamte Kinetik im Vergleich zum kanonischem Weg auf [23, 24]. Das im alternativen Weg aktivierte NF- κ B Dimer besteht aus p100 und RelB. p100/RelB wird induzierbar von IKK α phosphoryliert und p100 dadurch zu p52 prozessiert, so dass p52/RelB in den Kern translozieren kann (Abbildung 1.2 und [8, 13, 24]). IKK α Aktivierung in diesem Signalweg wird durch die Kinase NIK (*NF- κ B inducing*

kinase) vermittelt [13, 24, 25]. Die alternative Aktivierung von NF-κB ist langsam und lang anhaltend und steuert Entwicklungsprozesse [26].

Der weitere Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Antigen-gesteuerten NF-κB Aktivierung in Lymphozyten, welche ausschließlich durch den kanonischen Signalweg abläuft.

1.1.3 Stimuli und Zielgene

Eine große Anzahl an Rezeptoren und Stimuli kann NF-κB aktivieren. Die zentralen Prozesse der Signaltransduktion zu NF-κB, also die Aktivierung des IKK Komplexes und die Degradation von IκBs sind dabei konstante Faktoren. Unterschiede treten im zeitlichen Verlauf, der Spezifität und in induzierten Genen auf.

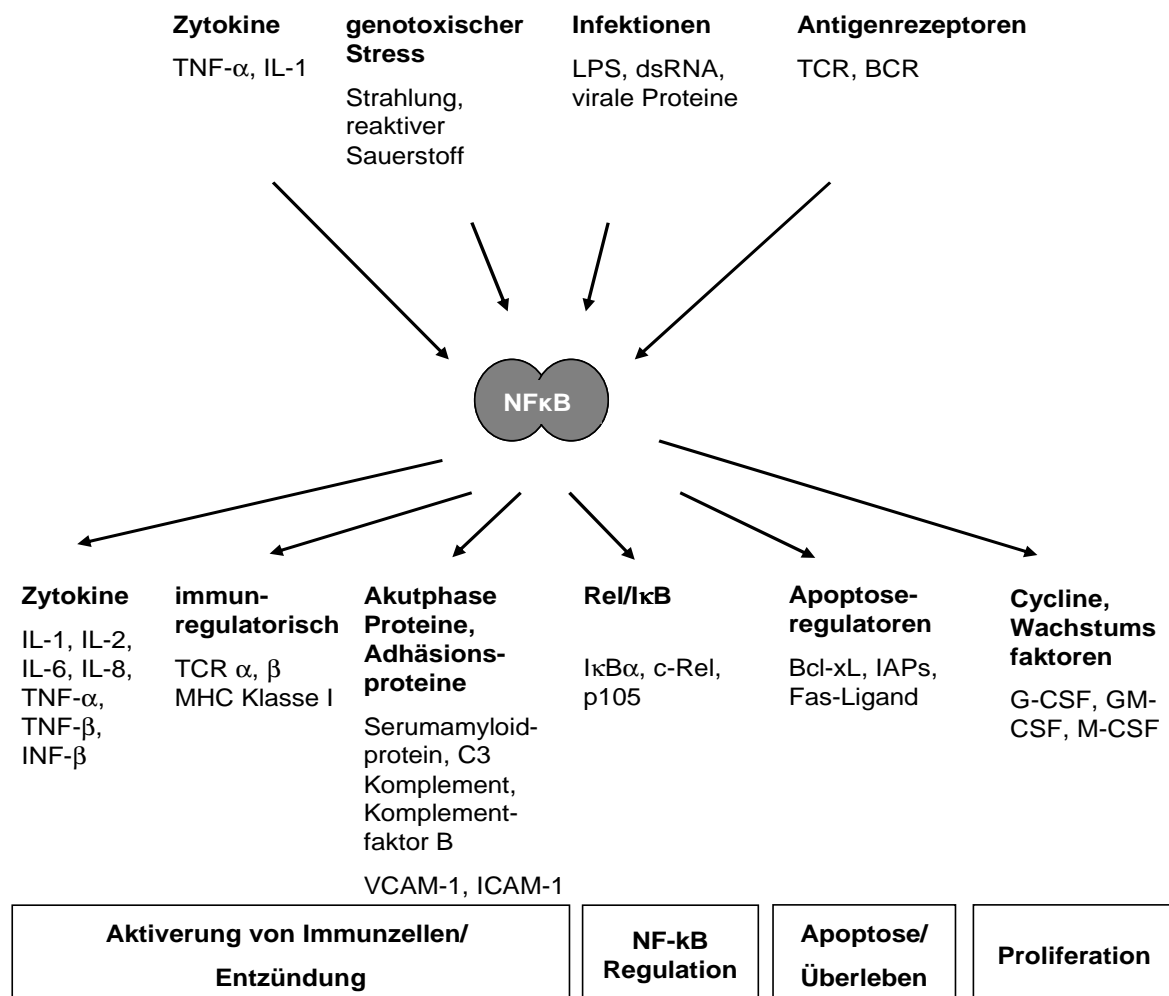


Abbildung 1.3 NF-κB Stimuli und NF-κB-induzierte Gene. Zytokine, genotoxischer Stress, Infektionen oder Antigenrezeptoren induzieren NF-κB-regulierte Gene, die die Immunantwort modulieren, über das Überleben der Zelle entscheiden, Proliferation beeinflussen oder auch NF-κB selbst regulieren.

Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch Signale wie proinflammatorische Zytokine z.B. TNF α (*tumor-necrosis factor α*) oder genotoxischen Stress, induziert durch Strahlung oder reaktive Sauerstoffspezies [27]. Auch Infektionen führen unspezifisch (z.B. LPS oder dsRNA) oder spezifisch durch Antigene und deren Rezeptoren zur NF- κ B Aktivierung (Abbildung 1.3). Die Anzahl der NF- κ B-regulierten Gene ist enorm (Abbildung 1.3 und [28]). So werden Gene für die Immunantwort, für das Überleben der Zelle, Zelladhäsion oder Proliferation induziert (z.B. Zytokine, Chemokine, Apoptoseregulatoren, Wachstumsfaktoren; siehe [28]). Weiterhin werden auch Gene aktiviert, die NF- κ B selbst regulieren (I κ B α , p105 und andere). Neu synthetisiertes I κ B α bindet NF- κ B Dimere im Kern und relokalisiert diese ins Zytoplasma, so dass ein negativer Rückkopplungsmechanismus entsteht [3].

NF- κ B als pleiotroper transkriptioneller Regulator spielt auch eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung, in der Haut und im zentralen Nervensystem [3]. Spezifität wird durch die unterschiedliche Zusammensetzung der NF- κ B Dimere, deren Modifikation und Zusammenspiel mit anderen transkriptionellen Kofaktoren erreicht [27, 29]

1.1.4 Ubiquitinierung im NF- κ B-Signalweg

Ubiquitin ist ein kleines hoch konserviertes Protein, welches durch kovalente Bindung Substratproteine modifizieren kann. Der Prozess der Ubiquitinierung wird durch ein E1-aktivierendes Enzym, ein E2-konjugierendes Enzym und eine E3 Ligase vermittelt (Abbildung 1.4 und [30, 31]). Durch diesen Prozess kann ein Substrat mono- oder polyubiquitiniert werden. Die Polyubiquitinierung kann durch eine Isopeptidbindung der C-terminalen Carboxylgruppe eines Ubiquitins mit einem der sieben Lysinreste (K) auf einem weiteren Ubiquitin erfolgen; aber auch eine C- zu N-terminale Verknüpfung zwischen zwei Ubiquitinmolekülen ist möglich. Die Art der Verknüpfung definiert die Funktion der Ubiquitinierung [32]. Die erste bekannte Funktion der Ubiquitinierung war, zytosolische Proteine für proteasomale Degradation zu markieren. Mittlerweise ist bekannt, dass das Ubiquitinsystem Zellzyklus, DNA Reparatur, Membrantransport oder Signaltransduktion reguliert [33, 34]. Man unterscheidet unterschiedliche Ketten, wie z.B. K48-verknüpfte Ubiquitinketten, die ein Signal für die proteasomale Degradation sind [35]. K63-verknüpfte Ketten beeinflussen Signaltransduktion oder auch DNA Reparatur [36, 37].

In der Signaltransduktion zu NF- κ B sind nicht nur K48-verknüpfte (unter anderem auf I κ Bs) sondern besonders auch K63-verknüpfte Ubiquitinketten entscheidend [38]. Für die Generierung von K63-verknüpften Ubiquitinketten wurde Ubc13 als E2-konjugierendes

Enzym identifiziert [37, 39]. Durch die nichtdegradative Ubiquitinierung können Proteine mit Ubiquitinbindungsdomänen (UBD) rekrutiert werden. Proteine in der NF- κ B Aktivierung mit UBD sind IKK γ oder auch der TAB/TAK Komplex. Der TAB/TAK Komplex besteht aus der Kinase TAK1 (*transforming growth factor- β - activated kinase1*) und den UBD-tragenden Proteinen TAB1 (*TAK1-binding protein1*) und TAB2 oder TAB3 [40-43]. Die Ubiquitinbindung durch UBD führt zur Interaktion des IKK Komplexes mit dem TAB/TAK Komplex und zur Aktivierung des IKK Komplexes. Die nichtdegradative Polyubiquitinierung dient also zur Assemblierung von Proteinkomplexen. Interessanterweise zeigten Ubc13 defiziente Zellen relativ normale NF- κ B Aktivierung [44]. Kürzlich konnte IKK γ als Substrat für linearverknüpfte Polyubiquitinketten identifiziert werden, deren Bildung Ubc13-unabhängig ist [45]. Demnach gibt es eine Alternative zu K63-verknüpften Ubiquitinketten in der Aktivierung von NF- κ B.

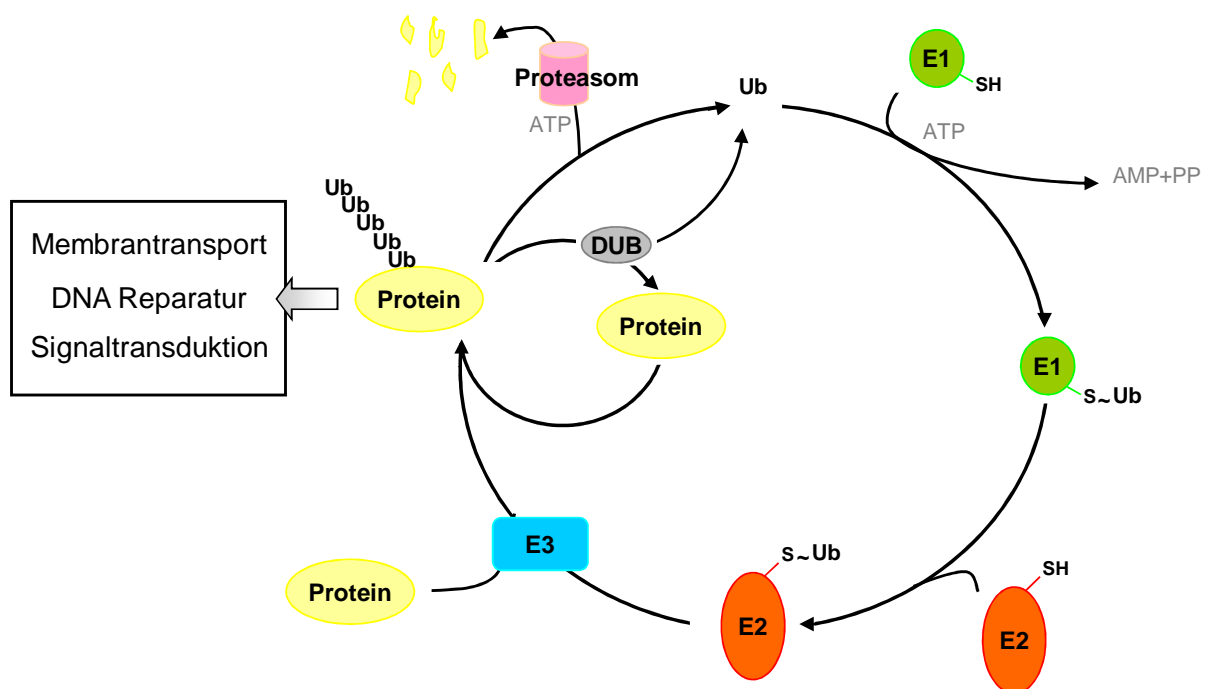


Abbildung 1.4 Das Ubiquitinierungssystem. Freies Ubiquitin (Ub) wird ATP-abhängig an ein E1-aktivierendes Enzym durch eine Thiolesterbindung mit dem CT von Ubiquitin gebunden. Ubiquitin wird dann auf ein E2-konjugierendes Enzym übertragen. Das E2 Enzym assoziiert mit einer E3 Ligase, die das Substratprotein und Ubiquitin zusammen führt, so dass es an einem Lysinrest ubiquitiniert werden kann. Abhängig von der Verknüpfung der Ubiquitinketten wird das Protein Proteasom-abhängig degradiert oder die Ubiquitinierung auf dem Protein beeinflusst zelluläre Prozesse. Deubiquitinasen (DUBs) können Ubiquitin wieder von einem Protein entfernen.

Neben IKK γ werden Proteine der TRAF (*TNF receptor-associated factor*) und der RIP (*receptor interacting protein*) Familie durch K63-verknüpfte Polyubiquitinketten modifiziert [42, 46-51]. Diese stromaufwärts des IKK Komplexes gelegenen Signalkomponenten kommen in unterschiedlichen NF- κ B Signaltransduktionswegen zum Einsatz. Fast alle Mitglieder der TRAF Familie tragen eine N-terminale RING (*really interesting new gene*) Domäne, wodurch sie Ubiquitinligasefunktion haben können [52]. Proteine der RIP Familie sind Serin/Threonin Kinasen [53]. Sowohl Proteine der TRAF als auch der RIP Familie können unabhängig von ihrer Aktivität in verschiedenen NF- κ B Signaltransduktionswegen als Adaptoren dienen.

Deubiquitinasen (DUBs) können die Ubiquitinketten von einem Protein wieder entfernen (Abbildung 1.4). DUB Aktivität wirkt sich negativ auf die NF- κ B Aktivierung aus. Die IKK Aktivität wird durch DUBs wie CYLD (*cylindromatosis*) oder A20 beeinflusst [38]. So ist Ubiquitinierung genau wie Phosphorylierung eine dynamische, kovalente und reversible Modifikation, die die NF- κ B Signaltransduktion entscheidend reguliert.

1.1.5 NF- κ B – Zentrale Stellung in der Immunantwort

NF- κ B ist ein zentraler Transkriptionsfaktor für die Regulation der angeborenen aber auch der adaptiven Immunantwort. Die angeborene Immunantwort ist die erste und schnelle aber nicht sehr spezifische Verteidigungslinie gegen Pathogene. Hingegen erkennt das adaptive Immunsystem Pathogene spezifisch und schützt durch sein Gedächtnis vor Reinfektionen. Auch die Kommunikation zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem wird durch NF- κ B unterstützt.

Das angeborene Immunsystem erkennt mikrobielle Strukturen, genannt PAMPs (*pathogen-associated microbial patterns*), über PRRs (*pattern recognition receptors*). Ein bekanntes Beispiel für PRRs ist die TLR (*Toll-like receptor*) Familie [54-56]. Sie besteht aus elf Mitgliedern, die PAMPs wie LPS (Lipopolysaccharid) oder doppelsträngige RNA detektieren. Auch im TLR Signalweg sind Mitglieder der TRAF Familie an der Aktivierung des IKK Komplexes beteiligt. Durch TLR abhängige Aktivierung von NF- κ B und anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*activator protein-1*) werden Zytokine produziert, die zur Aktivierung von endothelialen Zellen oder der Rekrutierung und Differenzierung von Immunzellen führen [57].

TNF Rezeptoren (TNFR) haben eine breite Verteilung im Gewebe. Sie beeinflussen die adaptive und die angeborene Immunantwort. Die TNFR Superfamilie besteht aus 29

Rezeptoren mit 19 unterschiedlichen Liganden [58, 59]. TNF α mit seinen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 ist wohl der bekannteste Vertreter dieser Familie. Die Balance der Aktivierung von NF- κ B und AP-1 durch TNF α entscheidet über den Tod oder das Überleben einer Zelle. Der Block der NF- κ B Aktivierung führt in den meisten Zelltypen zu einer raschen Apoptose [60].

Die adaptive Immunantwort wird durch den BCR (*B cell receptor*) auf B-Zellen und den TCR (*T cell receptor*) auf T-Zellen vermittelt. Der TCR und der BCR sind funktionell analog, sie unterscheiden sich nur in einigen molekularen Details [61]. NF- κ B Aktivierung durch diese Rezeptoren führt zur Antigen-spezifischen Proliferation und Reifung der Lymphozyten in Effektorzellen. B-Zellen reifen in diesem Prozess zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen heran, T-Zellen zu Th-Zellen (*T helper*) oder zytotoxischen T-Zellen [62].

1.2 Die Aktivierung von T-Zellen

1.2.1 Der TCR

Der TCR überträgt Signale für die Entwicklung der T-Zellen im Thymus oder auch für die Aktivierung und Differenzierung in Effektorzellen oder Gedächtniszellen. Die TCR $\alpha\beta$ oder TCR $\gamma\delta$ Heterodimere sind für die Liganderkennung verantwortlich [63, 64]. CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ (*clusters of differentiation*) und das Homodimer $\zeta\zeta$ sind nichtkovalent mit den TCR Proteinen assoziiert (Abbildung 1.5). Die TCR Proteine weisen nur eine kurze zytoplasmatische Domäne auf, so dass die assoziierten Peptide mit ihren langen ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) besetzten zytoplasmatischen Schwänzen die Rekrutierung von Signaltransduktionskomponenten vermitteln. Abwesenheit einer der sechs Komponenten des TCRs führt zum Verlust der Oberflächenexpression, was auf die Bedeutung jeder einzelnen Untereinheit für die Funktionalität des TCR hinweist [65]. Die Aktivierung des TCRs ist abhängig von der Konzentration und der Affinität des Antigen/MHC (*major histocompatibility complex*) Komplexes und der Dauer des T-Zell/APZ (Antigen-präsentierende Zelle) Kontakts [66].

1.2.2 Die MHC Korezeptoren CD4 und CD8

CD4 und CD8 sind Korezeptoren für die unterschiedlichen MHC Moleküle. Die Antigenerkennung über den TCR unterscheidet sich daher für CD4⁺ Th-Zellen und CD8⁺

zytotoxische T-Zellen. MHC Klasse I Moleküle werden von allen Zellen mit Kern exprimiert und präsentieren endogene Antigene, so dass anormale Zellen von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. MHC Klasse II Moleküle werden nur auf wenigen, die Immunantwort betreffenden Zellen exprimiert und Erkennung von Antigenen im Kontext von MHC Klasse II Molekülen durch CD4⁺ T-Zellen führt zur Produktion von Zytokinen, die andere umgebende Zellen beeinflussen [67-69]. Als Korezeptoren rekrutieren CD4 und CD8 Signalmoleküle, die wichtig für die proximale Signaltransduktion sind [70].

1.2.3 Kostimulatorische Signale

Für die Aktivierung einer T-Zelle ist neben der Stimulation des TCRs ein kostimulatorisches Signal entscheidend. Die Aktivierung der T-Zelle führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse im T-Zell/APZ Kontaktbereich, in dem kostimulatorische aber auch reprimierende Rezeptoren zu finden sind. Kostimulatorische Signale modulieren die Immunantwort durch Induktion von Zytokinproduktion, erhöhte Überlebenschancen der T-Zelle oder klonale Expansion von naiven T-Zellen [71, 72]. Die TCR Stimulation ohne kostimulatorisches Signal lässt naive T-Zellen anergisch werden [71, 73]. Präaktivierte T-Zellen induzieren nach TCR Stimulation ohne Kostimulus Apoptose. Die Kostimulation ist somit ein Kontrollmechanismus, um Fehlaktivierung von Zellen zu verhindern [74].

Es gibt verschiedene Familien und Arten von Korezeptoren. Zur Immunglobulinsuperfamilie gehören sowohl Kostimulatoren wie CD28 oder ICOS (*inducible T cell costimulation*) als auch Korepressoren wie zum Beispiel CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) [75, 76]. Aber auch Integrine, Chemokinrezeptoren oder Rezeptoren der TNF Familie können die TCR-vermittelte Aktivierung modulieren [77].

Die primäre Immunantwort wird entscheidend von der Kostimulation über den CD28 Rezeptor bestimmt (Abbildung 1.5). Der TCR/CD28 Komplex ist im zentralen Bereich der immunologischen Synapse lokalisiert [78]. Die Liganden für CD28 gehören zur B7 Familie [79]. Die Signalintegration von CD28 kann durch PI3K (Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase) oder Grb2/Vav (*growth factor receptor bound protein2/GEF* für GTPasen der Rho Familie) vermittelt werden [80, 81]. Effiziente Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (*activator protein 1*) nach TCR Stimulation findet nur in Gegenwart von CD28 Ligation statt [57]. Durch die Kostimulation über den CD28 Rezeptor wird die Schwelle für die TCR-abhängige T-Zell Aktivierung verringert und die Produktion von

Zytokinen wie IL-2 erhöht. Dies führt zum Überleben der T-Zelle und beeinflusst die T-Zell-abhängige Antikörper Produktion [82-84].

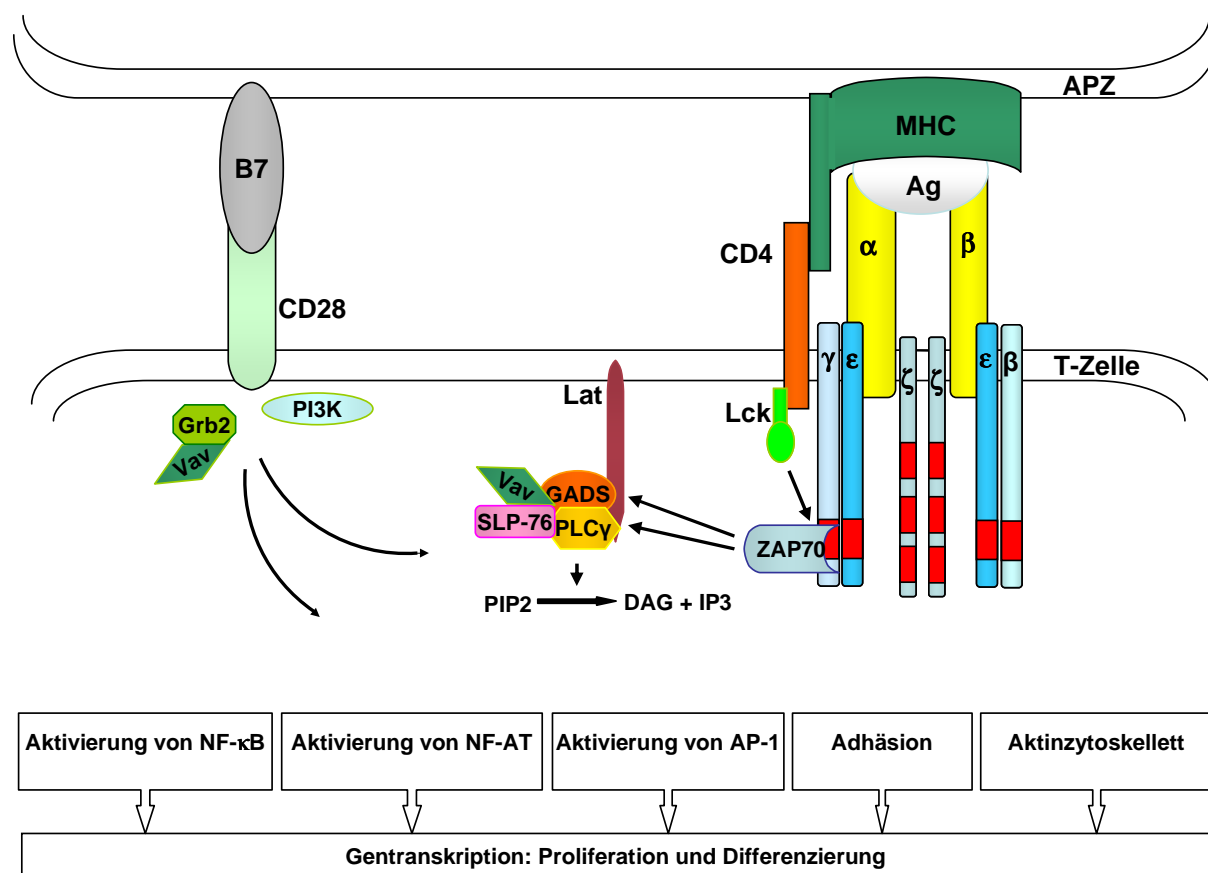


Abbildung 1.5 Schema für die Aktivierung einer T-Zelle durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APZ). Der APZ/T-Zell Kontakt durch den TCR und den Korezeptor CD28 führen zur Assemblierung eines Rezeptorproximalen Signalmoduls, welches essentiell für die weitere Aktivierung der T-Zelle ist. Neben der Induktion von Transkriptionsfaktoren werden durch T-Zell Stimulation auch die Adhäsion der Zelle und das Aktinzytoskelett reguliert.

1.2.4 Proximale Signaltransduktion des TCR

Die Weiterleitung des Signals vom TCR an Adaptoren ist ein Prozess, der sich innerhalb von Sekunden abspielt [85]. Die TCR Stimulation führt zur Tyrosinphosphorylierung im Bereich der CD3 ITAMs, durch die Membran-verankerte Tyrosinkinase Lck (SRC-Familie) [86]. Auf diese Weise werden neue Bindungsstellen für Adaptoren geschaffen (Abbildung 1.5). ZAP70 (*zeta-associated protein kinase of 70 kDa*) bindet an die ITAMs und wird dadurch aktiviert. ZAP70 phosphoryliert das Membranprotein LAT (*linker for activated T cells*) und weitere Adaptoren, so dass Bindungsstellen für den Aufbau eines Signalmoduls bestehend aus SLP76 (*SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*), VAV1, GADS (*Grb2-related adaptor*

protein) und PLC γ (PhospholipaseC γ) zur Verfügung stehen [87-91]. Die einzelnen Komponenten in diesem Modul beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Bindung und Aktivität. Im Signaltransduktionskomplex wird PLC γ aktiviert, so dass Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert wird. Über diese Signalmediatoren wird Calciuminflux und Aktivierung von PKC θ (ProteinkinaseC Isoform θ) sowie Aktivierung des RAS/MAPK Wegs induziert [92, 93]. Die ersten Schritte der proximalen Signaltransduktion sind entscheidend für die Induktion der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) aber auch für Prozesse wie Aktinpolymerisation und Zelladhäsion.

1.3 TCR-abhängige NF- κ B Aktivierung

Aktivierung von NF- κ B führt zur Expression von Genen, die die Antigen-spezifische Proliferation, Differenzierung in Effektorzellen und das Überleben der T-Zelle regulieren [61]. NF- κ B-induzierte Gene sind Zytokine wie IL-2 oder IL-4, die die T-Zell Differenzierung und Proliferation beeinflussen oder auch Apoptoseregulatoren wie Bcl-xl und Bfl1/A1 [94-96]. Durch genetische Deletionen in Mäusen konnte gezeigt werden, dass PKC θ , Carma1, Bcl10 und Malt1 die Verbindung zwischen dem TCR/CD28 Signalmodul und dem IKK Komplex darstellen [97-104].

1.3.1 PKC θ

Die Serin/Threonin Kinase PKC θ verknüpft die TCR-proximale Signaltransduktion mit der Aktivierung des IKK Komplex und NF- κ B [104]. PKC θ ist eine DAG-abhängige, Calcium-unabhängige Proteinkinase, die hauptsächlich in T-Zellen und Skelettmuskeln exprimiert wird [105, 106]. Nach TCR/CD28 Kostimulation wird PKC θ an das aktive Signalmodul des TCR rekrutiert [107, 108]. Für Rekrutierung und Aktivierung durch Phosphorylierung wurden verschiedene Adaptoren wie Vav und Proteinkinasen wie PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase1*) oder Lck identifiziert [108-110].

1.3.2 Der Carma1/Bcl10/Malt1 Komplex

Die Proteine Carma1 (*caspase-recruitment domain (CARD) containing membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein 1*), Bcl10 (*B cell lymphoma 10*) und Malt1 (*mucosa-*

associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) bilden zusammen den CBM Komplex und sind stromabwärts von PKC θ die essentiellen Faktoren in der Antigen-induzierten NF- κ B Aktivierung.

1.3.2.1 Carma1

Carma1 (CARD11) wurde als Bcl10-interagierendes und stromaufwärts von Bcl10 agierendes Protein identifiziert [99, 111-114]. Carma1 wird nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert, wohingegen andere Vertreter der Carma Familie wie Carma2 nur in der Plazenta zu finden ist und Carma3 in nichthämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Carma1-defiziente Mäuse zeigen in B- und T-Zellen spezifisch Defekte in NF- κ B und JNK (Jun N-terminale Kinase) Aktivierung [97, 98].

Das 1148 AS lange Carma1 Protein besteht aus multiplen Proteininteraktionsdomänen, die bis auf die PDZ Domäne (Psd-95/Dlg/ZO-1 Homolog) bedeutend für die Carma1 Funktion in der NF- κ B Aktivierung sind [115]. Der N-Terminus (NT) von Carma1 beginnt mit einer CARD Domäne, die Stimulus-abhängig Bcl10 bindet (Abbildung 1.6 und [111, 116]). Das auf die CARD Domäne folgende CC (*coiled-coil*) Motiv ist für die Malt1 Interaktion und für Carma1 Oligomerisierung verantwortlich [117, 118]. Das C-terminale Ende von Carma1 beinhaltet das MAGUK Motiv bestehend aus PDZ, SH3 (*Src homology 3*) und GUK (*guanylate kinase-like*) Domäne. Membranlokalisation von Carma1 wird durch die SH3 Domäne vermittelt [119]. Die GUK Domäne interagiert nach TCR/CD28 Stimulation mit der Membran-assoziierten Kinase PDK1, so dass Interaktion zwischen PKC θ und Carma1 induziert wird [120]. Aufgrund des MAGUK Motivs gehört Carma1 zur Familie der MAGUK Proteine. Diese Proteine sind Membran-lokalisierte Gerüstproteine ohne enzymatische Aktivität und organisieren Multiproteinkomplexe [121, 122]. Der N-terminale und C-terminale Bereich von Carma1 wird durch eine Linkerregion getrennt, die durch PKC θ in T-Zellen und PKC β in B-Zellen an spezifischen Serinresten phosphoryliert werden kann. Die CaMKII (Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) phosphoryliert Carma1 im Bereich der CARD/CC Domänen (S109), wodurch die Bindung zwischen Bcl10 und Carma1 erleichtert werden kann [123].

1.3.2.2 Bcl10

Bcl10 wurde durch Analyse der chromosomalen Translokation t(1;14) (p22;q32), die in etwa 5 % der Fälle von MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) Lymphomen auftritt, identifiziert [124, 125]. Bcl10 wird ubiquitär exprimiert [126-128], aber Bcl10-defiziente Mäuse zeigen eine Anfälligkeit für Infektionen und die T-Zellen dieser Mäuse eine inhibierte Proliferation und IL-2 Produktion [102]. Diese Defekte sind auf einen Block der Antigen-vermittelten NF- κ B Aktivierung zurückzuführen. Neben der Bedeutung von Bcl10 in der adaptiven Immunantwort konnten weitere Bcl10 Wirkorte unter anderem in der Signaltransduktion von GPCRs (*G-protein coupled receptor*) oder Fc ϵ RI (*high affinity IgE receptor*) identifiziert werden [129-134].

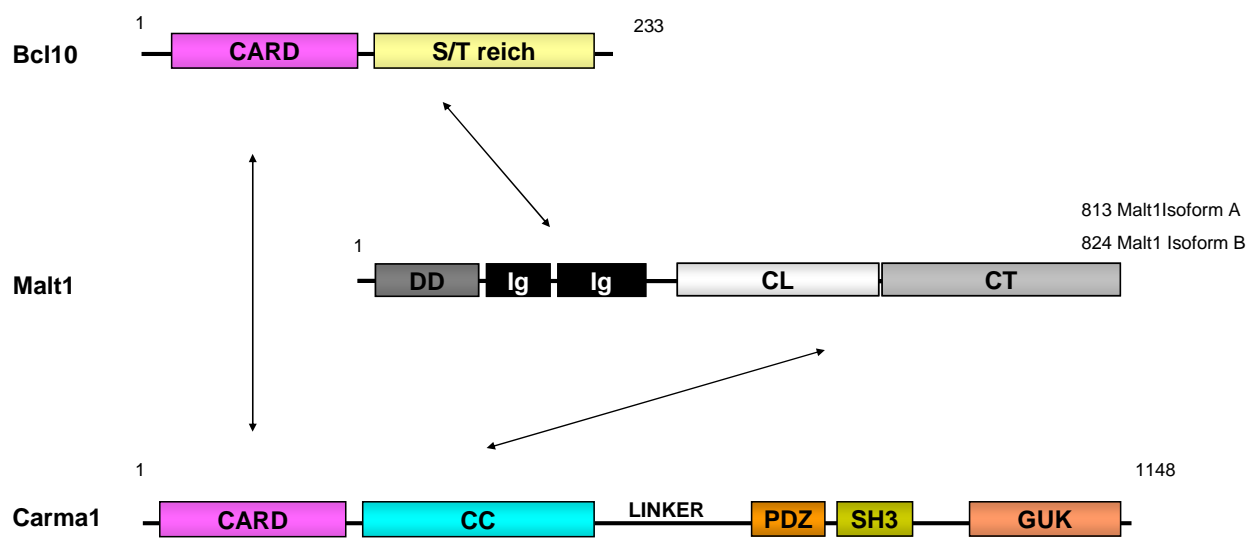


Abbildung 1.6 CBM Komplex. Schematischer Aufbau der CBM Komplex Mitglieder Carma1, Malt1 und Bcl10. Bcl10 bindet an Carma1 durch homotypische CARD/CARD Interaktion. Malt1 interagiert über die Ig Domänen mit Bcl10. Die Assoziation der CBM Komponenten untereinander ist durch Pfeile angegeben. CARD: *caspase recruitment* Domain, DD: *death* Domäne, Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne, CL: *caspase-like* Domäne, CT: C-Terminus, CC: *coiled-coil* Domäne, PDZ: Psd95/DIg/ZO-1 Domäne, SH3: *Src homology 3* Domäne, GUK: *guanylate kinase-like* Motiv.

Bcl10 setzt sich aus einer CARD Domäne gefolgt von einem Serin- und Threonin-reichen C-Terminus zusammen (Abbildung 1.6 und [128, 135]). Die CARD Domäne vermittelt die Stimulus-abhängige Interaktion zu Carma1, wohingegen ein Teil des C-Terminus für die Interaktion zu Malt1 verantwortlich ist [136, 137]. Der C-terminale Teil von Bcl10 kann von verschiedenen Kinasen, nach TCR Stimulation sind das IKK β und CaMKII, phosphoryliert werden [138-140]. Neben der regulatorischen Funktion der Bcl10 Phosphorylierung in der

TCR-abhängigen Signaltransduktion (Abschnitt 1.3.2.4) scheint die Bcl10 Phosphorylierung (S138) auch Effekte auf die TCR- und FcγR-induzierte Aktinpolymerisation zu haben [141].

1.3.2.3 Malt1 Paracaspase

Malt1 wird ubiquitär exprimiert und wurde ebenfalls durch chromosomale Translokation t(11;18)(q21;q21) in MALT Lymphomen und als Bcl10 Bindungspartner identifiziert [136, 137, 142, 143]. Malt1-defiziente Mäuse weisen spezifisch Defekte in der Antigenrezeptor-vermittelten NF-κB und JNK Aktivierung in T-Zellen auf; ERK (*extracellular-signal-regulated-kinase*) Aktivierung und Calciumfreisetzung sind nicht beeinflusst [101, 103]. Die Defekte in T-Zellen ähneln stark dem Phänotyp von Bcl10-defizienten Mäusen [102]. In B-Zellen scheint Malt1 größere Bedeutung für das Überleben der B-Zellen durch die Regulation der NF-κB Untereinheit c-Rel als für die Antigenrezeptor-induzierte IKK Aktivierung zu haben [144]. Malt1 ist nicht nur an der Antigen-abhängigen NF-κB Aktivierung beteiligt, sondern reguliert auch Aktivierung von NF-κB zusammen mit Bcl10 und Carma3 oder dem CC-CARD beinhaltendem Protein CARD9 durch andere Rezeptoren wie GPCRs oder ITAM-beinhaltende Rezeptoren [131, 133, 145].

Malt1 besteht aus einer N-terminalen DD (*death* Domäne), die homotypische Interaktion vermittelt und Ähnlichkeit mit CARD Domänen aufweist (Abbildung 1.6 und [146]). Auf die DD folgen zwei Ig (Immunglobulin-ähnliche) Domänen, die für die Interaktion zu Bcl10 verantwortlich sind [136, 137]. Aufgrund der CL (*caspase-like* Domäne) im C-terminalen Bereich von Malt1 wird Malt1 in die Familie der Paracaspasen eingeordnet. Paracaspasen wurden zusammen mit Metacaspasen als Caspase-ähnliche Proteine identifiziert [136]. Die Mitglieder der Familie der Paracaspasen sind in Metazoen und *Dictyostelium* zu finden, Metacaspasen hingegen nur in Pflanzen, Pilzen und Protozoa. Die CL Domäne der humanen Paracaspase Malt1 beinhaltet ein in Caspasen, Metacaspasen und Paracaspasen hoch konserviertes Cystein und Histidin [136]. In allen drei Familien bilden diese AS das katalytische Zentrum. Die Paracaspase-Aktivität von Malt1 in T-Zellen wird durch TCR Stimulation induziert (siehe nächster Abschnitt und [147, 148]).

TRAF6, eine RING Finger beinhaltende Ubiquitinligase, induziert die Ubiquitinierung von Malt1 ([149, 150] und siehe nächster Abschnitt). Der C-terminale Bereich von Malt1, der der CL-Domäne folgt, trägt TRAF6 Bindungsstellen. Weitere TRAF6 Bindungsstellen konnten zwischen den Ig Domänen und der CL Domäne identifiziert werden [151]. Da Malt1 in zwei Splicevarianten exprimiert wird und genau dieser Bereich in der kürzeren Isoform fehlt

(Malt1 B), trägt nur die längere Isoform (Malt1 A) die zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen zwischen Ig Domäne und CL Domäne (Abbildung 3.12). Ob die Isoformen eine unterschiedliche Bedeutung in der NF- κ B Aktivierung aufweisen ist unbekannt.

1.3.2.4 Modell für die Regulation des CBM Komplexes

TCR/CD28 Kostimulation führt über Rezeptor-proximale Signaltransduktion zur Aktivierung von PKC θ ([104] und siehe Abschnitt 1.2). Carma1 wird an PKC θ rekrutiert, so dass PKC θ Serinreste in der Linkerregion von Carma1 phosphorylieren kann. Dadurch wird eine Konformationsänderung in Carma1 induziert, so dass Carma1 Domänen für die Interaktion mit Bindungspartnern zur Verfügung stehen [152, 153]. Malt1 und Bcl10, die konstitutiv miteinander assoziiert sind, werden an Carma1 rekrutiert, so dass sich ein aktiver CBM Komplex ausbildet (Abbildung 1.7 und [138]). Im Kontext des CBM Komplexes interagiert die RING Ubiquitinligase TRAF6 mit dem C-Terminus von Malt1 und induziert die K63-Ubiquitinierung von Malt1 an C-terminalen Lysinresten [150]. Dadurch entstehen Bindungsstellen für Ubiquitin-bindende Proteine wie IKK γ oder TAB Proteine im TAB/TAK Komplex. Die IKK γ Bindung an die K63-verknüpften Ubiquitinketten führt zur Rekrutierung des IKK Komplexes [150]. Die Aktivierung des IKK Komplexes findet entweder durch

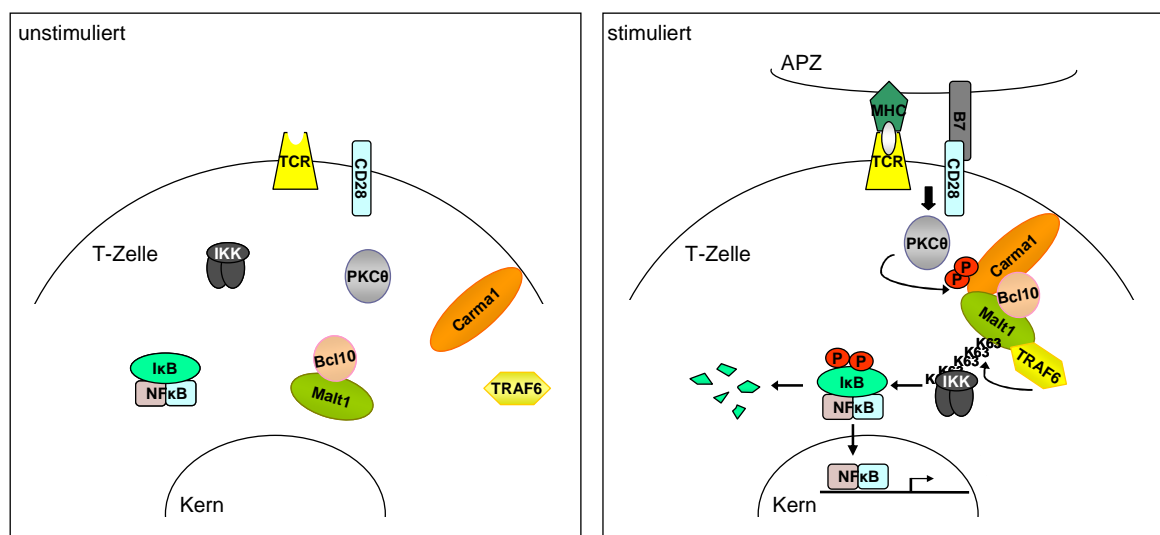


Abbildung 1.7 NF- κ B Aktivierung durch den CBM Komplex. TCR/APZ Kontakt führen zu Rezeptor-proximale Signaltransduktionseignissen die PKC θ aktivieren. PKC θ phosphoryliert die Carma1 Linkerregion, so dass Bcl10 und Malt1 rekrutiert werden können. Im aktiven CBM Komplex interagiert Malt1 mit TRAF6, was zur Malt1 K63 Ubiquitinierung führt. Dadurch kann der IKK Komplex rekrutiert und aktiviert werden. Der aktive IKK Komplex phosphoryliert I κ Bs, so dass diese proteasomal degradiert werden und NF- κ B Dimere frei sind um in den Kern zu translozieren.

TAK1-abhängige Phosphorylierung von IKK β [40, 149, 154] oder durch Rekrutierung des IKK Komplexes induzierte Autophosphorylierung statt [3].

Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Bcl10 unterstützen zu Beginn der T-Zell Aktivierung die Bindung von IKK γ und Aktivierung des IKK Komplexes [155, 156]. Aber auch die Auflösung des CBM Komplexes nach fortschreitender Stimulation wird durch Bcl10 Modifikation beeinflusst. Die Phosphorylierung von Bcl10 nach längerer Stimulation führt zur Abschwächung der NF- κ B Aktivierung [138-140, 157]. Phosphorylierung von C-terminalen Serinresten auf Bcl10 durch IKK β löst Malt1/Bcl10 Interaktion [138]. Negative Regulation der NF- κ B Aktivierung wird auch durch Bcl10 Degradation vermittelt. Für die Degradation von Bcl10 ist Ubiquitinierung entscheidend [155, 158, 159]. Es wurden verschiedene Ubiquitinligasen für Bcl10 vorgeschlagen. Scharschmidt et al [158] konnten zeigen, dass Bcl10 durch Nedd4/Itch ubiquitiniert werden kann und dass dadurch die lysosomale Degradation von Bcl10 induziert wird. Aber auch Bcl10 Ubiquitinierung durch β -TRCP oder cIAP2 (*cellular apoptosis inhibitor 2*) und Proteasom-abhängige Degradation konnten beobachtet werden [139, 159].

Wie die Modifikationen des CBM Komplexes moduliert werden und welchen Einfluss die Regulatoren auf die Aktivität des CBM Komplexes haben, ist bis jetzt nicht klar. Deubiquitinasen sind viel versprechende Kandidaten für die Regulation des CBM Komplexes. Die Deubiquitinase A20 wurde kürzlich als Malt1-interagierendes Protein identifiziert und hat negativregulatorische Funktion bei der Bcl10/Carma3 vermittelten Aktivierung von NF- κ B [148, 160]. Auch die Funktion der Paracaspase-Aktivität in der Regulation des CBM Komplexes ist nicht gewiss. Lange konnte keine katalytische Aktivität für Malt1 gezeigt werden [136, 161]. Metacaspasen, die eng mit den Paracaspasen verwandt sind, sind Cystein-abhängige Arginin oder Lysin Proteasen. [162]. Durch diesen Hinweis konnte auch für Malt1 kürzlich Arginin-spezifische Cystein-abhängige Proteaseaktivität nachgewiesen werden [147, 148]. Die bis jetzt identifizierten Malt1 Substrate sind A20 und Bcl10. Beide werden am C-terminalen Ende geschnitten. A20 ist eine Deubiquitinase, die die Aktivierung von NF- κ B inhibiert [38, 163]. Welchen Effekt die proteolytische Aktivität von Malt1 auf NF- κ B Aktivierung durch die Spaltung von A20 oder anderer Substrate hat ist nicht klar. Die Spaltung von Bcl10 hingegen hat keinen Einfluss auf die Antigen-induzierte NF- κ B Aktivierung, sondern reguliert auf positive, bis jetzt unbekannte Weise, die Integrin-abhängige Adhäsion nach T-Zell Stimulation [147].

1.3.2.5 Deregulation des CBM Komplexes in der Lymphomentstehung

Mutationen in Proteinen des CBM Komplexes oder veränderte Expression von CBM Komponenten sind an der Entstehung von B-Zell Lymphomen beteiligt. Etwa 8 % der B-Zell Lymphome sind MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) Lymphome [164]. Sie sind extranodale non-Hodgkin's Lymphome im Bereich des Magens, der Lunge oder der Schilddrüse. MALT Lymphome entstehen häufig durch chronische Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen, so liegt zum Beispiel gastrischen MALT Lymphomen häufig eine *Helicobacter pylori* Infektion zu Grunde. In MALT Lymphomen wurden drei unterschiedliche Translokationen identifiziert, die die *MALT1* und *BCL10* Gene betreffen. $t(11;18)(q21;q21)$ ist die am häufigsten auftretende chromosomale Veränderung (15-40 % der Fälle) [165]. Diese Translokation generiert ein chimeres Transkript bestehend aus den N-terminalen drei BIR (*baculovirus IAP repeats*) Domänen von cIAP2 und dem C-terminalen Teil von Malt1 beginnend mit der CL Domäne und in einigen Fällen auch noch eine oder beide Ig Domänen [142, 143, 166]. cIAP2 gehört zur Familie der IAP Proteine. Die Ubiquitinligase cIAP2 besteht aus drei BIR Domänen, einer CARD und eine RING Domäne. Das cIAP2/Malt1 Fusionsprotein induziert, im Gegensatz zu Malt1 oder cIAP2, konstitutive NF- κ B Aktivierung [136, 137] und geht mit deregulierter Ubiquitinligaseaktivität einher [167].

Die Translokation $t(1;14)(p22;q32)$, die in 5 % der MALT Lymphome auftritt, führt dazu, dass das *BCL10* Gen unter die Kontrolle des *Ig-heavy-chain gen Enhancers* gerät [124, 125]. Auch die Translokation $t(1;14)(q32;q21)$ bringt die *MALT1* Expression unter Kontrolle dieses *Enhancers* (20 % der Fälle) [168]. Sowohl die $t(1;14)(p22;q32)$ als auch die $t(1;14)(q32;q21)$ Translokation führen zur Überexpression von Bcl10 oder Malt1. In den Fällen der $t(1;14)(p22;q32)$ und $t(11;18)(q21;q21)$ Translokation kommt es zu Bcl10 Kernlokalisierung [169], jedoch sind der genaue Mechanismus und die Funktion nicht verstanden. Es wird vermutet, dass Malt1-NES (*nuclear export signals*) die Lokalisation von Bcl10 regulieren.

DLBCL (*diffuse large B cell lymphoma*) sind die weltweit am häufigsten auftretenden non-Hodgkin's Lymphome (30-40 %) [170]. Sie unterteilen sich in drei Subtypen: ABC (*activated B cell*) DLBCL, GCB (*germinal center B cell*) DLBCL und PMBLs (*primary mediastinal B cell lymphoma*). ABC DLBCL (etwa 30 % der DLBCL Fälle) sind ein NF- κ B-abhängiger Subtyp mit geringer Prognose. Die Inhibition von NF- κ B ist toxisch für ABC aber nicht für GCB Zelllinien [171]. Weiterhin konnte durch einen RNA Interferenz *Screen* gezeigt werden,

dass dieser Subtyp abhängig von *Carma1*, *Malt1* und *Bcl10* ist [172]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass in etwa 10 % der ABC DLBCL Mutationen in der *Carma1* CC Domäne auftreten. Diese Mutationen induzieren konstitutive NF- κ B Aktivierung und verstärkte Aktivierung nach Antigenstimulation in Lymphomzelllinien. Die *Carma1* Mutationen in der CC Domäne könnten es Lymphomzellen ermöglichen, NF- κ B und damit die Proliferation und das Überleben der Zellen ohne BCR Stimulation zu aktivieren, so dass *Carma1* ein Onkogen zu sein scheint [173].

1.4 Das COP9 Signalosom

Das COP9 Signalosom (CSN) stellt einen hoch molekularen Proteinkomplex dar, der ubiquitär exprimiert wird und große Bedeutung bei der Regulation von Proteinstabilität hat [174, 175]. Das CSN wurde aus Pflanzen als essentieller Regulator der Licht-vermittelten Entwicklung isoliert [176, 177]. COP steht daher für *constitutive photomorphogenesis*. Das CSN besteht aus acht Untereinheiten (CSN1-CSN8) die nach absteigendem Molekulargewicht benannt wurden und zusammen eine ungefähre Masse von 450 kDa ergeben [178]. Die einzelnen Untereinheiten, besonders CSN2 und CSN5, sind zwischen unterschiedlichen Spezies hoch konserviert [179]. Sechs COP9 Signalosom Untereinheiten besitzen PCI (*proteasom -COP9 signalosome - initiation factor 3*) Domänen, CSN5 und CSN6 hingegen tragen MPN (*Mrp1-Pad1-N-terminal*) Domänen. Die Domänenstruktur des COP9 Signalosoms hat große Ähnlichkeit mit dem Deckel des 19S-regulatorischen Komplexes des 26S Proteasoms und auch, aber im geringeren Maße, mit eIF3 (*eukariotic translation initiation factor 3*) [180-182]. CSN5 ist die am besten charakterisierte Untereinheit des COP9 Signalosoms und eine große Zahl der bekannten CSN Interaktionen werden durch CSN5 vermittelt (Abbildung 1.8). Die Deletion einzelner COP9 Signalosom Untereinheiten kann zum Kollaps des ganzen Komplexes führen und alle bis jetzt durchgeführten Deletionen von CSN Untereinheiten in Mäusen waren embryonal letal [183-185].

Neben dem CSN Holokomplex existieren CSN Subkomplexe, die meist aus CSN5 und einer unterschiedlichen Anzahl anderer CSN Untereinheiten gebildet werden [186, 187]. Die genaue Funktion dieser Subkomplexe ist nicht klar.

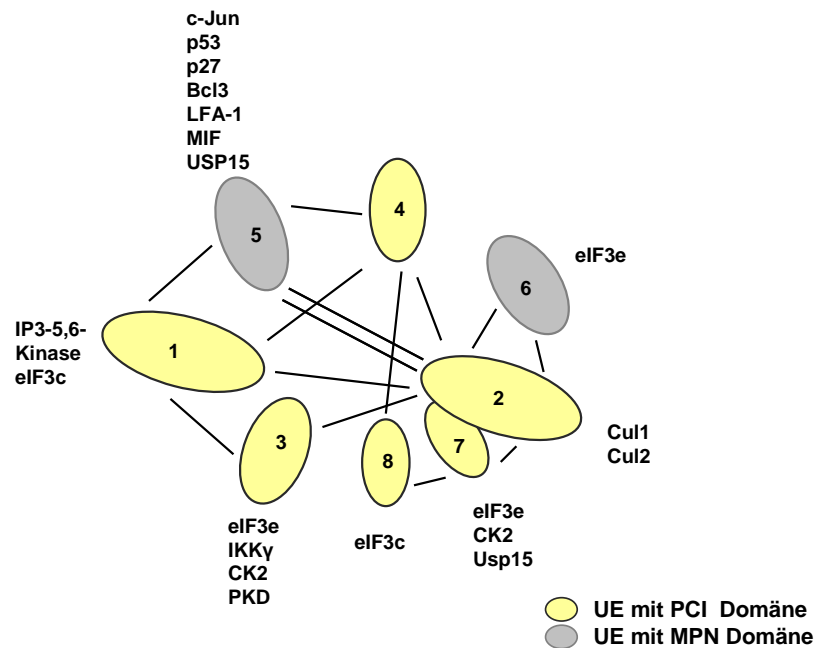


Abbildung 1.8 Model der CSN Interaktionen. Schematische Darstellung der Interaktion innerhalb des CSNs und Interaktionen mit anderen Proteinen. Die Interaktion zwischen den CSN Untereinheiten ist durch Striche dargestellt. Eine Auflistung der CSN-interagierenden Proteine steht neben der entsprechenden CSN Untereinheit. UE: Untereinheit. Modifiziert von [188].

1.4.1 Die vielfältigen Funktionen des CSN

Das COP9 Signalosom hat sowohl Funktionen im Kern als auch im Zytoplasma. Der Komplex reguliert diverse zelluläre Prozesse von Zellzyklus über Signaltransduktion bis hin zur Transkription [174, 175, 189]. Die regulatorische Funktion des CSNs wird nicht nur durch das CSN selbst vermittelt, sondern auch durch etliche CSN-assoziierte Proteine (Abbildung 1.9).

Die Isopeptidase Aktivität von CSN5 ist die am Besten charakterisierte Eigenschaft des CSNs [190]. Die CSN5 Metalloprotease, für deren Aktivität der gesamte Komplex wichtig ist, entfernt kovalent an Cullin gebundenes Nedd8 in Cullin-RING-Ubiquitinligasen (CRL). Nedd8 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, welches ebenso wie Ubiquitin über ein E1-aktivierendes Enzym, ein E2-konjugierendes Enzym und eine E3 Ligase an ein Substrat gebunden wird [191]. Die Interaktion des COP9 Signalosoms mit Cullin führt wahrscheinlich zu Zyklen von Neddylierung und Deneddylierung, die für die Stabilität der Ubiquitinligase wichtig sind [192-194]. Auch im NF- κ B Signalweg spielt die Neddylierung von Cullin eine Rolle, da die SCF Ubiquitinligase β -TRCP, die Ubiquitinierung von I κ B α katalysiert,

ebenfalls über Neddylierung und Deneddylierung reguliert wird. Fehler im Neddylierungsprozess führen zu einer Anreicherung von I κ B α [195, 196].

Nicht nur durch die Deneddylierung von Cullin Proteinen nimmt das COP9 Signalosom Einfluss auf die Stabilität von Proteinen. Auch die Aktivität von assoziierten DUBs und Kinasen reguliert Proteinstabilität über das CSN. Es wurden verschiedene Proteinkinasen wie IP3-5,6 (Inositol-1,3,4-triphosphat-5,6) Kinase, CK2 (Casein-Kinase 2) und PKD (Proteinkinase D) [197, 198] beschrieben, die mit unterschiedlichen Untereinheiten des COP9 Signalosoms interagieren. Die Phosphorylierung von Proteinen durch CSN-assoziierte Kinasen kann sehr unterschiedliche Folgen haben [189]. Phosphorylierung von c-Jun, Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors, führt zur Stabilisierung von c-Jun und zur Steigerung der AP-1 Aktivität [199]. Die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 durch eine CSN-assoziierte Kinase führt zur beschleunigten Degradation von p53 [200]. Für die Degradation von p53 ist nicht nur die CSN-assoziierte Kinaseaktivität von Bedeutung. Der Kernexport von p53 durch CSN5 führt zur proteasomalen Degradation von p53. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus wurde auch für den Cdk (*cyclin dependent kinase*) Inhibitor p27 beschrieben [201, 202].

Ein weiteres CSN-assoziiertes Protein ist das DUB Enzym USP15, das die Deubiquitinaseaktivität des CSN vermittelt. USP15 Aktivität stabilisiert CRL, da es deren Autoubiquitinierung verhindert [203]. Es konnte gezeigt werden, dass auch durch NF- κ B Aktivierung resynthetisiertes I κ B α (autoregulativer Rückkopplungsmechanismus siehe 1.1.3) durch CSN-assoziiertes USP15 deubiquitiniert und dadurch stabilisiert wird [204].

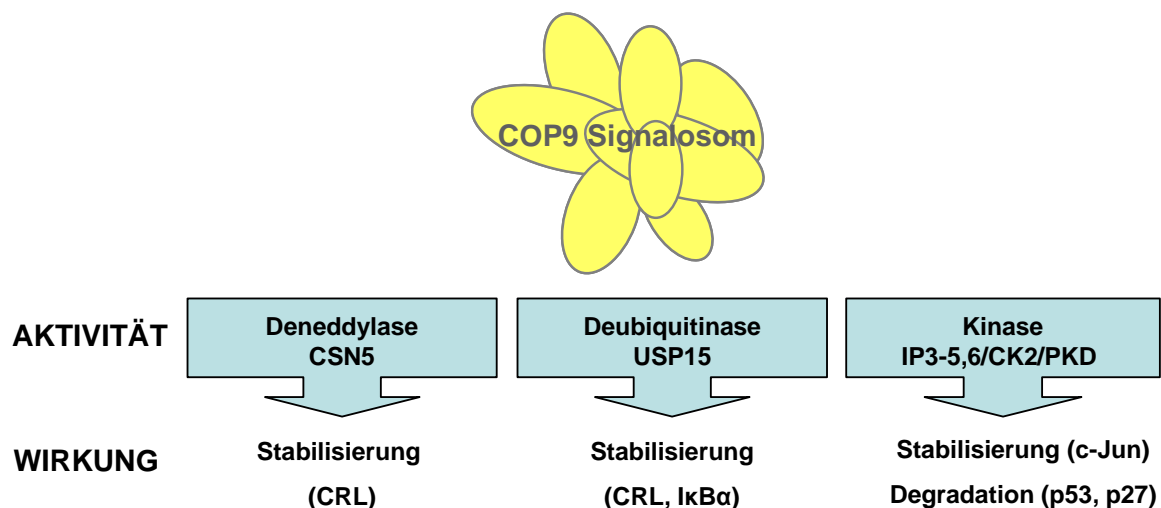


Abbildung 1.9 Das COP9 Signalosom reguliert Proteinstabilität. Schematische Darstellung der CSN Funktionen und der Proteine, die die jeweilige Aktivität vermitteln.

Die vielseitigen Funktionen des COP9 Signalosoms machen das CSN zu einem wichtigen Regulator in Zellen. Es beeinflusst essentielle Prozesse wie Zellzyklus, Homeostase und Entwicklung. Daher ist es nicht erstaunlich, dass CSN5 Überexpression bei vielen humanen Krebsarten im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose steht [205-207].

1.4.2 Das COP9 Signalosom in T-Zellen

Das CSN als pleiotroper Regulator von Proteinstabilität und Transkription hat auch im Immunsystem regulatorische Funktion bei Homeostase, T-Zell Entwicklung, Antigenantwort oder Anergie [208-210]. Die Deletion einzelner CSN Untereinheiten führt in T-Zellen zu unterschiedlichen Phänotypen. CSN8 Deletion inhibiert den Zellzykluseintritt lässt aber NF- κ B Signaltransduktion intakt [208]. CSN5 Deletion hingegen führt zu Defekten in verschiedenen Stadien der T-Zell Entwicklung und zu reduzierter NF- κ B Kerntranslokation [210]. Weiterhin reguliert CSN5 die Adhäsion und Genexpression in T-Zellen [209, 211]. Besonders in Immunzellen ist wenig darüber bekannt wie und in welchen Bereichen das COP9 Signalosom seine Funktion ausübt. Die vielfältigen Phänotypen durch Deletion oder Inhibition einzelner CSN Untereinheiten in T Zellen, machen unterschiedliche CSN Regulationsmechanismen oder CSN Wirkorte wahrscheinlich. Auch die Beteiligung von CSN Subkomplexen ist möglich.

2 Zielsetzung

Antigenstimulation-abhängige NF- κ B Aktivierung beeinflusst die adaptive Immunantwort durch Induktion von zytotoxischen und Antikörper-vermittelten Abwehrmechanismen. Die zentrale Schaltstelle der NF- κ B Aktivierung ist der IKK Komplex. Der Carma1/Bcl10/Malt1 (CBM) Komplex ist die essentielle Komponente für die Antigenrezeptor-induzierte Aktivierung des IKK Komplexes in T-Zellen. Die Regulation des CBM Komplexes ist daher entscheidend für die Signalweitergabe aber auch für das Beenden der Signaltransduktion zu IKK und NF- κ B.

Ziel dieser Arbeit war es die Malt1-vermittelte Regulation des CBM Komplexes zu untersuchen. Malt1 spielt eine zentrale Rolle in der Rekrutierung des IKK Komplexes an den CBM Komplex und wurde erst kürzlich als Träger proteolytischer Aktivität identifiziert. Durch einen *Yeast-Two-Hybrid Screen* sollten neue Interaktionspartner von Malt1 identifiziert und die Interaktion in Zelllinien und primären Zellen unter nativen Bedingungen bestätigt werden. Weiterhin galt es, die Interaktorfunktion für Malt1 und den CBM Komplex aufzuklären. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Bedeutung der unterschiedlichen Malt1 Isoformen und deren Paracaspase-Aktivität in der Induktion von NF- κ B in Zelllinien und primären Zellen auf genetischer Ebene untersucht werden. In verschiedenen Spezies sind zwei Malt1 Splicevarianten bekannt und es ist nicht klar, ob die Isoformen Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur NF- κ B Aktivierung aufweisen. Auch ist die Bedeutung der proteolytischen Malt1 Paracaspase-Aktivität für die Antigen-vermittelte Aktivierung von NF- κ B nicht geklärt.

3 Ergebnisse

3.1 Das COP9 Signalosom reguliert die Aktivität des CBM Komplexes in T-Zellen

3.1.1 Identifikation neuer Malt1 Interaktionspartner mittels *Yeast-Two-Hybrid*

Die stimulusabhängige Ausbildung des Carma1/Bcl10/Malt1 (CBM) Komplexes und dessen Regulation sind essentiell für die Signalweitergabe vom TCR (*T cell receptor*) zu NF- κ B. Neben Modifikationen wie Ubiquitinierung und Phosphorylierung sind besonders Interaktoren wichtig, die diese Modifikationen vermitteln oder als Adaptoren dienen [150, 155, 212].

Malt1 wurde in einem *Yeast-Two-Hybrid Screen* (Y2H) eingesetzt, um neue Interaktoren des CBM Komplexes zu identifizieren (Abbildung 3.1). Hiefür wurde die proteolytisch aktive

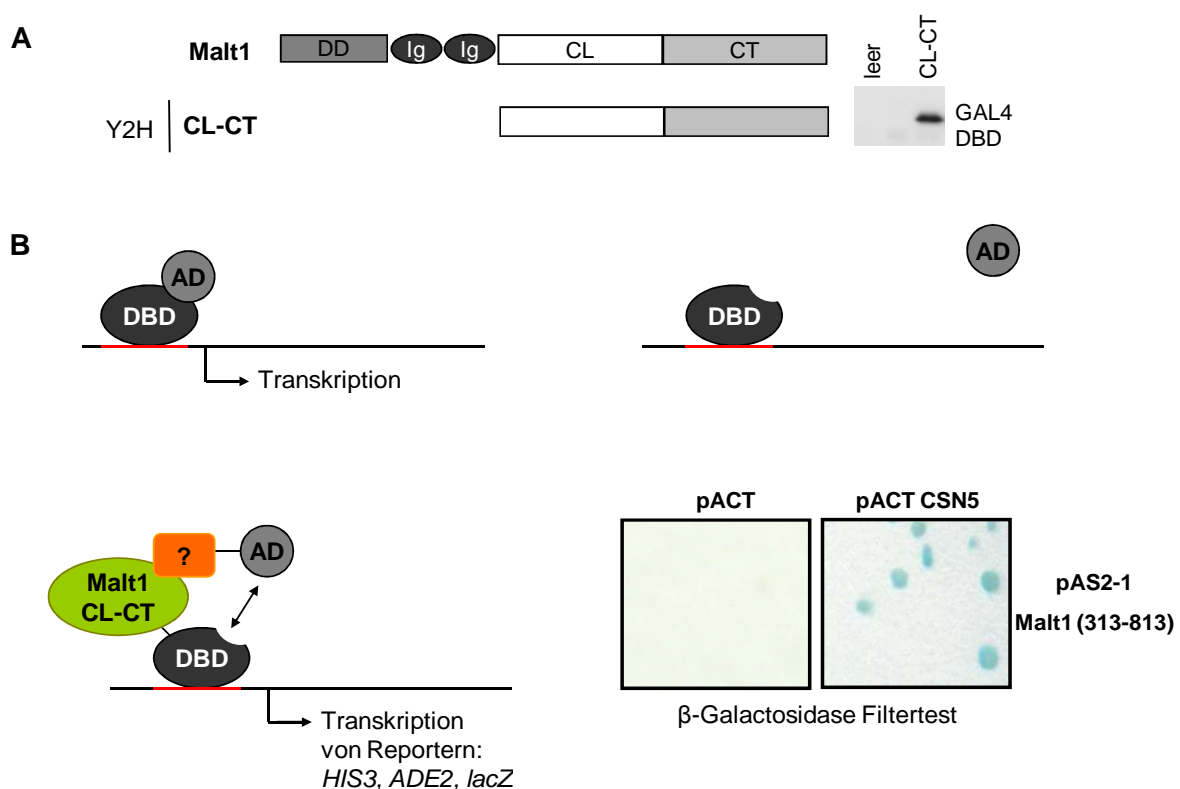


Abbildung 3.1 Y2H zur Identifikation neuer Interaktionspartner von Malt1. (A) Schematische Darstellung von Malt1 und des im Y2H eingesetzten Malt1 Fragments (CL-CT) sowie die Expressionskontrolle von Malt1 CL-CT im Hefestamm AH109 mittels Western Blot. (B) Schematische Darstellung des Y2H Ablaufs und der Identifikation von positiven Interaktionspartnern, mit exemplarischem β -Galactosidase Filtertest für pACT CSN5 aus der B-Zell cDNA Bank und pAS2-1 Malt1 (AS 313-813). CL: *Caspase-like* Domäne, CT: C-Terminus, DBD: DNA Binde Domäne, AD: Aktivierungsdomäne; DD: *Death* Domäne; Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne

Malt1 Caspase-like Domäne (CL) zusammen mit dem Malt1 C-Terminus (CT), der die Ubiquitinakzeptorlysine sowie TRAF6 Bindungsstellen trägt [136, 149, 150], mit der DNA-Bindedomäne (DBD) des Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert und zunächst auf Autoaktivierung und Expression getestet. Malt1 CL-CT (AS: 313-813) wurde in Hefen exprimiert und zeigte keine Autoaktivierung (Abbildung 3.1A und B).

Für die Identifikation von Malt1 CL-CT Interaktionspartnern wurde eine cDNA Bank aus B-Zellen, fusioniert an die GAL4 Aktivierungsdomäne, genutzt. Malt1 CL-CT und B-Zell cDNA Bank kotransformierte Hefen wurden auf -Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatten ausgestrichen, so dass sowohl auf die Plasmid-Auxotrophiemarker als auch die Reporter-Auxotrophiemarker selektioniert wurde. Für die Berechnung der Kotransformationseffizienz wurde der Y2H Ansatz auch auf -Leu/-Trp Selektionsplatten ausgestrichen. Es ergab sich eine Kotransformationseffizienz von 8×10^3 cfu/ μ g DNA. Die daraus berechnete Anzahl der im Y2H getesteten Klone ergab $1,6 \times 10^6$.

Die auf den -Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatten gewachsenen Hefeklone wurden auf Expression des *lacZ* Reporters mittels β -Galaktosidase Filtertest überprüft (Abbildung 3.1B). Plasmide aus Hefeklonen, die eine schwache bis starke Blaufärbung im Filtertest aufwiesen und nicht autoaktivierend waren, wurden sequenziert und über NCBI Blast identifiziert. Weiterhin wurden der korrekte Übergang des Leserahmens der GAL4 Aktivierungsdomäne zur cDNA und die richtige Orientierung der cDNA überprüft. Klone mit falschem Leserahmen oder falscher Orientierung, sowie Falschpositive wie ribosomale oder mitochondriale Proteine [213] wurden verworfen (zirka 50 %). CSN5/JAB1 (COP9 Signalosom Untereinheit 5/*Jun activating binding protein*), UBAP2L (*ubiquitin associated protein 2L*) und NM23-H2 (Nukleosiddiphosphat Kinase Isoform2) konnten als potentielle Interaktionspartner von Malt1 im Y2H identifiziert werden (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Interaktionspartner von Malt CL-CT im Y2H. Weiterhin sind Wirkort und die Interaktion zu Malt1 in Kotransfektionsstudien in HEK293 Zellen angegeben. CSN5: COP9 Signalosom Untereinheit 5, NM23-H2: Nukleosiddiphosphat Kinase Isoform2, UBAP2L: *ubiquitin associated protein 2 L*.

Malt1 Interaktoren im Y2H	Ort der Funktion	Interaktion in HEK293
CSN5/JAB1	Kern/Zytoplasma	+
UBAP2L	Zytoplasma	-
NM23-H2	Kern/Zytoplasma	-

Durch Kotransfektionsstudien in HEK293 Zellen mit Malt1 und den im Y2H identifizierten Kandidaten konnte CSN5 als Interaktor von Malt1, nicht aber die Bindung der anderen Y2H-Interaktionspartner, verifiziert werden (siehe nächster Abschnitt). CSN5 ist eine Untereinheit des COP9 Signalosoms (CSN), einem pleiotropen Regulator von Proteininstabilität, welcher auch in der T-Zell Entwicklung, T-Zell Homeostase und der Antigenantwort eine entscheidende Rolle spielt [208-210].

3.1.2 CSN5 bindet an Malt1 und Carma1

Zur Bestätigung der Y2H Daten wurde die Interaktion zwischen CSN5 und Malt1 in Zellen untersucht. Dafür wurde HisCSN5 mit FlagMalt1 in HEK293 Zellen kotransfiziert. Mittels Flag Immunpräzipitation (IP) konnte in HEK293 Zellen die Interaktion zwischen FlagMalt1 und HisCSN5 bestätigt werden (Abbildung 3.2A).

Malt1 und Bcl10 sind konstitutiv miteinander assoziiert und werden in aktivierten T-Zellen an Carma1 rekrutiert [138]. Daher wurde die Interaktion von CSN5 mit den CBM Komponenten in HEK293 Zellen untersucht. CSN5 interagiert nicht mit Bcl10. Allerdings war es möglich

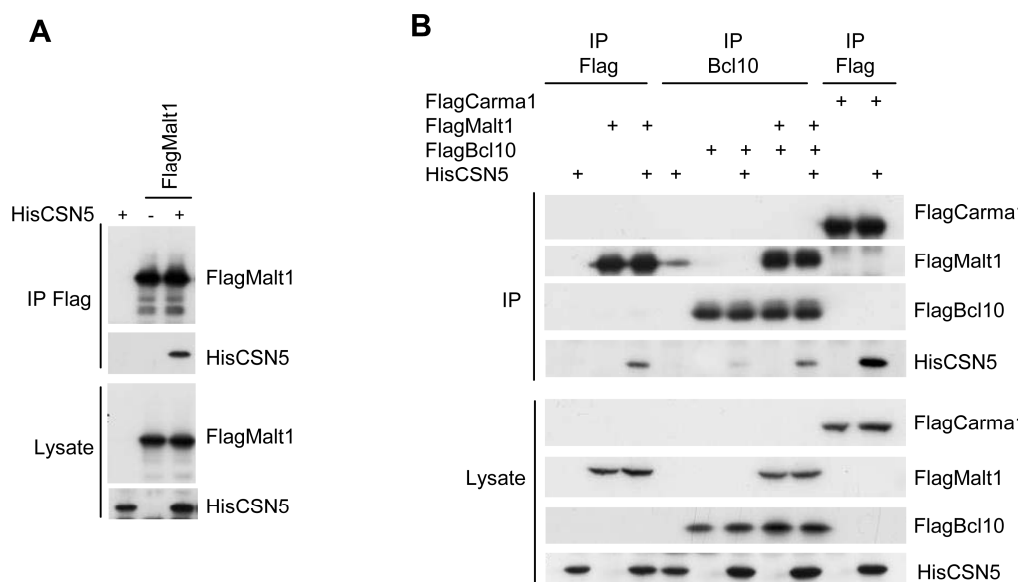


Abbildung 3.2 CSN5 interagiert mit Malt1 und Carma1. (A) CSN5 interagiert mit Malt1 in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit FlagMalt1 und HisCSN5 wie abgebildet transfiziert. Die Zellen wurden in Triton CoIP Puffer lysiert und die Immunpräzipitation wurde mittels eines Flag Antikörpers durchgeführt. Immunpräzipitate wurden durch SDS PAGE und Western Blot analysiert. (B) CSN5 bindet Carma1 und assoziiert mit Bcl10 über Malt1. FlagMalt1, FlagBcl10, FlagCarma1 und HisCSN5 wurden in HEK293 Zellen wie angegeben kotransfiziert. Die Zellen wurden in Triton CoIP Puffer lysiert. Interaktion zwischen CSN5 und Malt1 oder Carma1 wurde durch Flag IP analysiert. Malt1 vermittelte Bindung von CSN5 an Bcl10 wurde mittels Bcl10 IP untersucht.

CSN5 Interaktion zu Bcl10 über Malt1 herzustellen, so dass CSN5 mit Bcl10-gebundenem Malt1 interagiert. Auch FlagCarma1/HisCSN5 Interaktion konnte durch eine Flag IP nachgewiesen werden (Abbildung 3.2B). Die Carma1/CSN5 Bindung war unabhängig von Malt1. Somit konnte neben Bestätigung der im Y2H identifizierten Malt1/CSN5 Interaktion auch Carma1 als neuer Interaktionspartner von CSN5 identifiziert werden.

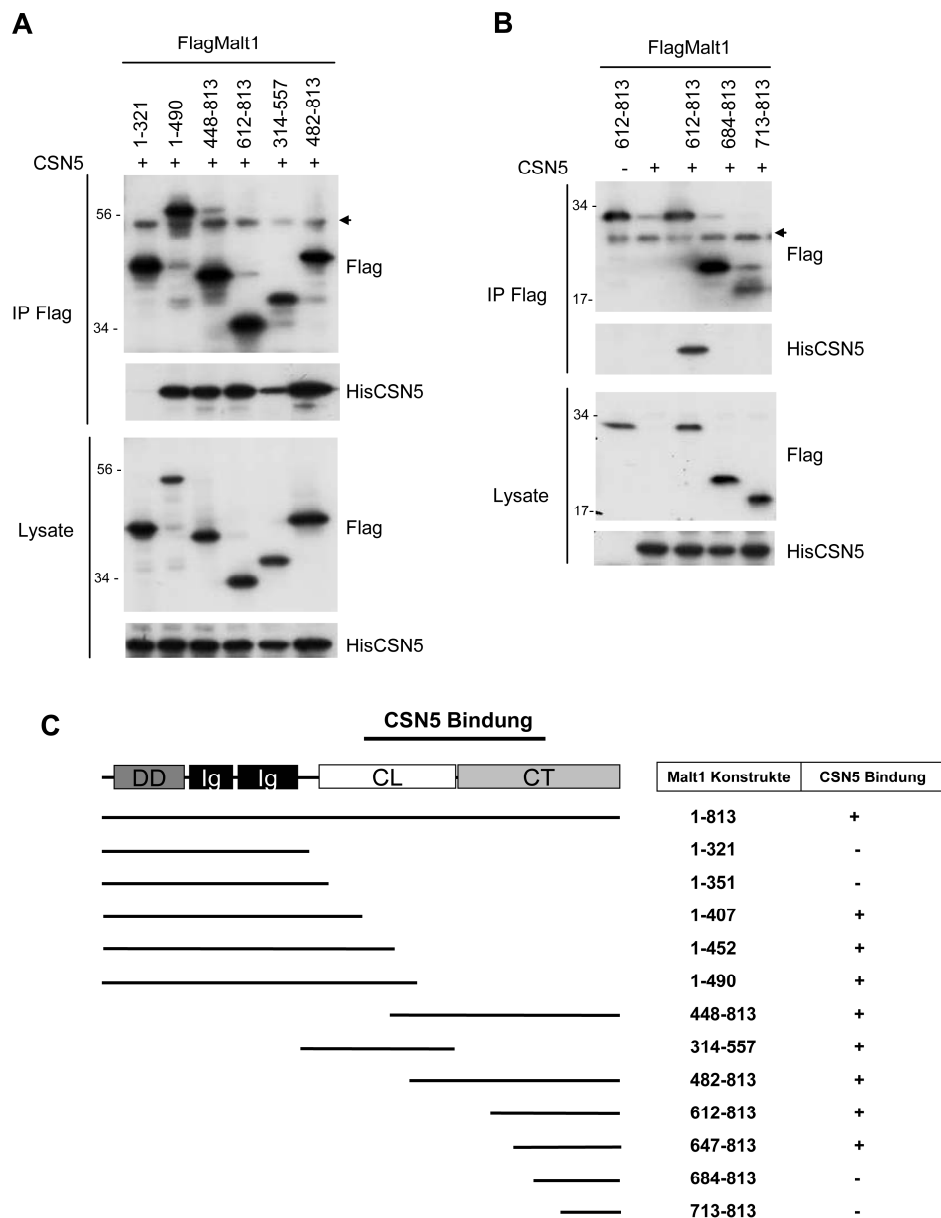


Abbildung 3.3 CSN5 bindet im Bereich der CL Domäne und des CT Endes an Malt1. (A und B) HEK293 Zellen wurden mit HisCSN5 und diversen FlagMalt1 Konstrukten wie angegeben kotransfiziert. Die Analyse der Flag IP durch Western Blot zeigte, dass CSN5 an Malt1 Fragmente im Bereich der CL Domäne und des CT bindet. (C) Schematische Darstellung der Malt1 Konstrukte, die in Kotransfektionsstudien mit CSN5 in HEK293 Zellen verwendet wurden und deren Bindung an CSN5. Pfeil: Immunglobulin

Zur Lokalisation des Bindungsbereiches von CSN5 auf Malt1 wurden FlagMalt1 Deletionsmutanten zusammen mit HisCSN5 in HEK293 Zellen exprimiert und die Bindung von CSN5 an Malt1 durch Flag IP untersucht (Abbildung 3.3A, B und C). Durch Deletion der CL Domäne und der CT Domäne von Malt1 konnte gezeigt werden, dass CSN5 nicht mit dem N-terminalen (NT) Bereich bestehend aus der DD Domäne und den Ig Domänen (AS 1-351) interagiert. Allerdings assoziierte CSN5 mit einer ausgedehnten Region im Bereich der CL Domäne und der CT Domäne (AS 352-683). Die Interaktion von CSN5 mit der C-terminalen Hälfte von Malt1 spiegelt die im Y2H gewonnenen Ergebnisse wieder, da CSN5 Bindung an Malt1 CL-CT (AS 313-813) im Y2H nachgewiesen wurde.

3.1.3 Das COP9 Signalosom interagiert mit dem Carma1/Bcl10/Malt1 Modul in T-Zellen

Die Ausbildung des CBM Komplexes nach T-Zell Aktivierung ist essentiell für die Signalweiterleitung vom TCR zu NF- κ B [3]. Durch die Analyse von Mäusen mit einer konditionalen Deletion von CSN5 in T-Zellen konnte kürzlich eine Bedeutung für CSN5 in der T-Zell Entwicklung und Regulation der NF- κ B Kerntranslokation nachgewiesen werden [210]. Daher ist es von großem Interesse, die endogenen CSN/CBM Interaktionen nach T-Zell-induzierter CBM Aktivierung zu untersuchen.

Für die IP des CSNs wurde ein CSN1 Antikörper verwendet, der effizient den CSN Holokomplex präzipitiert [178]. Dieser Befund wurde in dieser Arbeit exemplarisch verifiziert durch die Analyse der Interaktion von CSN1 mit CSN2, CSN3, CSN5 und CSN8 (Abbildung 3.4A und siehe [178, 214]). Durch CSN1 IP wurde dann auch die endogene Interaktion von Malt1 und dem CSN in T-Zellen untersucht. Aktivierung von Jurkat T-Zellen und primären humanen T-Zellen durch CD3/CD28 Kostimulation mit CD3/CD28-spezifischen Antikörpern führte zu einer Stimulus-abhängigen Interaktion von Malt1 mit dem CSN. Auch die Stimulation der T-Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin (siehe Methoden 7.4.6), erwies sich als starker Stimulus für die Interaktion zwischen CSN und Malt1 in Jurkat T-Zellen und in primären humanen T-Zellen (Abbildung 3.4A, B und C). Nach Stimulation mit dem Zytokin TNF α , ebenfalls ein Induktor von NF- κ B,

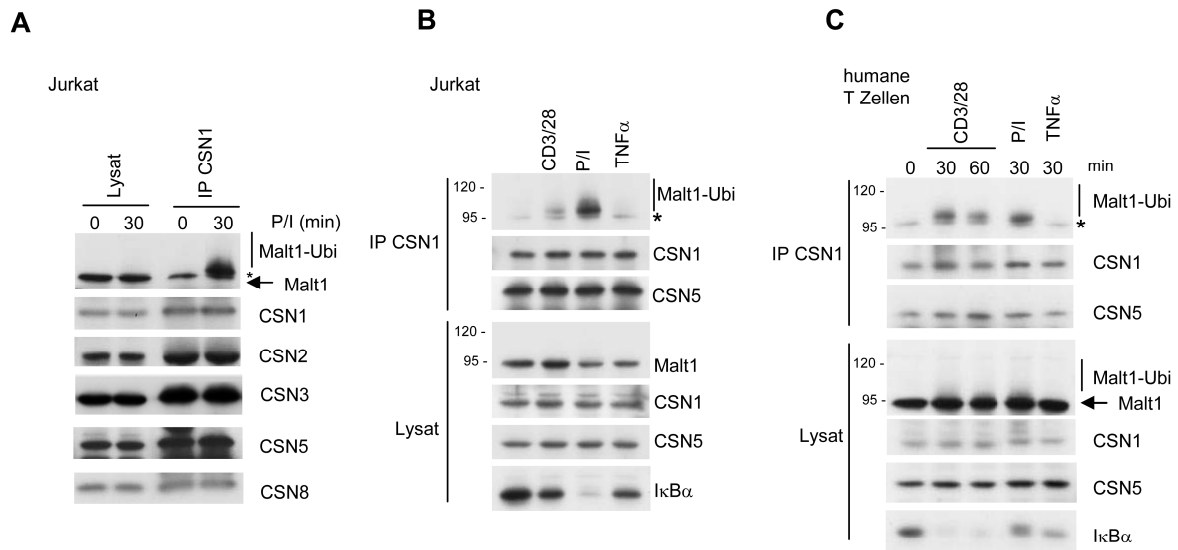


Abbildung 3.4 T-Zell Stimulation führt zur Assoziation zwischen CSN und Malt1. (A) Das CSN interagiert stimulusabhängig mit Malt1. Jurkat T-Zellen wurden wie angegeben stimuliert und das CSN mittels CSN1 Antikörper präzipitiert. (B) und (C) CSN/CBM Interaktion findet spezifisch nach TCR Stimulation statt. Jurkat T-Zellen (B) oder humane primäre T-Zellen (C) wurden wie abgebildet stimuliert und die IP wie in (A) angegeben durchgeführt. Malt1-Ubi: Ubiquitiniertes Malt1; Stern: unspezifische Bande, die auch in der IP mit einem anti-IgG Isotyp-Kontrollantikörper sichtbar war (siehe Abbildung 3.6).

war hingegen keine Interaktion zwischen Malt1 und dem CSN erkennbar. In der CSN1 IP, besonders von unstimulierten T-Zellen, ist eine Bande zu sehen, die eine etwas langsamere Migration im Vergleich zur Malt1 Bande im Lysat aufweist (Abbildung 3.4). Durch einen anti-IgG Isotyp-Kontrollantikörper konnte nachgewiesen werden, dass diese Bande unspezifisch ist (Abbildung 3.6).

Die nach Stimulation in der CSN1 IP sichtbare Malt1 Bande hat ein leicht diffuses Aussehen und weist im Vergleich zu Malt1 in Lysaten eine stark retardierte Migration auf (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5). Von A. Oeckinghaus [150] konnte gezeigt werden, dass diese Form von Malt1 ubiquitiniertem Malt1 entspricht und dass hauptsächlich ubiquitiniertes Malt1 in den aktiven CBM Komplex eingebaut wird. Die bevorzugte Bindung des CSNs an ubiquitiniertes Malt1 deutet darauf hin, dass das CSN in aktivierten T-Zellen präferentiell an den assemblierten CBM Komplex bindet. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der zeitliche Verlauf der CSN und CBM Interaktion nach PMA/Ionomycin (P/I) Stimulation von Jurkat T-Zellen untersucht. Die Interaktion zwischen CSN und Malt1 war zwischen 15 und 30 Minuten maximal und nahm danach langsam ab (Abbildung 3.5A). Auch Carma1 war in der CSN1 IP nach Aktivierung der T-Zellen mit P/I mit einer der Malt1 Interaktion entsprechenden Kinetik zu detektieren (Abbildung 3.5B). Da die Interaktion von CBM und

CSN Komplex durch CSN5/Malt1 Bindung im Y2H identifiziert worden ist, wurde CSN/CBM Interaktion auch mittels CSN5 IP untersucht. Die CSN/CBM Interaktion war, genau wie in der CSN1 IP, nach 20 Minuten P/I Stimulation durch Carma1 Interaktion detektierbar und war nach 90 Minuten nicht mehr zu sehen (Abbildung 3.5C). Allerdings präzipitierte der CSN5 Antikörper das CSN relativ schlecht, da CSN1 Interaktion kaum detektierbar war. Dadurch war es nicht möglich, die retardierte, etwas diffuse Malt1 Bande nach Stimulation in der CSN5 IP zu detektieren (nicht gezeigt).

Zum Vergleich der CBM Komplex Kinetik mit der CSN/Malt1 oder CSN/Carma1 Kinetik wurde Bcl10/Carma1 Interaktion durch Bcl10 IP untersucht. Der Stimulus-abhängige Aufbau und Zerfall des CBM Komplexes fand im gleichen Zeitrahmen statt, wie die CSN/CBM Interaktion (Abbildung 3.5A, unterer Abschnitt). Die CSN/CBM Interaktion wurde auch in

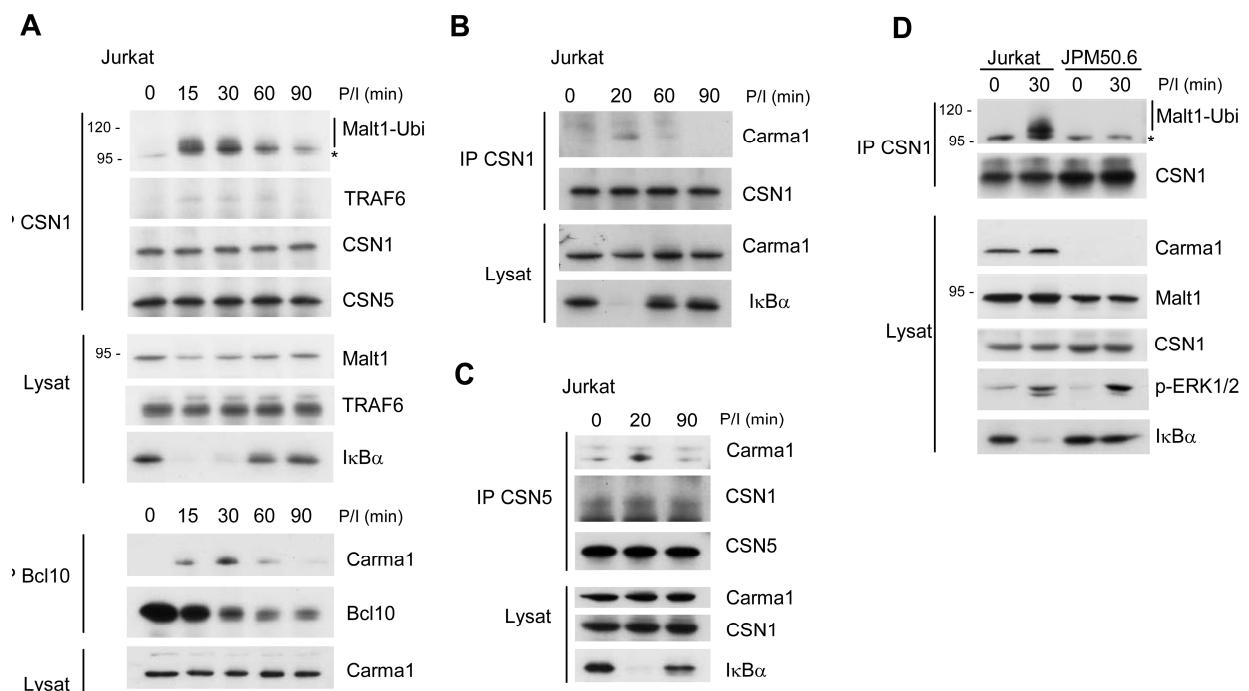


Abbildung 3.5 Kinetik der Stimulus-abhängigen Interaktion zwischen CSN und CBM. (A) Vergleich der CSN/Malt1/TRAF6 und CBM Kinetik. Jurkat T-Zellen wurden mit P/I für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Die Zellen wurden in CoIP Puffer lysiert und ein CSN1 Antikörper wurde für die CSN IP oder ein Bcl10 Antikörper für die CBM IP verwendet. IPs wurden mittels Western Blot durch die angegeben Antikörper analysiert. (B) und (C) Stimulusabhängige Bindung des CSNs an Carma1. Jurkat T-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit P/I stimuliert und in CoIP Puffer lysiert. Die CSN IP wurde mittels CSN1 Antikörper (B) oder CSN5 Antikörper (C) durchgeführt. (D) CSN/Malt1 Interaktion benötigt Carma1. Jurkat T-Zellen oder die Carma1-defiziente T-Zelllinie JPM50.6 wurden wie angegeben stimuliert und Malt1/CSN Interaktion mittels CSN1 IP untersucht. In JPM50.6 Zellen war im Gegensatz zu Jurkat T-Zellen keine Stimulus-abhängige Malt1/CSN Interaktion detektierbar. Phänotyp und Stimulation der Zellen wurden durch Detektion von Carma1, phospho-ERK1/2 und IκBα verifiziert. Der Malt1 Antikörper detektiert eine unspezifische Bande (markiert durch einen Stern), die auch nach IP mit einem anti-IgG Isotyp-Kontrollantikörper sichtbar war (siehe Abbildung 3.6). Malt1-Ubi: Ubiquitiniertes Malt1

der Carma1-defizienten Jurkat T-Zell Linie JPM50.6 [113] analysiert. Durch den Verlust von Carma1 weisen JPM50.6 Zellen einen Block der TCR-abhängigen NF- κ B Aktivierung auf. Die Aktivierung der MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) ERK1 und 2 (*extracellular signal-regulated kinase*) verläuft allerdings normal (Abbildung 3.5 und siehe [113]). Die Stimulus-abhängige CSN/Malt1 Interaktion war in JPM50.6 Zellen, im Gegensatz zu Jurkat T-Zellen, nicht detektierbar (Abbildung 3.5D). Das Ergebnis zeigt die essentielle Bedeutung von Carma1 für die CSN/Malt1 Interaktion und verifiziert, dass die CSN/Malt1 Assoziation nur im Kontext des CBM Komplex stattfindet.

Zeitlich parallel zur CSN/CBM Interaktion war auch eine schwache Bindung von TRAF6 an das CSN zu sehen (Abbildung 3.5A). Durch vorherige Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von TRAF6 an Malt1 abhängig von T-Zell Aktivierung ist, zur Ubiquitinierung von Malt1 führt und dass diese Ubiquitinierung essentiell für die Signalweitergabe vom CBM zum IKK Komplex ist [150]. Die Interaktion von TRAF6 mit dem CSN ist ein weiterer Hinweis dafür, dass das CSN hauptsächlich mit Malt1 im CBM Komplex interagiert.

Das COP9 Signalosom erfüllt Aufgaben im Kern und im Zytoplasma, wohingegen der CBM Komplex seine Funktion bei der Signalweiterleitung vom TCR zu NF- κ B ausschließlich im

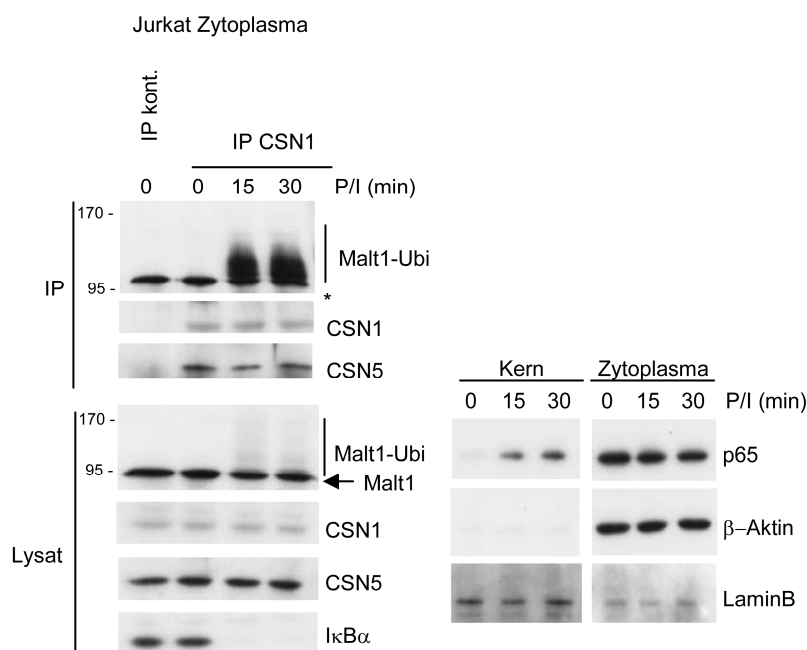


Abbildung 3.6 Die Interaktion von Malt1 und CSN findet im Zytoplasma statt. Jurkat T-Zellen wurden mit P/I wie angegeben stimuliert und in Kern- und Zytoplasma fraktioniert. Die Qualität der Fraktionen wurde durch Detektion von zytoplasmatischem β -Aktin oder kernlokalisiertem LaminB und der stimulusabhängigen Kerntranslokation von NF- κ B p65 überprüft. CSN1 wurde aus dem zytosolischen Extrakt immunpräzipitiert und Interaktion zu Malt1 wurde mittels Western Blot analysiert. Malt1-Ubi: Ubiquitiniertes Malt1; Stern: unspezifische Bande, die auch in der IP mit einem anti-IgG Isotyp-Kontrollantikörper sichtbar ist.

Zytoplasma ausübt. Die Lokalisation der CSN/CBM Interaktion wurde mittels Zellfraktionierung in Kern und Zytoplasma Fraktionen untersucht. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch Detektion von Kern- bzw. Zytoplasma-spezifischen Proteinen verifiziert. LaminB war hauptsächlich in der Kernfraktion und β -Aktin in der Zytoplasmafraktion detektierbar (Abbildung 3.6). Außerdem war NF- κ B p65 Kerntranslokation erst nach Stimulation zu sehen und dies führte gleichzeitig zu einer leichten Abnahme in der Zytoplasmafraktion. Die Immunpräzipitation von CSN1 aus der Zytoplasmafraktion bestätigte die Interaktion von ubiquitiniertem Malt1 und dem CSN im Zytosol von aktivierten T-Zellen (Abbildung 3.6).

3.1.4 Das COP9 Signalosom steuert IKK Komplex Aktivierung in T-Zellen

Zur Aufklärung der Funktion der Stimulus-abhängigen CSN/CBM Interaktion in T-Zellen wurde ein siRNA-vermittelter Ansatz gewählt. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Inhibition von CSN2 und CSN5 durch siRNA effizient das CSN inhibiert [215]. Wie schon zuvor von Miyauchi et al [215] beobachtet führte die Verwendung von CSN2 siRNAs in Jurkat T-Zellen neben einer Reduktion von CSN2 auch zu einer Verringerung der CSN5 Proteinmenge (Abbildung 3.7A). Im Gegensatz dazu führte eine siRNA gegen CSN5 zwar zu einer Verringerung von CSN5, hatte aber nur geringe Effekte auf CSN2. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Experimenten CSN2 und CSN5 siRNAs verwendet. Expressionslevel von CSN1, CSN3 und CSN8 wurden von CSN5 und CSN2 siRNAs in Jurkat T-Zellen nur geringfügig beeinflusst.

Eine wichtige Funktion des CSNs besteht in der Deneddylierung von Cullin Proteinen, was durch die Aktivität von CSN5 katalysiert wird. Cullin1 ist das Gerüstprotein der SCF (Skp1-Cullin1 F-box Protein) Ubiquitinligasen. Cullin Proteine durchlaufen einen Prozess der Neddylierung und Deneddylierung. Die Entfernung des Ubiquitin-ähnlichen Proteins Nedd8 durch die CSN5 Metalloproteaseaktivität ist die am besten charakterisierte Eigenschaft des COP9 Signalosoms [192, 216]. Die Effektivität der CSN siRNAs kann daher durch den Neddylierungsstatus von Cullin1 bestimmt werden. Die Reduktion von CSN2 mittels siRNA führte zu einer Anreicherung von Nedd8-modifiziertem Cullin1 (Abbildung 3.7B), was klar die Inhibition des CSNs durch die verwendete siRNA belegt.

Die IL-2 (Interleukin-2) mRNA Induktion ist ein Maß für die Aktivierung von T-Zellen. Perez et al [209] konnten zeigen, dass die Inhibition von CSN5 durch ein CSN5-

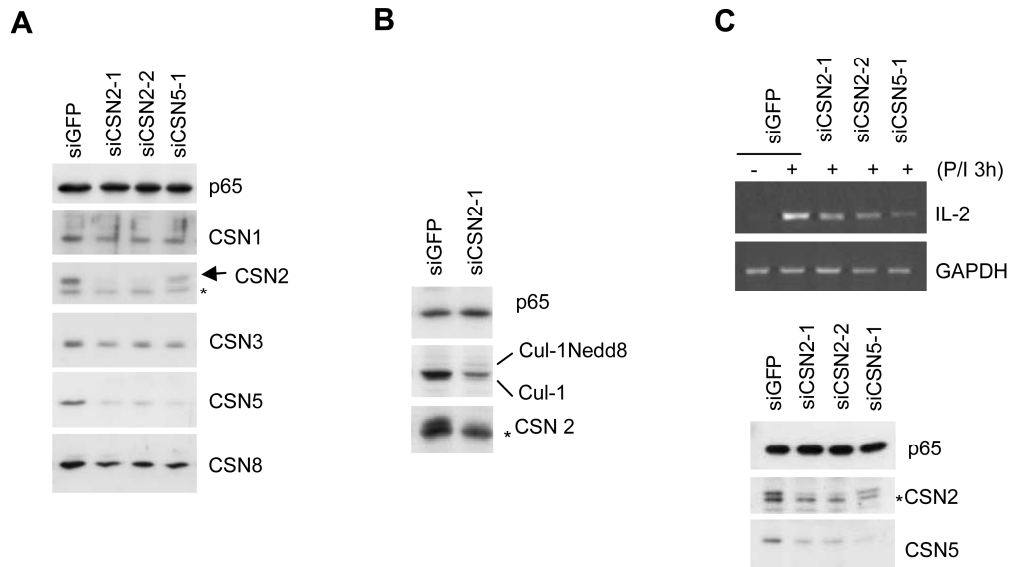


Abbildung 3.7 CSN2 und CSN5 siRNAs beeinflussen Expression verschiedener CSN Komplexkomponenten. (A) siRNA-vermittelte Reduktion von CSN2 beeinflusst auch CSN5 Expressionslevel. Jurkat T-Zellen wurden mit GFP (Kontrolle), CSN2 oder CSN5 siRNAs transfiziert. Lysate wurden mittels Western Blot durch die angegebenen Antikörper analysiert. (B) Inhibition von CSN2 führt zu einer Anreicherung von neddyliertem Cullin1. Jurkat T-Zellen wurden mit GFP (Kontrolle) oder CSN2 siRNA transfiziert und Lysate mittels Western Blot analysiert. (C) CSN2 und CSN5 regulieren das IL-2 mRNA Level. Jurkat T-Zellen wurden mit GFP (Kontrolle), CSN2 oder CSN5 siRNAs transfiziert und für drei Stunden mit P/I stimuliert. Die RNA wurde isoliert und in RT-PCR Reaktionen für IL-2 und GAPDH als Kontrolle eingesetzt. Die Effizienz der siRNAs wurde mittels Western Blot überprüft. Eine unspezifische Bande, die durch den CSN2 Antikörper detektiert wurde, ist in allen Abbildungen durch einen Stern markiert.

antagonistisches Peptid die Induktion der IL-2 mRNA in aktivierten T-Zellen hemmt. Reduktion von CSN2 und CSN5 durch siRNA Transfektion in Jurkat T-Zellen führte ebenfalls zu einer verringerten IL-2 mRNA Synthese nach Stimulation mit P/I (Abbildung 3.7C). Allerdings ist es nicht möglich durch dieses Experiment direkt auf eine spezifische Funktion des CSNs zu schließen, da das CSN in der Signaltransduktionskaskade ausgehend vom TCR unterschiedliche Faktoren eventuell sogar auf gegensätzliche Weise beeinflussen kann.

Der IKK Komplex, bestehend aus den Kinasen IKK α , IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ , liegt in der Signaltransduktionskaskade vom TCR zu NF- κ B direkt unterhalb des CBM Komplexes. Aus diesem Grund ist die IKK Kinaseaktivität ein guter Marker für die Effektivität der Signaltransduktion über den CBM Komplex. Zur Bestimmung der IKK Kinaseaktivität wurden Jurkat T-Zellen mit GFP, CSN2 oder CSN5 siRNAs transfiziert und mit CD3/CD28-spezifischen Antikörpern oder TNF α stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die Isolation des IKK Komplexes wurde ein IKK γ Antikörper in

der IP verwendet, der effektiv den ganzen IKK Komplex präzipitiert. Die Aktivität des IKK Komplexes wurde durch die *in vitro* Phosphorylierung von rekombinantem GST-I κ B α (AS 1-53) bestimmt (Abbildung 3.8A und B). CD3/CD28-induzierte Aktivierung des IKK Komplexes in CSN2-inhibierten Jurkat T-Zellen war im Vergleich zu GFP Kontrollzellen um fast 60 % reduziert (Abbildung 3.8A). Auch die Inhibition von CSN5 durch eine CSN5 siRNA führte nach CD3/CD28 Stimulation zu verringerter Phosphorylierung von rekombinantem I κ B α durch den IKK Komplex. Diese Reduktion war allerdings nicht so ausgeprägt wie im Fall der beiden CSN2 siRNAs (Abbildung 3.8B). TNF α -abhängige Stimulation von T-Zellen ist deutlich schwächer als TCR-abhängige Aktivierung, so dass TNF α -induzierte IKK Aktivität im Vergleich zu TCR-abhängigen Aktivierung deutlich geringer ausfiel (Abbildung 3.8A und B). In CSN2 siRNA-transfizierten Zellen war die TNF α -induzierte IKK Aktivität vergleichbar zu Kontrollzellen, CSN5 siRNA-transfizierte Zellen wiesen eine geringe Reduktion der TNF α -abhängigen IKK Kinaseaktivität auf. Die Inhibition der IKK Kinaseaktivität durch CSN2 oder CSN5 siRNAs war spezifisch für den

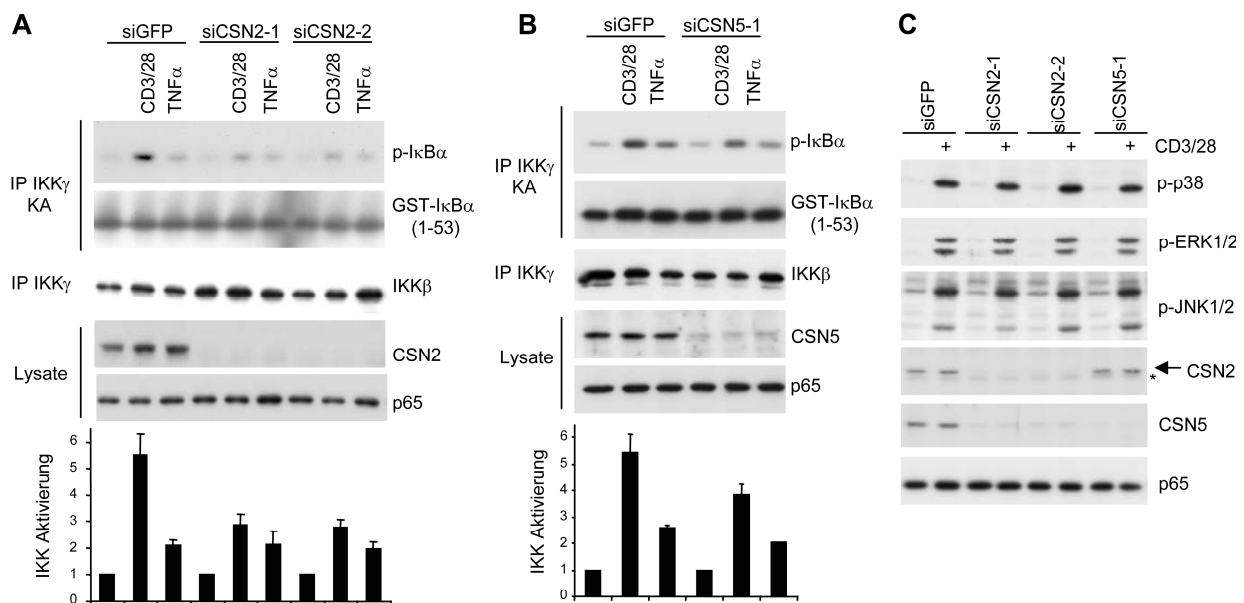


Abbildung 3.8 CSN2 und CSN5 werden für optimale TCR-induzierte IKK Aktivierung benötigt. (A) und (B) Jurkat T-Zellen wurden mit einer GFP siRNA, CSN2 siRNAs (A) oder mit einer CSN5 siRNA (B) transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit anti-CD3/CD28 Antikörpern oder TNF α für 20 Minuten stimuliert und in *in vitro* IKK Kinasereaktionen eingesetzt. Phosphorylierung von rekombinantem GST-I κ B α (AS 1-53) wurde mittels eines phosphospezifischen I κ B α Antikörpers detektiert und densitometrisch quantifiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Kinasereaktionen. (C) CSN2 und CSN5 haben keinen Effekt auf die TCR-abhängige Aktivierung von MAPK Kinasen in Jurkat T-Zellen. Jurkat T-Zellen wurden mit GFP, CSN2 oder CSN5 siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden 20 Minuten mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert und die Lysate mittels Western Blot analysiert.

TCR-abhängigen IKK/NF- κ B Signalweg, da durch CD3/CD28 Kostimulation-induzierte Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK1/2 (Jun N-terminale Kinase) nicht beeinflusst war (Abbildung 3.8C). Daraus ergibt sich, dass das COP9 Signalosom spezifisch die TCR-induzierte IKK Aktivierung reguliert und keinen Einfluss auf andere untersuchte Signalmediatoren hat.

3.1.5 Bcl10 wird lysosomal degradiert

Die aktivierungsabhängige Degradation von Bcl10 in T-Zellen ist ein entscheidender Faktor für die Auflösung des CBM Komplexes und damit auch für die Terminierung der NF- κ B Aktivität [139, 155, 158, 159]. Der Mechanismus der Bcl10 Degradation ist bis jetzt nicht genau identifiziert. Es gibt einige Hinweise darauf, dass der Degradationsprozess von Bcl10 Proteasom-unabhängig abläuft [157, 158]. Andere Daten zeigen hingegen, dass Bcl10 proteasomal degradiert wird [139]. Zur Charakterisierung des Bcl10 Degradationsprozesses wurden Jurkat T-Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 und lysosomalen Proteaseinhibitoren behandelt. In Gegenwart von MG132 war die P/I-induzierte Degradation von Bcl10 vergleichbar mit Kontrollzellen, obwohl die Degradation von I κ B α stark gehemmt war. Daraus ergab sich auch, dass in MG132-behandelten Zellen im Gegensatz zur Kontrolle nach P/I Stimulation keine NF- κ B DNA Bindungsaktivität vorhanden war (Abbildung 3.9A).

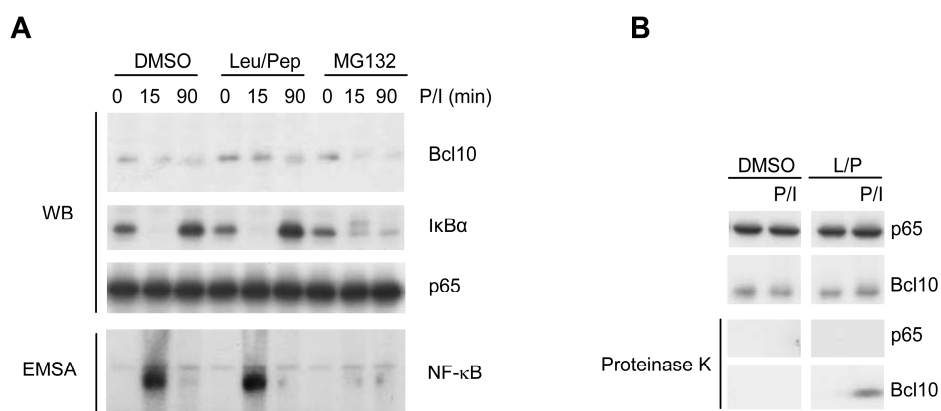


Abbildung 3.9 Inhibition von lysosomalen Proteasen blockiert die Bcl10 Degradation. (A) Inhibition von Jurkat T Zellen mit MG132 für 1 h, Leupeptin/PepstatinA (L/P) oder DMSO für 16 h und nachfolgender Stimulation mit P/I für die angegebenen Zeitpunkte. Die Zellysate wurden mittels Western Blot und EMSA analysiert. I κ B α diente als Nachweis für die Inhibition der proteasomalen Degradation. (B) P/I Stimulation induziert die Migration von Bcl10 in eine ProteinaseK-resistente Fraktion. Jurkat T-Zellen wurden mit L/P oder DMSO für 16 h behandelt, anschließend stimuliert (P/I 25 min) und lysiert. Die Proteinextrakte wurden mit 0.3 mg/ml ProteinaseK für 10 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionen wurden mittels SDS PAGE and Western Blot durch die angegebenen Antikörper analysiert.

Allerdings führte die Inhibition von lysosomalen Cystein- und Aspartat-Proteasen durch Leupeptin und PepstatinA (L/P) zu einer Inhibition der P/I-induzierten Bcl10 Degradation. Durch den Block der Bcl10 Degradation ergab sich allerdings keine verlängerte NF- κ B DNA Bindungsaktivität. Es ist möglich, dass der Import von Bcl10 in lysosomale Strukturen nicht durch L/P inhibiert wurde, so dass Bcl10 trotz der Inhibition der Degradation für den CBM Komplex nicht mehr zur Verfügung stand.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Bcl10 ProteinaseK Resistenz getestet. ProteinaseK Resistenz kann ein Nachweis für Proteine in vesikulären Strukturen sein. Bcl10 war in P/I stimulierten Jurkat T-Zellen in der Gegenwart von L/P gegenüber ProteinaseK resistent, wohingegen p65 und auch Carma1 und Malt1 nicht ProteinaseK-resistent waren (Abbildung 3.9B und nicht gezeigt). Die Blockade der Bcl10 Degradation durch Inhibitoren lysosomaler Proteasen und der Nachweis von Bcl10 in vesikulären Strukturen durch ProteinaseK Resistenz liefern damit weitere Hinweise dafür, dass Bcl10 lysosomal degradiert wird.

3.1.6 Bcl10 Degradation wird durch das CSN reguliert

Die Degradation von Bcl10 ist entscheidend für den Abbruch der Signaltransduktion über den CBM Komplex, da dadurch seine Integrität verloren geht. Die große Bedeutung des COP9 Signalosoms bei der Regulation von Proteinstabilität [174, 175] war der Grund für die Untersuchung der Stimulus-abhängigen Bcl10 Degradation in CSN2- oder CSN5-depletierten Zellen. In Jurkat T-Zellen mit verringertem CSN2 Proteinlevel war die durch CD3/CD28 Stimulation induzierte Bcl10 Degradation im Vergleich zu GFP Kontrollzellen deutlich beschleunigt (Abbildung 3.10A). Auch die P/I-induzierte Degradation von Bcl10 in CSN2-inhibierten Zellen verlief deutlich schneller ab als in Kontrollzellen (Abbildung 3.10B). In Jurkat T-Zellen in denen das CSN5 Proteinlevel durch siRNA reduziert war, konnte ebenfalls eine beschleunigte Degradation von Bcl10 nach Stimulation der T-Zellen mit P/I oder CD3/CD28-spezifischen Antikörpern beobachtet werden (Abbildung 3.10C und D). Die Carma1 und Malt1 Level waren in CSN2 siRNA- oder CSN5 siRNA-transfizierten Zellen hingegen vergleichbar mit Kontrollzellen (Abbildung 3.10A-D).

Die Ubiquitinierung von Bcl10 ist entscheidend für Bcl10 Degradation [155, 158, 159]. Um zu klären, ob die beschleunigte Degradation von Bcl10 in CSN2- und CSN5-depletierten Zellen durch verstärkte Ubiquitinierung bedingt ist, wurde in diesen Zellen Bcl10 Ubiquitinierung untersucht. In Jurkat T-Zellen transfiziert mit CSN2 oder CSN5 siRNAs war

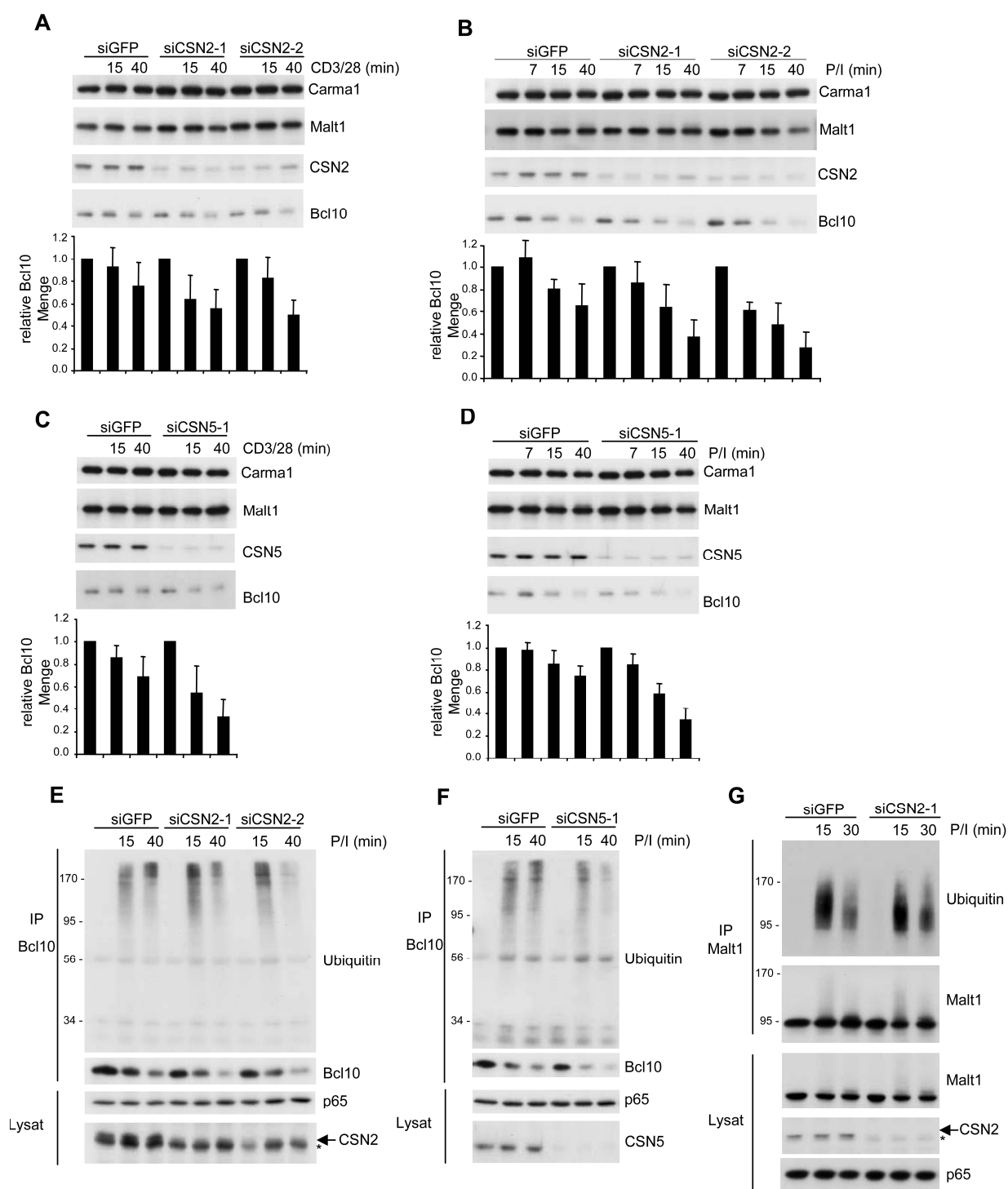


Abbildung 3.10 CSN2 und CSN5 regulieren die Bcl10 Stabilität. (A, B, C und D) Jurkat T-Zellen wurden mit GFP, CSN2 (A und B) oder CSN5 (C und D) siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden nach 72 h mit CD3/CD28-spezifischen Antikörpern oder P/I für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert und Zelllysate mittels Western Blot analysiert. Relative Bcl10 Mengen wurden von je drei unabhängigen Experimenten densitometrisch bestimmt und quantifiziert. (E, F und G) Das CSN kontrolliert die Ubiquitinierung von Bcl10. Jurkat T-Zellen wurden mit GFP, CSN2 oder CSN5 siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert. Die IP fand unter Verwendung eines Bcl10 Antikörpers (E und F) oder mittels eines Malt1 Antikörpers (G) statt. Die IPs wurden mittels SDS PAGE und Western Blot analysiert. Inhibition des CSNs durch siRNAs beschleunigte die Ubiquitinierung von Bcl10, die Malt1 Ubiquitinierung war unbeeinflusst. Eine unspezifische Bande markiert durch einen Stern wurde durch den CSN2 Antikörper erkannt.

die Ubiquitinierung von Bcl10 nach 15 Minuten maximal und nahm danach ab (Abbildung 3.10E). Im Gegensatz dazu war die Ubiquitinierung von Bcl10 in GFP Kontrollzellen nach 15 Minuten deutlich geringer als in Zellen mit verringertem CSN2 oder CSN5 Proteinlevel. Weiterhin nahm die Ubiquitinierung in Kontrollzellen, im Gegensatz zu CSN2 siRNA- oder CSN5 siRNA-transfizierten Zellen, bis 40 Minuten P/I Stimulation weiter zu.

Da das CSN mit dem CBM Komplex interagiert und in diesem Komplex neben Bcl10 auch Malt1 ubiquitiniert wird [150], wurde die Ubiquitinierung von Malt1 nach T-Zell Aktivierung untersucht. Die P/I-induzierte Ubiquitinierung von Malt1 war durch die Inhibition des CSNs nicht beeinflusst (Abbildung 3.10G).

Die stärkere Ubiquitinierung von Bcl10 zu frühen Stimulationszeitpunkten in CSN2- und CSN5-depletierten Zellen steht im Einklang mit der beschleunigten Degradation von Bcl10. Das DUB Enzym USP15 (*ubiquitin specific peptidase 15*) koeluiert mit dem CSN [203]. USP15 könnte durch seine Deubiquitinaseaktivität für die Stabilisierung von Bcl10 durch Verlangsamung der initialen Bcl10 Ubiquitinierung nach T-Zell Aktivierung verantwortlich sein. Eine Inhibition von USP15 durch siRNA müsste, falls Bcl10 Ubiquitinierung von USP15 reguliert wird, ebenfalls zu einer beschleunigten Bcl10 Degradation führen. Allerdings war die P/I-induzierte Bcl10 Degradation in USP15-depletierten Zellen vergleichbar mit der Bcl10 Degradation in Kontrollzellen (Abbildung 3.11). Dieser Befund zeigt, dass USP15 keine Rolle für die Regulation der Bcl10 Stabilität durch das CSN spielt. Es lässt sich jedoch keinesfalls ausschließen, dass es andere CSN-assoziierte DUB Enzyme gibt, die für Regulation der Stabilität von Bcl10 nach Stimulation verantwortlich sein können.

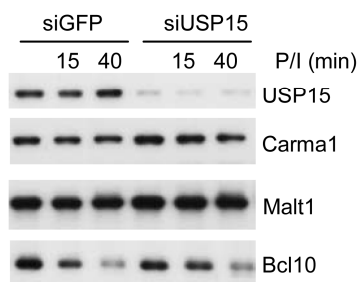


Abbildung 3.11 USP15 hat keinen Effekt auf die Stabilität von Bcl10. Jurkat T-Zellen wurden mit GFP oder USP15 siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden nach 72 h mit CD3/CD28-spezifischen Antikörpern oder P/I für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert und die Zelllysate mittels Western Blot analysiert

Damit wurde im Zuge dieser Arbeit durch Interaktionsstudien das CSN als neuer Bindungspartner des CBM Komplexes identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das CSN die Integrität des CBM Komplexes durch die Regulation der Bcl10 Stabilität beeinflusst und damit die Signaltransduktion über den Komplex reguliert.

3.2 Malt1 Isoformen und ihre Paracaspase-Aktivität in der NF- κ B Aktivierung in T-Zellen

In der NCBI Datenbank sind zwei humane Malt1 Isoformen verzeichnet, die zwei Splicevarianten des Malt1 Proteins darstellen. Aber zum Beispiel auch in Maus, Ratte und Schimpanse sind zwei Malt1 Isoformen vertreten. Die Malt1 Isoformen Malt1 A und Malt1 B unterscheiden sich nur durch einen elf Aminosäure Bereich, den Malt1 A im Gegensatz zu Malt1 B zusätzlich trägt (Abbildung 3.12). Dieser Bereich wird im humanen Malt1 durch Exon7 codiert und liegt zwischen der zweiten Immunglobulin-ähnlichen (Ig) und der Caspase-like (CL) Domäne (AS 309-319 in Malt1 A). Malt1 A hat durch das zusätzliche Exon neben den zwei TRAF6 Bindestellen in der CT Domäne zwei weitere potentielle TRAF6 Bindestellen [151]. Es ist jedoch nicht klar, ob die beiden Isoformen unterschiedliche Aktivität aufweisen.

Malt1 wird aufgrund seiner CL Domäne in die Familie der Paracaspasen eingeordnet. Histidin H415 und Cystein C464 in Malt1 A und H404 und C453 in Malt1 B bilden das katalytische Zentrum der CL Domäne [136]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Malt1 den NF- κ B Inhibitor A20 und auch Bcl10 schneiden kann und dass die CL Domäne für diese katalytische Aktivität verantwortlich ist [147, 148]. Doch der Beitrag der Paracaspase-Aktivität zur NF- κ B Aktivierung ist unklar. Aufgrund der zentralen Rolle von Malt1 in der Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B sollte sowohl die Funktion der unterschiedlichen Malt1 Isoformen als auch deren Paracaspase-Aktivität genauer untersucht werden.

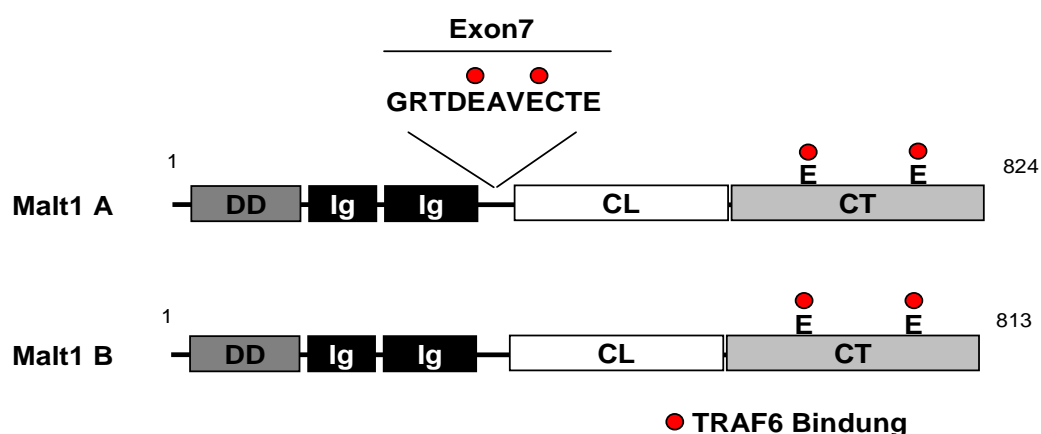


Abbildung 3.12 Schematische Darstellung von Malt1 A und B. DD: *Death* Domäne, Ig: Immunglobulin-ähnlich, Domäne, CL: *Caspase like* Domäne, CT: C-Terminus

3.2.1 Malt1 Isoformen und deren Paracaspase-Aktivität in der CBM Komplex Ausbildung

Die Ubiquitinierung von Malt1, die durch die Stimulus-abhängige Bindung von TRAF6 an Malt1 induziert wird, führt zur Bindung von IKK γ und somit zur Rekrutierung des gesamten IKK Komplexes [150]. Unterschiede in der Ausbildung des CBM Komplexes oder der Malt1/TRAF6 Interaktion können daher die Signaltransduktion über den CBM Komplex stark beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Bindung von Malt1 A und Malt1 B an den CBM Komplex und TRAF6 untersucht. Jurkat T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A oder B, beziehungsweise mit deren katalytisch inaktiven Mutanten FlagMalt1 A C464A oder FlagMalt1 B C453A transfiziert und auf TRAF6 Bindung und CBM Komplex Ausbildung untersucht (Abbildung 3.13).

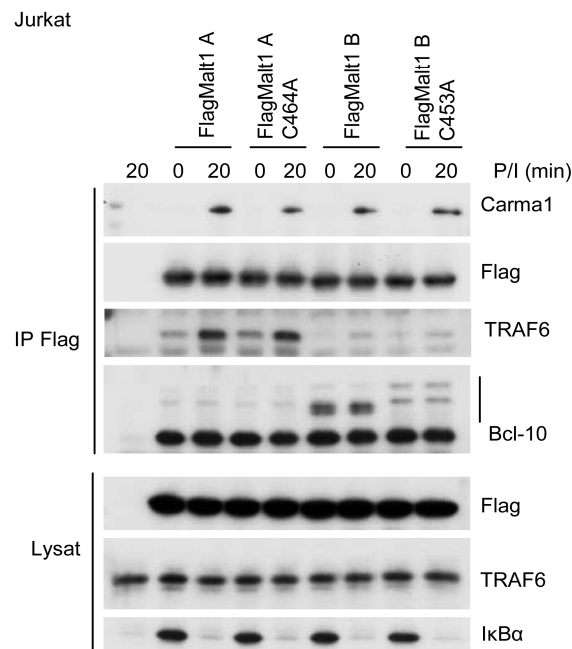


Abbildung 3.13 Malt1 A interagiert verstärkt mit TRAF6, Malt1 B führt zu einer vermehrten Bcl10 Modifikation. Jurkat T-Zellen wurden mit Leervektor oder mit FlagMalt1 A, FlagMalt1 A C464A, FlagMalt1 B oder FlagMalt1 B C453A transfiziert und die Zellen wie angegeben stimuliert und in CoIP Puffer lysiert. Die CBM Komplex Formation und TRAF6 Interaktion wurden mittels Flag IP und Western Blot untersucht. Bcl10-Strich: Modifikation

Die Stimulation der transfizierten T-Zellen mit P/I und anschließender Flag IP führte in allen Fällen zu einer Stimulus-abhängigen und vergleichbaren Interaktion von Carma1 mit Malt1 Isoformen sowie deren Mutanten. Auch die konstitutive Assoziation zwischen Malt1 und Bcl10 war in allen Fällen unverändert. Allerdings wies Malt1 A und auch deren Cystein Mutante im Vergleich zu Malt1 B eine verstärkte Interaktion zu TRAF6 auf, die durch P/I

Stimulation noch deutlich verstärkt wurde (Abbildung 3.13). Im Gegensatz dazu zeigten Malt1 B-transfizierte Zellen im Western Blot sehr starke Bcl10 Modifikation, die auch in der Flag IP zu sehen war. Auch in Malt1 B C453A-transfizierten Zellen war die Bcl10 Modifikation in leicht veränderter Form detektierbar. Bei der Bcl10 Modifikation handelt es sich wahrscheinlich um phosphoryliertes Bcl10 (vergleiche [138]). Allerdings trat die Phosphorylierung von Bcl10 nicht Stimulus-abhängig auf, sondern wurde durch Überexpression von Malt1 B induziert.

Die durch die Isoformen und Paracaspasemutanten ausgelösten Unterschiede in TRAF6 Assoziation und Bcl10 Modifikation können zu Änderung in der NF- κ B Aktivierung und zu veränderter Expression von NF- κ B Zielgenen führen und damit möglicherweise die Aktivierung der T-Zelle regulieren.

3.2.2 Malt Isoformen aktivieren NF- κ B unterschiedlich stark

Zur Untersuchung von unterschiedlichen Malt1 Formen oder Mutanten können Malt1-defiziente T-Zellen für Rekonstitutionsexperimente genutzt werden (Abbildung 3.14). Malt1-defiziente Zellen haben Defekte in der NF- κ B Aktivierung und IL-2 Produktion [101, 103]. Deshalb kann nach Rekonstitution der T-Zellen mit Malt1 Isoformen oder Mutanten die

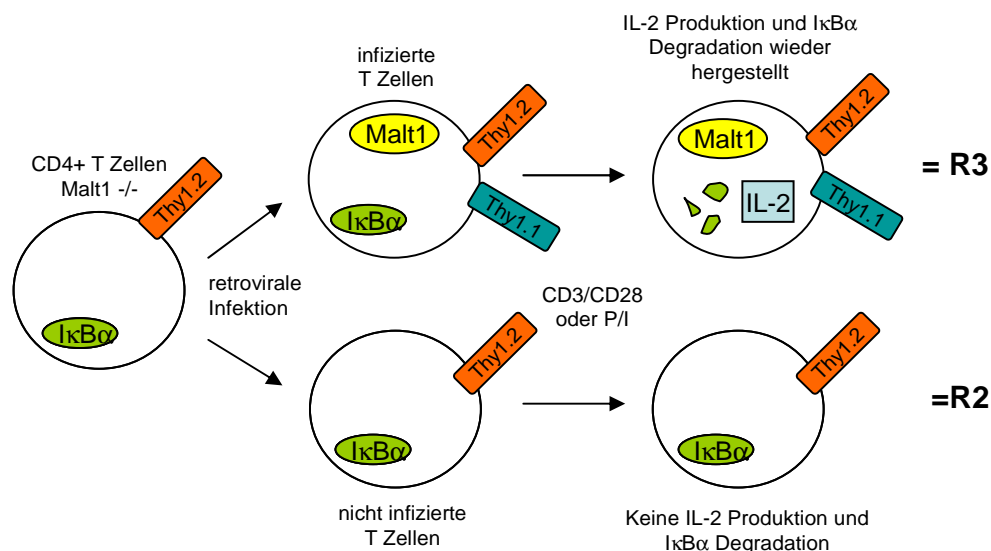


Abbildung 3.14 Retrovirale Infektion von Malt1 -/- CD4+ T-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Infektion von Malt1-defizienten CD4+ T-Zellen. Simultane Expression von Malt1 und Thy1.1 ermöglicht die Unterscheidung von infizierten und nichtinfizierten Zellen. Stimulation der rekonstituierten Zellen führt, im Gegensatz zu nichtinfizierten Malt1 -/- T-Zellen, zur Degradation von IκBα und zur Produktion von IL-2.

Aktivierung der T-Zelle durch das Ausmaß der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Degradation und IL-2 Produktion untersucht und Unterschiede herausgestellt werden (siehe Schema Abbildung 3.14).

Infizierte Zellen können durch Expression von Thy1.1 und Färbung mit einem APC (Allophycocyanin)-gekoppelten Thy1.1-spezifischen Antikörper in FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) Analysen identifiziert werden (Abbildung 3.15A). Lebende T-Zellen (R1), die die Ausgangspopulation für weitere Analysen darstellten, wurden mittels FSC (*forward scatter*) und SSC (*side scatter*) detektiert (Abbildung 3.15A). Ausgehend von der Zellpopulation R1 wurden die T-Zellen in Thy1.1-negative (R2) und Thy1.1-positive und damit infizierte Zellen (R3) unterteilt (Abbildung 3.15A). Die Zellpopulation R3 wurde so gewählt, dass sie nur effizient infizierte Zellen beinhaltet.

Die Expression der Malt1 Isoformen wurde mittels eines FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-gekoppelten Flag Antikörpers und simultaner APC-Thy1.1 Färbung untersucht und in einem Histogramm dargestellt (Abbildung 3.15B). Malt1 A und B wurden in Thy1.1-positiven Zellen gleichstark exprimiert. Damit sind Effekte aufgrund von unterschiedlicher Proteinmengen der Isoformen ausgeschlossen.

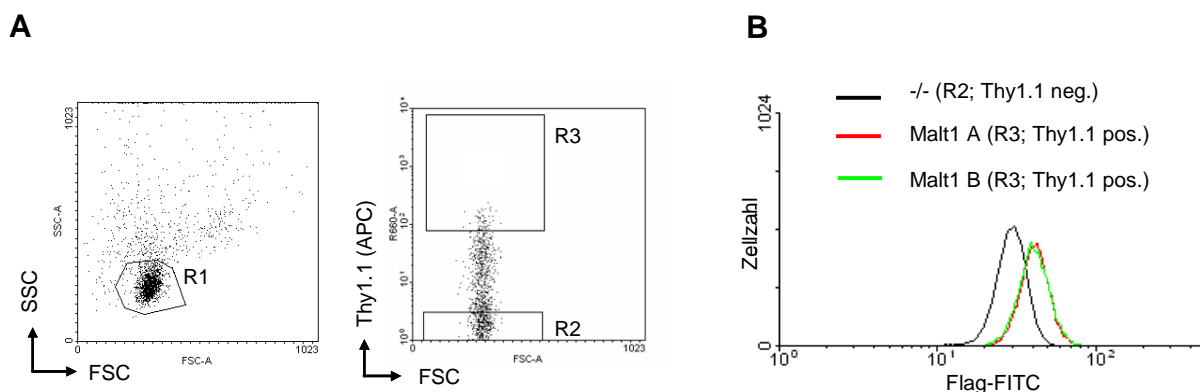


Abbildung 3.15 Malt1 A und B werden gleich stark exprimiert. (A) Malt1-defiziente T-Zellen wurden mittels der retroviralen Konstrukte FlagMalt1 A-IRES-Thy1.1 oder FlagMalt1 B-IRES-Thy1.1 infiziert. Lebende Zellen (R1) wurden auf Thy1.1-positive (R3) und Thy1.1-negative (R2) Zellen untersucht. (B) Die gleichmäßige Expression von FlagMalt1 A und FlagMalt1 B konnte mittels Flag-FITC Färbung und FACS analysiert werden. FlagMalt1 A und B zeigten die gleiche Kurvenverschiebung im Vergleich zu Thy1.1 negativen Zellen.

Zur Untersuchung der Malt1-infizierten T-Zellen war die FACS Analyse die geeignete Methode, da dadurch einzelne Zellen untersucht werden konnten. Ein Marker für die Signaltransduktion vom TCR über den CBM Komplex zu $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ist die Stimulus-abhängige Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, welche sich durch einen anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Antikörper in einer FACS Einzelzellanalyse von Thy1.1-positiven und Thy1.1-negativen T-Zellen nachweisen lässt. Die Stärke der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Degradation ist ein Maß für die Aktivität des Signalwegs. Die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$

Degradation wurde durch die Zunahme der Zellen mit verringerten I κ B α Mengen nach Stimulation bestimmt (Schema Abbildung 3.14 und Abbildung 3.16). Auch durch die Untersuchung von IL-2 als NF- κ B Zielgen kann man Rückschlüsse auf die Aktivität von NF- κ B ziehen. Gemessen wurde hier die Zunahme der Zellen mit intrazellulärem IL-2 nach Stimulation durch einen FITC gekoppelten IL-2 Antikörper (Schema Abbildung 3.14 und Abbildung 3.16). Zum Test des experimentellen Systems wurde vor der eigentlichen Analyse der Malt1 $-/-$ T-Zellen infizierte Wildtyp (wt) T-Zellen untersucht. CD4 $^+$ wt T-Zellen wurden mit Malt1 A-infiziert. Sowohl Thy1.1-positive als auch Thy1.1-negative Zellen zeigten eine starke P/I-abhängige Abnahme von I κ B α (Abbildung 3.16A). Für die Messung von intrazellulärem IL-2 war es nötig, den Export von IL-2 mit BrefeldinA - einem Inhibitor für den anterograden Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat - zu inhibieren. Die IL-2 Produktion nach vier Stunden CD3/CD28 Stimulation wurde durch einen FITC-gekoppelten IL-2 Antikörper und durch simultane Thy1.1-APC Färbung detektiert. Die Anzahl der IL-2-produzierenden Zellen nahm in Thy1.1-positiven und Thy1.1-negativen Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen um etwa 30 % zu (Abbildung 3.16B).

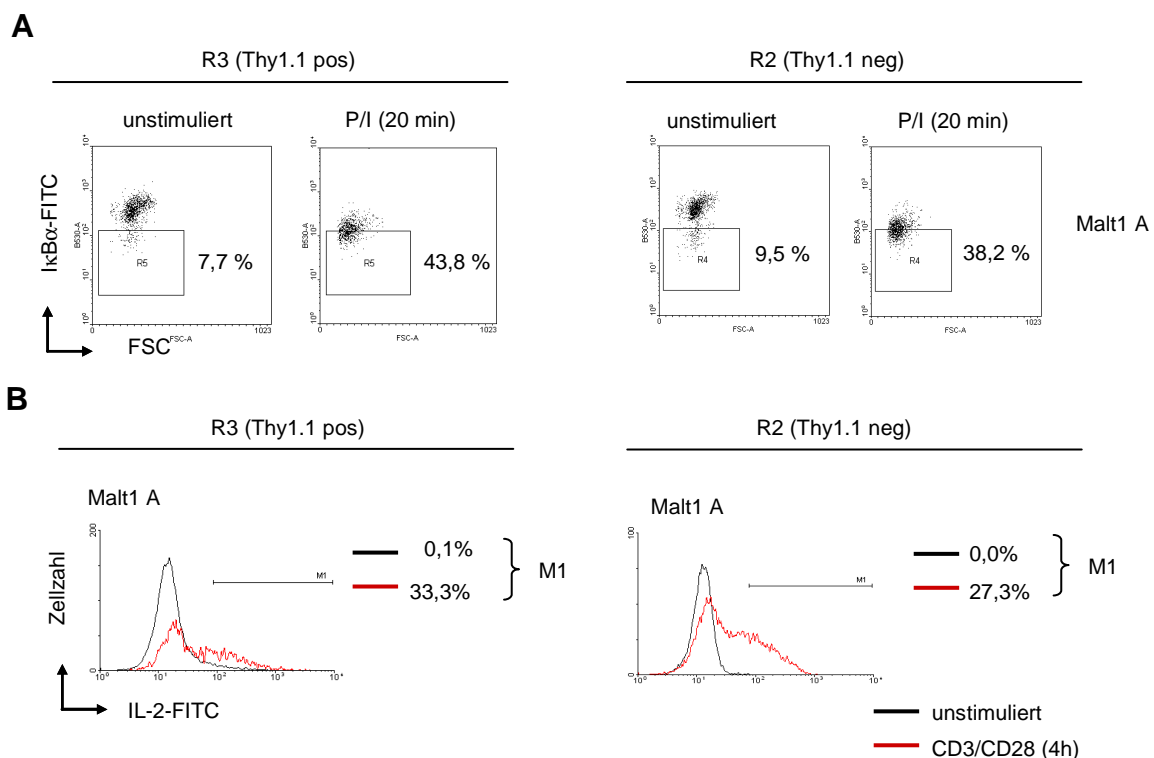


Abbildung 3.16 Kontrollexperiment in CD4 $^+$ wt T-Zellen für I κ B α Degradation und IL-2 Produktion. CD4 $^+$ T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A-IRES-Thy1.1 retroviral infiziert und wie angegeben stimuliert. Aktivierung der Zellen wurde durch FITC-I κ B α Färbung (**A**) und FITC-IL-2 Färbung (**B**) in FACS Analysen untersucht. Thy1.1-positive und -negative Zellen wurde durch Thy1.1-APC Färbung unterschieden. Malt1 wt CD4 $^+$ T Zellen zeigten sowohl in Thy1.1 positiven, als auch in Thy1.1 negativen T-Zellen Stimulus-abhängige I κ B α Degradation und IL-2 Produktion.

Somit konnte mit diesem Test gezeigt werden, dass sowohl Thy1.1-positive als auch Thy1.1-negative T-Zellen stimuliert werden können und ähnlich starke I κ B α Degradation und IL-2 Produktion aufweisen. Diese Methode wurde in darauf folgenden Experimenten zur Untersuchung von Thy1.1-negativen im Vergleich zu Thy1.1-positiven rekonstituierten Malt1-defizienten T-Zellen verwendet.

Malt1 A- oder B-infizierte Malt1-defiziente T-Zellen wurden für 20 Minuten mit P/I stimuliert und die I κ B α Degradation wie zuvor beschrieben untersucht. Expression von FlagMalt1 A in Thy1.1-positiven Zellen (R3) führte zu einer starken Abnahme von I κ B α (53,4 %) nach Stimulation (Abbildung 3.17). Hingegen war die P/I-induzierte I κ B α Degradation in Malt1 B-rekonstituierten T-Zellen deutlich geringer (24 %). Thy1.1-negative Zellen (R2) wiesen im Gegensatz zu wt CD4⁺ T-Zellen wie erwartet keine stimulus-abhängige Degradation von I κ B α auf.

Die stärkere Degradation von I κ B α in Malt1 A-transfizierten Zellen müsste sich auch in der Aktivierung von NF- κ B widerspiegeln. Eine sehr sensitive Methode zur Detektion von freiem NF- κ B ist der EMSA (*electro-mobility-shift assay*). Malt1 ^{-/-} T-Zellen wurden

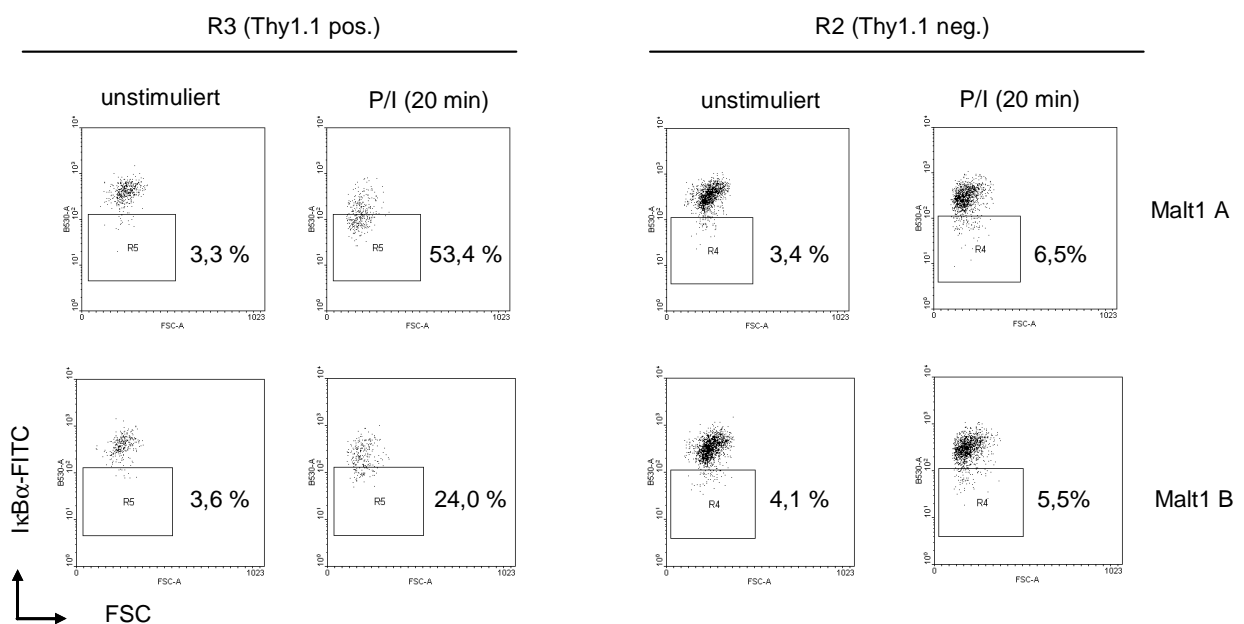


Abbildung 3.17 Malt1 Isoformen führen zu Unterschieden in der I κ B α Degradation. Malt1-defiziente CD4⁺ T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A- oder FlagMalt1 B-IRES-Thy1.1 retroviral infiziert und wie angegeben stimuliert. I κ B α Degradation in Thy1.1-positiven und -negativen Zellen wurde durch I κ B α -FITC Färbung und Thy1.1-APC Kofärbung in FACS Analysen untersucht. Die I κ B α Degradation war in mit Malt1 B-rekonstituierten Zellen deutlich geringer als in Malt1 A-rekonstituierten Zellen.

retroviral mit Leervektor, FlagMalt1 A oder B infiziert. Die Proteinmenge von FlagMalt1 A und B in den Gesamtzelllysaten war im Vergleich zu endogenem Malt1 in wt Zellen sehr gering (Abbildung 3.18A), da nur ein Teil der Zellen, wie auch schon in den FACS Analysen gesehen (Abbildung 3.15A), effizient infiziert waren. Als Kontrollexperiment für die Detektion von freiem NF- κ B mittels EMSA wurden wt T-Zellen für 10 bis 30 Minuten mit P/I stimuliert. Starke NF- κ B Bindung an ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit NF- κ B Bindungsstelle war bereits nach 10 Minuten Stimulation zu sehen (Abbildung 3.18B). In Malt1-defizienten T-Zellen infiziert mit Malt1 A oder B war aufgrund der geringen Malt1 Menge in den Gesamtzelllysaten nur eine schwache NF- κ B DNA Bindeaktivität sichtbar (Abbildung 3.18C). In Leervektor-infizierten Zellen war hingegen keine NF- κ B DNA Bindeaktivität detektierbar. FlagMalt1 A-infizierte Zellen zeigten im Gegensatz zu FlagMalt1 B-infizierten Zellen schon nach 10 Minuten P/I Stimulation NF- κ B DNA Bindung, die nach längerer Stimulation weiter zunahm (Abbildung 3.18C). In Malt1 B-infizierten Malt1-defizienten CD4⁺ T-Zellen war erst nach 60 Minuten eine schwache NF- κ B DNA Bindung zu sehen, die im Vergleich zur Leervektorkontrolle nur minimal erhöht war. Trotz des hohen

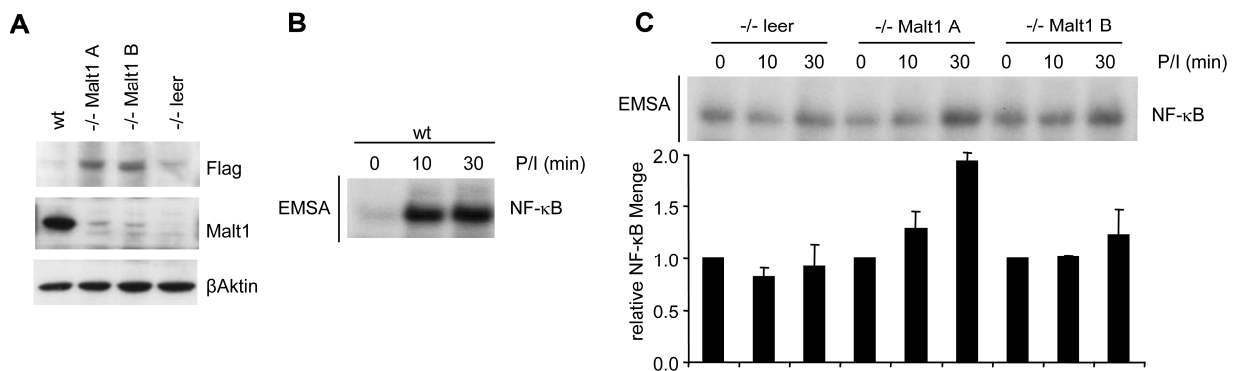


Abbildung 3.18 Malt1 Isoformen aktivieren NF- κ B unterschiedlich stark. (A) Die Expression der Malt1 Isoformen ist vergleichbar. Murine wt oder Malt1-defiziente CD4⁺ T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A-, FlagMalt1 B -IRES-Thy1.1 oder Leervektor wie angegeben retroviral infiziert oder uninferiert gelassen. Die Zellen wurden lysiert und mittels Western Blot analysiert. (B) Kontrollexperiment für NF- κ B Aktivierung. Murine CD4⁺ wt T-Zellen wurden wie angegeben stimuliert, in Bäuerlepuffer lysiert und die NF- κ B DNA Bindeaktivität in einem EMSA untersucht. (C) Malt1 A führt zu einer verstärkten NF- κ B DNA Bindeaktivität im Vergleich zu Malt1 B. Malt1-defiziente CD4⁺ T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A-, FlagMalt1 B-IRES-Thy1.1 oder Leervektor retroviral infiziert und wie angegeben stimuliert. NF- κ B wurde mittels EMSA untersucht. Relative NF- κ B Mengen wurden durch Densitometrie ermittelt. Das Diagramm zeigt die densitometrische Quantifizierung von zwei unabhängigen Experimenten.

Hintergrundes durch uninferierte Zellen konnte mit diesem Experiment bestätigt werden, dass die Expression von Malt1 A im Vergleich zu Malt1 B mehr NF- κ B Dimere nach T-Zell Aktivierung freisetzt.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die verstärkte DNA Bindeaktivität von NF- κ B in Malt1 A-rekonstituierten Malt1^{-/-} T-Zellen auch zu einer verstärkten Produktion von IL-2 führt. Mit FlagMalt1 A oder B retroviral infizierte Malt1^{-/-} T-Zellen wurden für vier Stunden mit CD3/CD28-spezifischen Antikörpern stimuliert oder unstimuliert gelassen. Während uninfizierte Zellen (R2) nach CD3/CD28 Stimulation so gut wie kein IL-2 bildeten, sah man in aktivierten infizierten T-Zellen eine Zunahme der IL-2-produzierenden Zellen um etwa 30 %. Es ergab sich aber kein Unterschied in der IL-2 Produktion zwischen den verschiedenen Malt1 Isoformen (Abbildung 3.19). So konnte zwar für Malt1 A eine verstärkte I κ B α Degradation und NF- κ B DNA Bindeaktivität nach T-Zell Aktivierung im Vergleich zu Malt1 B beobachtet werden, dieser Unterschied war aber auf Ebene von IL-2 als NF- κ B-induziertes Gen nicht sichtbar.

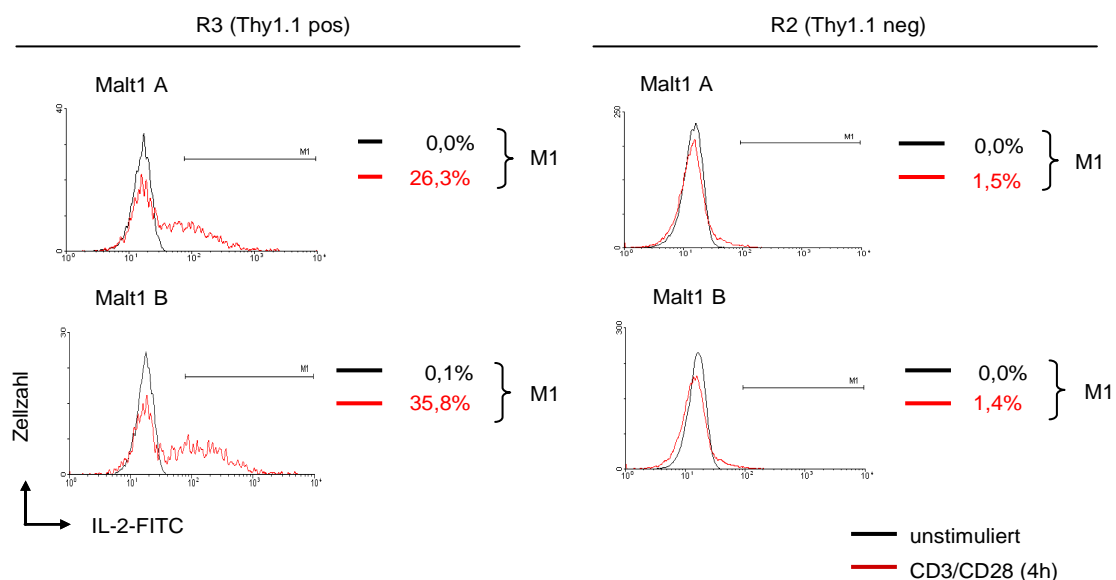


Abbildung 3.19 Malt1 Isoformen führen nicht zu Unterschieden in IL-2 Produktion. Malt1^{-/-} CD4⁺ T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A- oder FlagMalt1 B-IRES-Thy1.1 retroviral infiziert und wie angegeben stimuliert. Die Zellen wurden mit IL-2-FITC und Thy1.1-APC gefärbt und durch FACS analysiert. IL-2 Produktion von FlagMalt1 A- oder B-rekonstituierten Zellen war vergleichbar.

3.2.3 Die Funktion der Malt1 Paracaspase-Aktivität in T-Zellen

Die Paracaspase-Aktivität von Malt1 wird nach TCR Stimulation induziert und führt Stimulus-abhängig zur Spaltung von Bcl10 und A20 [147, 148]. Die Spaltung von A20 soll zur Inaktivierung des NF- κ B Inhibitors A20 beitragen und dadurch NF- κ B Aktivierung amplifizieren, wohingegen das Spalten von Bcl10 die T-Zell Adhäsion reguliert. Zur Untersuchung des Einflusses der Malt1 Paracaspase-Aktivität auf die initiale NF- κ B

Aktivierung nach TCR Stimulation wurde der Inhibitor Z-VRPR-FMK verwendet. Z-VRPR-FMK ist ein Zell-permeabler Peptidinhibitor, der das aktive Zentrum von Metacaspasen und der Malt1 Paracaspase *in vitro* und *in vivo* inhibiert [147, 162]. Jurkat T-Zellen wurden vor Stimulation mit Z-VRPR-FMK behandelt. Tatsächlich konnte die Entstehung von A20 Spaltprodukten wie A20p37 nach Aktivierung der Zellen mit P/I oder CD3/CD28 verfolgt

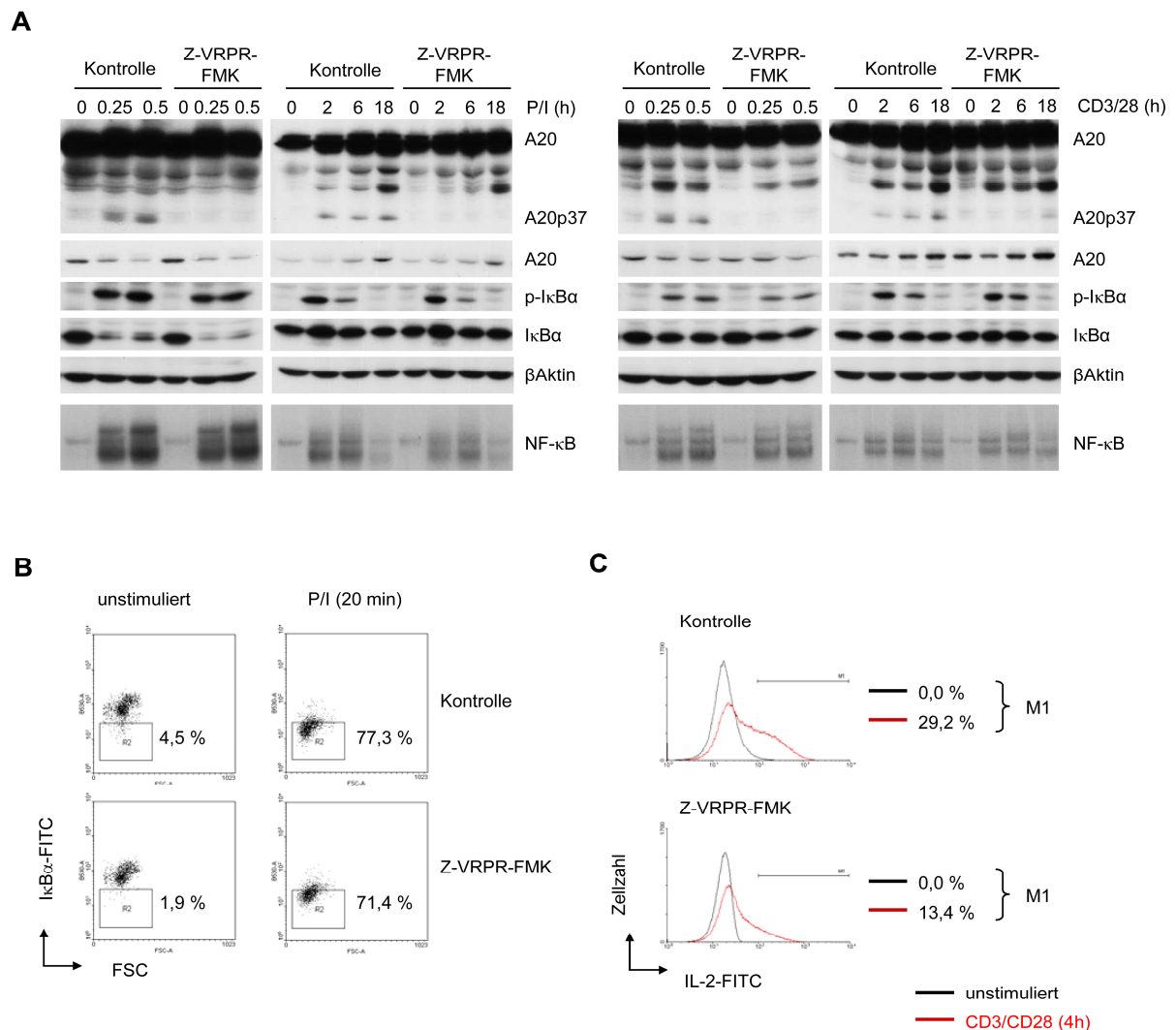


Abbildung 3.20 Inhibition der Malt1 Paracaspase hat keinen Einfluss auf die initiale NF-κB Aktivierung, führt aber zu einer Reduktion in der Stimulus-abhängigen IL-2 Produktion. (A) Phosphorylierung und Degradation von IκBα in Jurkat T-Zellen werden nicht durch Inhibition der Malt1 Paracaspase-Aktivität beeinflusst. Jurkat T-Zellen wurden für 30 Minuten mit Wasser (Kontrolle) oder mit 75 μM Malt1 Paracaspaseinhibitor Z-VRPR-FMK behandelt und dann wie angegeben stimuliert. Die T-Zellen wurden in Bäuerlepuffer lysiert und mittels Western Blot und EMSA analysiert. (B) und (C) Der Paracaspaseinhibitor Z-VRPR-FMK hat keinen Einfluss auf die P/I-induzierte IκBα Degradation (B), führt aber zu einer reduzierten CD3/CD28-abhängigen IL-2 Produktion (C) in murinen primären T-Zellen. Murine CD4⁺ T-Zellen wurden mit Wasser (Kontrolle) oder mit Z-VRPR-FMK 12 h vor und während der Stimulation mit P/I oder anti-CD3/CD28 Antikörpern behandelt. IκBα Degradation und IL-2 Produktion wurden durch intrazelluläre Proteinfärbung und FACS analysiert.

werden (Abbildung 3.20A und vergleiche [148]). In Gegenwart von Z-VRPR-FMK trat A20p37 in Kurzzeitstimulationen (0 bis 0,5 Stunden) nicht mehr auf (Abbildung 3.20A). Allerdings führte dies nicht zu einer veränderten Stimulus-induzierten A20 Degradation. In Langzeitstimulationen (0 bis 18 Stunden) inhibierte Z-VRPR-FMK ebenfalls die A20 Spaltung zu A20p37. Auch hier hatte der Inhibitor keinen Effekt auf A20 Level, da sowohl in der Kontrolle als auch in Inhibitor-behandelten Zellen eine Zunahme des A20 Proteinlevels nach CD3/CD28 oder P/I Stimulation zu sehen war.

Rebeaud et al [147] konnten zeigen, dass die Inhibition der Malt1 Paracaspase-Aktivität zur reduzierten Aktivierung eines NF- κ B Reportergens und verringerter IL-2 Produktion führt. Allerdings wurde nicht klar nachgewiesen, ob dies durch initiale Aktivierung von NF- κ B über den IKK Komplex beeinflusst wird. Sowohl in Kurzzeitstimulationen als auch in Langzeitstimulationen von Jurkat T-Zellen führte die Inhibition der Malt1 Paracaspase-Aktivität zu keiner Änderung in der CD3/CD28- oder P/I-induzierten Phosphorylierung und Degradation von I κ B α . Auch die durch T-Zell Aktivierung induzierte NF- κ B DNA Bindung war in Z-VRPR-FMK-behandelten Zellen und Kontrollzellen vergleichbar (Abbildung 3.20A).

Zur Bestätigung der durch Z-VRPR-FMK unbeeinflussten Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B wurden primäre murine CD4⁺ wt T-Zellen mit Z-VRPR-FMK behandelt. Die Degradation von I κ B α nach 20 Minuten P/I Stimulation und die IL-2 Produktion nach vier Stunden CD3/CD28 Stimulation wurde, wie in Abschnitt 3.2.2 erläutert, mittels FACS in Einzelzellanalysen untersucht. Die Stimulus-abhängige Degradation von I κ B α nach 20 Minuten Stimulation mit P/I war in Kontrollzellen und Inhibitor-behandelten Zellen vergleichbar, so dass auch in diesem System kein Effekt des Paracaspaseinhibitors auf die initiale NF- κ B Aktivierung zu beobachten war (Abbildung 3.20B). Allerdings war die durch CD3/CD28 Stimulation induzierte IL-2 Produktion in Z-VRPR-FMK-behandelten Zellen um über 50 % reduziert (Abbildung 3.20C). Somit sprechen die mittels Paracaspaseinhibitor in Jurkat T-Zellen und in primären murinen T-Zellen gewonnenen Ergebnisse gegen eine Beteiligung der Malt1 Paracaspase-Aktivität an der initialen NF- κ B Aktivierung. Allerdings wird die IL-2 Produktion durch Paracaspase-Aktivität reguliert, was auch schon von Rabeaud et al [147] beobachtet werden konnte.

Um genetische Evidenzen für die beobachteten Effekte zu bekommen, wurden Malt1-defiziente CD4⁺ T-Zellen wie zuvor beschrieben mit FlagMalt1 A oder der Paracaspase-

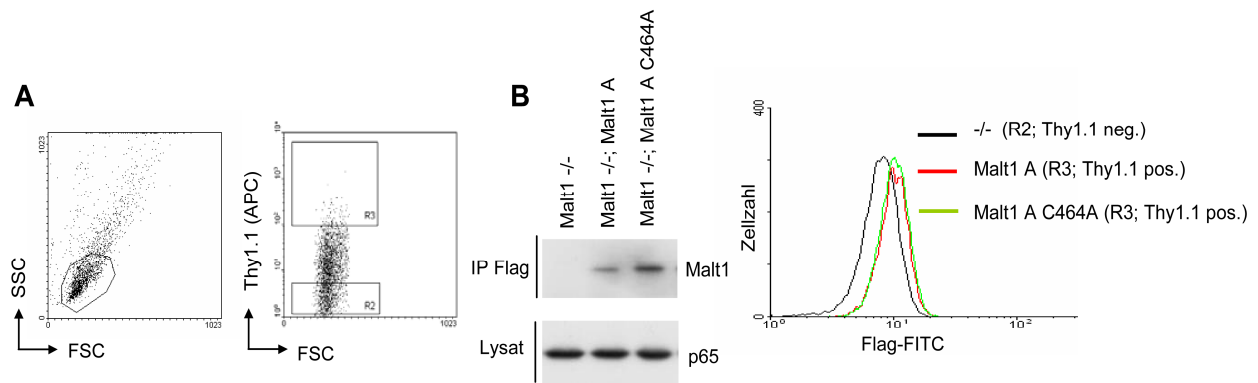


Abbildung 3.21 Malt1 A und C464A werden gleich stark exprimiert. (A) CD4⁺ Malt1^{-/-} T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A-IRES-Thy1.1, FlagMalt1 A C464A-IRES-Thy1.1 oder Leervektor retroviral infiziert. Infizierte Zellen aus der lebenden Population wurden durch Thy1.1-APC Färbung und FACS Analyse detektiert. (B) Expression von FlagMalt1 A und FlagMalt1 A C464A wurde mittels Flag IP und Western Blot sowie Flag-FITC Färbung und FACS analysiert.

inaktiven Malt1 A C464A Mutante [147, 148] durch retrovirale Infektion rekonstituiert (Abbildung 3.21). Die gleichmäßige Expression der Konstrukte in infizierten Zellen (R3) wurde durch Flag-FITC und Thy1.1-APC Färbung sowie nach Flag IP im Western Blot analysiert (Abbildung 3.21A und B). Rekonstituierte Malt1-defiziente T-Zellen wurden mit P/I oder CD3/CD28-spezifischen Antikörpern stimuliert und die I κ B α Degradation oder IL-2 Produktion in Thy1.1-positiven im Vergleich zu Thy1.1-negativen Zellen untersucht. In Übereinstimmung mit den Inhibitorstudien, war die initiale Degradation von I κ B α in Malt1 A und Malt1 A C464A-rekonstituierten T-Zellen vergleichbar (Abbildung 3.22A). Hingegen zeigte sich eine etwa 50 prozentige Reduktion der IL-2-produzierenden Zellen nach CD3/CD28 Stimulation in Malt1 A C464A-infizierten Zellen im Vergleich mit Malt1 A-infizierten T-Zellen (Abbildung 3.22B). Auch dieses Ergebnis spiegelt die mit dem Paracaspaseinhibitor gewonnenen Daten wieder (vergleiche Abbildung 3.20 und Abbildung 3.22).

Aufgrund der unterschiedlichen Aktivität der Malt1 Isoformen in der initialen Aktivierung von NF- κ B wurde IL-2 Produktion auch in Malt1 B-rekonstituierten Malt1^{-/-} CD4⁺ T-Zellen untersucht (Abbildung 3.23). Der Einfluss der Malt1 B Paracaspase-Aktivität auf die IL-2 Produktion wurde auch in diesem Experiment durch die Cysteinmutante Malt1 C453A getestet. Da Uren et al [136] durch Vergleich von Caspasen, Metacaspasen und Paracaspasen neben dem katalytisch wichtigem Cystein im aktiven Zentrum auch ein Histidin (H404 in Malt1 B) identifizieren konnten, wurde auch die Mutante Malt1 B H404A, sowie die

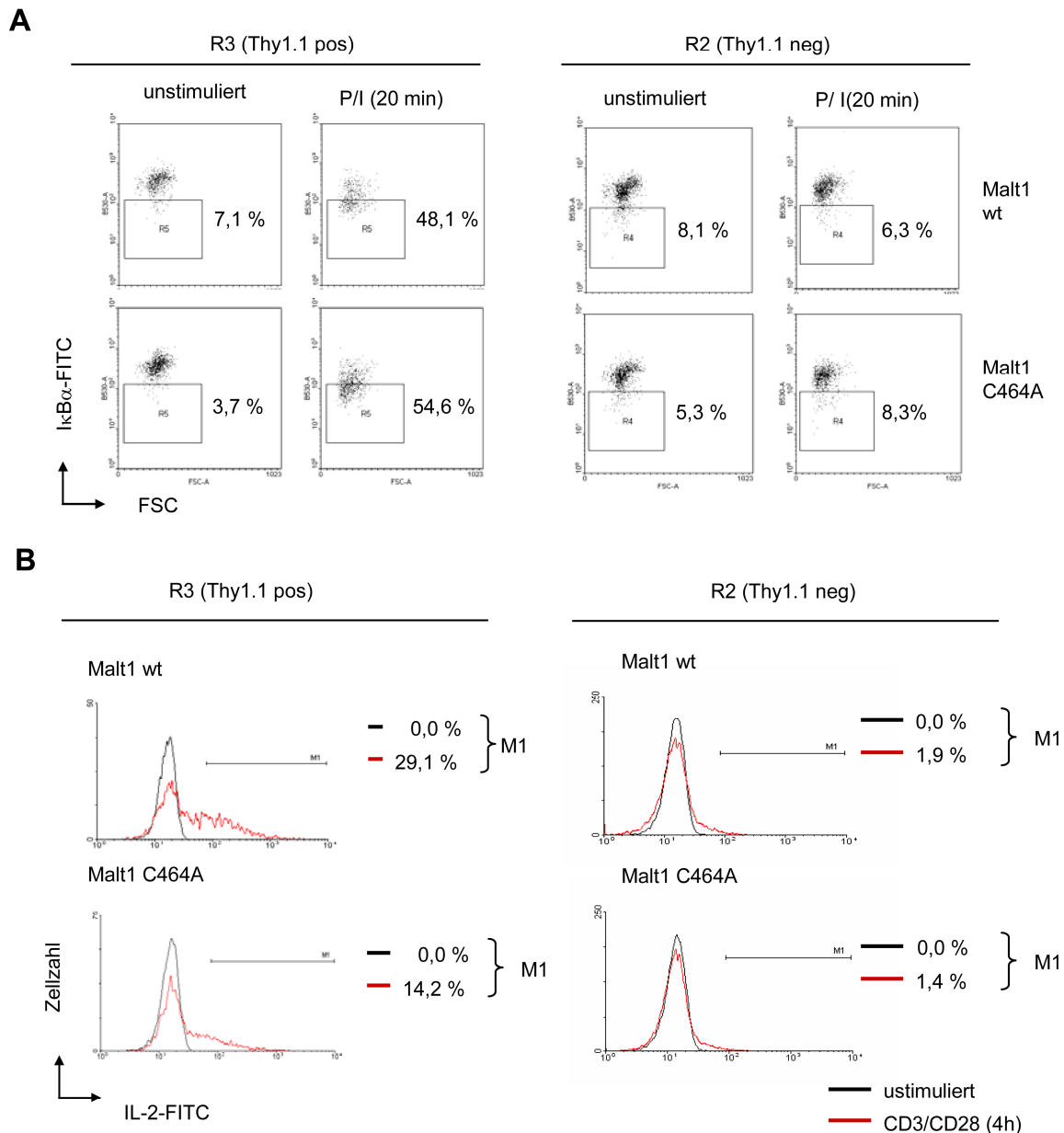


Abbildung 3.22 Die Malt1 Paracaspase Aktivität reguliert die IL-2 Produktion unabhängig von initialer IKK/NF- κ B Aktivierung. (A) Die Malt1 Paracaspase Aktivität hat keinen Einfluss auf P/I-induzierte I κ B α Degradation in CD4⁺ T-Zellen. Murine CD4⁺ T-Zellen wurden mit FlagMalt1 A- oder FlagMalt1 A C464A-IRES-Thy1.1 retroviral infiziert und wie angegeben stimuliert. I κ B α Degradation in Thy1.1-positiven und -negativen Zellen wurde durch I κ B α -FITC Färbung und Thy1.1-APC Kofärbung in FACS Analysen untersucht. (B) IL-2 Produktion in Malt1 A C464A-rekonstituierten T-Zellen ist im Vergleich zu Malt A wt-rekonstituierten Zellen deutlich geringer. Mit FlagMalt1 A oder FlagMalt1 A C464A-IRES-Thy1.1retroviral infiziert murine T-Zellen wurden wie angegeben stimuliert, mit IL-2-FITC und Thy1.1-APC gefärbt und durch FACS analysiert.

Doppelmutante Malt1 B H404A/C453A auf IL-2 Produktion untersucht. Auch hier führte die Inhibition der Malt1 B Paracaspase-Aktivität durch die unterschiedlichen Mutanten zu einer Reduktion der IL-2-produzierenden Zellen nach CD3/CD28 Kostimulation Allerdings war im

Fall der Malt1 B Paracaspasemutanten die Inhibition der IL-2 Produktion nicht so deutlich ausgeprägt wie im Fall von Malt1 A C464A (Abbildung 3.23).

Zusammenfassend sprechen sowohl die durch die Inhibitorexperimente als auch die durch genetische Analyse gewonnenen Daten gegen eine direkte Beteiligung der Malt1 Paracaspase-Aktivität an der initialen IKK/NF- κ B Aktivierung. Allerdings ist Malt1 Paracaspase-Aktivität wichtig für eine optimale IL-2 Produktion nach T-Zell Aktivierung.

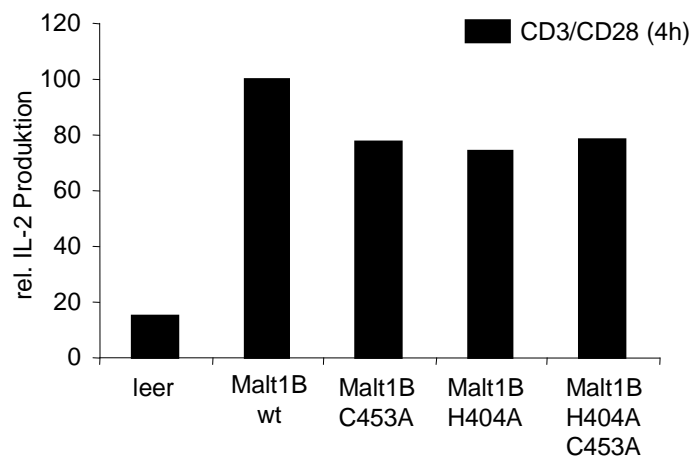


Abbildung 3.23 Paracaspase-inaktive Malt1 B Mutanten inhibieren die CD3/CD28 induzierte IL-2 Produktion. Mit FlagMalt1 B-, FlagMalt1 B C453A-, FlagMalt1 B H404A-, FlagMalt1 B H404A/C453A-IRES-Thy1.1 oder dem Leervektor retroviral infizierte Malt1 $-/-$ CD4 $+$ murine T-Zellen wurden wie angegeben stimuliert, mit IL-2-FITC und Thy1.1-APC gefärbt und durch FACS analysiert. Gezeigt ist ein Histogramm mit relativen IL-2 Mengen. Die Malt1 B (wt) IL-2 Menge wurde gleich 100 % gesetzt.

4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Signalintegration im Antigenrezeptorsignalweg zu NF- κ B in T-Zellen zu untersuchen. Für die Weiterleitung des TCR-proximalen Signals ist der Carma1-Bcl10-Malt1 (CBM) Komplex essentiell. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von Malt1 Interaktionspartnern, Aktivitäten und Isoformen.

4.1 Das COP9 Signalosom reguliert die Integrität des CBM Komplexes

Zur Identifikation neuer Malt1 Interaktionspartner wurde ein *Yeast-Two-Hybrid Screen* durchgeführt. Dabei wurde die CSN5 Untereinheit des COP9 Signalosoms (CSN) als neuer Bindungspartner von Malt1 identifiziert. Darüber hinaus konnte CSN/CBM Interaktion unter endogenen Bedingungen nachgewiesen werden. Durch die Interaktion des CSNs mit dem CBM Komplex wird die Bcl10 Ubiquitinierung reguliert, welche essentiell für die Degradation von Bcl10 und damit auch essentiell für die Auflösung des CBM Komplexes ist. Durch die Regulation der CBM Komplex Integrität beeinflusst das CSN die Aktivierung des IKK Komplexes, der die zentrale Schaltstelle in der NF- κ B Aktivierung ist.

4.1.1 Ein neues Modell für die Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B

Die Stimulation von T-Zellen über den Antigenrezeptor führt zur Phosphorylierung von Carma1 durch PKC θ , so dass Membran-assoziiertes Carma1 in eine offene Konformation übergeht und dadurch das Bcl10/Malt1 Modul rekrutieren kann [152, 217]. Im assemblierten CBM Komplex bindet TRAF6 an Malt1 und induziert Malt1 K63-Ubiquitinierung, welche die Rekrutierung des IKK Komplexes induziert [150]. Die Integrität des CBM Komplexes ist für die Signaltransduktion zum IKK Komplex entscheidend. Stimulus-abhängige Bcl10 Degradation, induziert durch Ubiquitinierung, ist ein negativer Regulator für Signaltransduktion über den CBM Komplex [139, 158, 218]. In dieser Arbeit wurde das COP9 Signalosom als neuer Interaktor des CBM Komplexes identifiziert. Die CSN/CBM Interaktion stabilisiert den CBM Komplex, da die durch TCR/CD28 Kostimulation induzierte Bcl10 Ubiquitinierung und Degradation verlangsamt wird (Abbildung 4.1). Ferner wird die CSN-regulierte Degradation von Bcl10 durch einen lysosomalen Prozess vermittelt. Somit steuert das CSN durch Regulation der lysosomalen Degradation von Bcl10 die Integrität des CBM Komplexes und auf diese Weise auch die Signaltransduktion vom TCR über den CBM Komplex. Das hier vorgestellte Modell wurde durch Experimente verifiziert, in denen das

CSN durch siRNA inaktiviert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des CSNs durch siRNA zur schnellen Bcl10 Ubiquitinierung und Degradation nach Stimulation führt. Durch den beschleunigten Verlust der CBM Integrität wird der IKK Komplex schlechter aktiviert, was sich inhibierend auf NF- κ B Aktivierung auswirken kann (Abbildung 4.1).

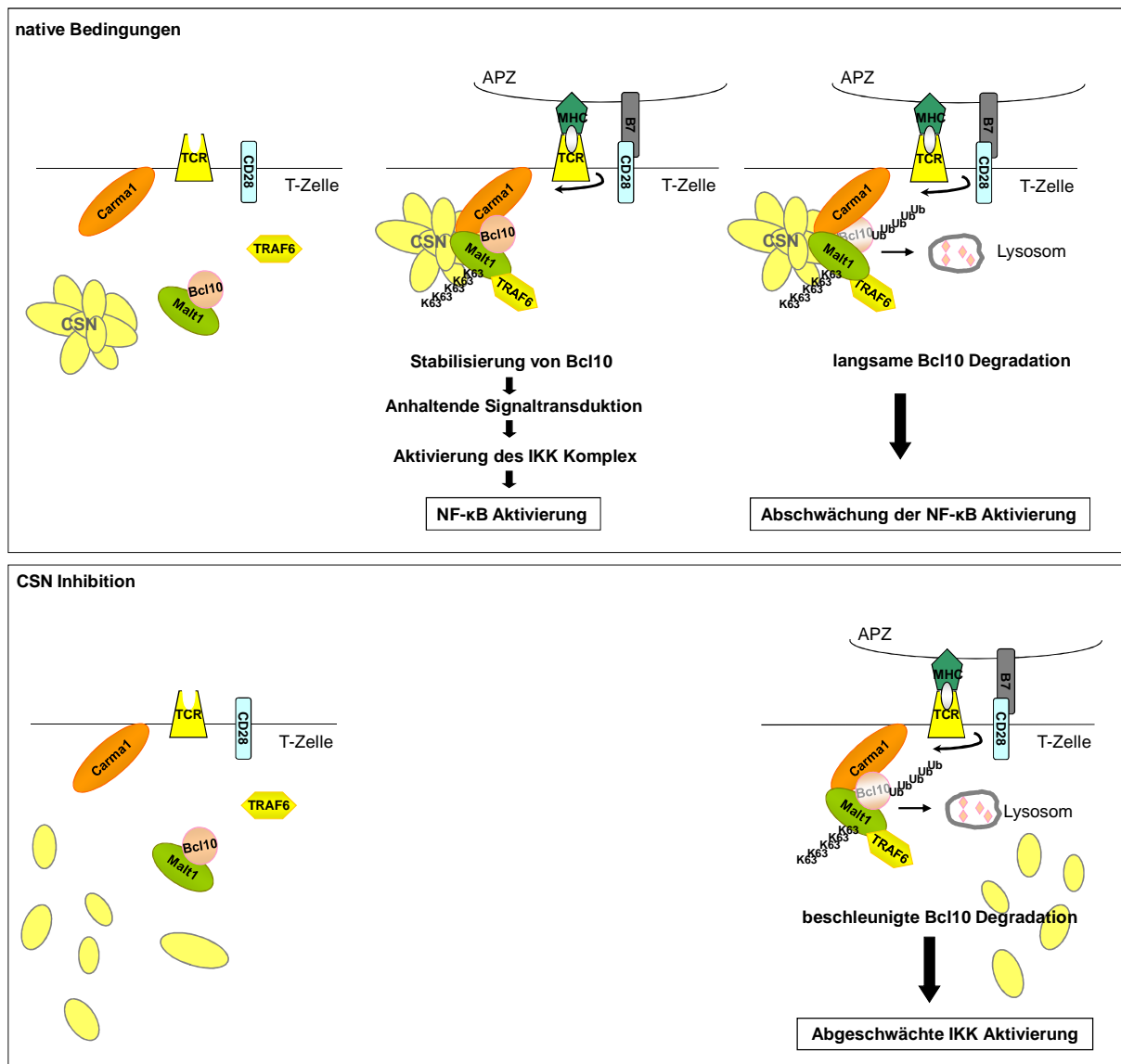


Abbildung 4.1 Das CSN reguliert die Integrität des CBM Komplexes. Schematische Darstellung der CBM/CSN Interaktion nach T-Zell Aktivierung unter natürlichen Bedingungen oder unter Inhibition des CSNs und die Auswirkung auf die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs. K63: K63-verknüpfte Ubiquitinierung, Ub: Ubiquitinierung.

4.1.2 Das CSN ist ein neuer CBM Interaktionspartner

Das CSN wurde kürzlich als ein Regulator von Entwicklung, Antigenantwort oder Anergie in T-Zellen identifiziert [208-210]. Jedoch ist bis jetzt wenig darüber bekannt, auf welche Weise

das CSN seine Funktion in T-Zellen ausübt. In dieser Arbeit konnte CSN5, eine Untereinheit des COP9 Signalosoms, als Interaktor von Malt1 und Carma1 identifiziert werden. Die Bindungsregion für CSN5 auf Malt1 ist ein ausgedehnter AS Bereich in der CL Domäne und dem CT von Malt1 (AS 352-684) (Abbildung 3.3). Zusätzlich zu den hier präsentierten Ergebnissen konnte von A. Eitelhuber in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass CSN5 mit der GUK Domäne von Carma1 interagiert [219]. Somit bindet CSN5 auch einen ausgedehnten Bereich auf Carma1. CSN5 kann mit einer großen Anzahl von Proteinen interagieren, wobei bis jetzt kein definiertes Bindungsmotiv identifiziert wurde. Aus diesem Grund wurde auch für andere CSN5 Interaktionspartner angenommen, dass eine bestimmte Tertiärproteinstruktur für die Bindung von CSN5 eine größere Rolle spielt als ein definiertes Aminosäuremotiv [220]. Möglicherweise kann die für die CSN Assoziation benötigte dreidimensionale Struktur auch oder zumindest zum Teil durch Proteinmodifikationen gebildet oder induziert werden.

In T-Zellen führte die Aktivierung des TCR Signalwegs zu NF- κ B zur Assoziation des CSNs mit Carma1 und ubiquitiniertem Malt1 (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5). Die Kinetik der CBM Komplex Assemblierung und Deassemblierung ist mit der Kinetik der CSN/Malt1 oder der CSN/Carma1 Interaktion vergleichbar (Abbildung 3.5). Dies ist ein Hinweis dafür, dass das CSN Carma1 und Malt1 nur im Kontext des assemblierten CBM Komplexes bindet. Darüber hinaus interagiert das CSN mit ubiquitiniertem Malt1, welches ebenfalls hauptsächlich im CBM Komplex lokalisiert ist (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5). Die Ubiquitinierung von Malt1 wird in aktivierten T-Zellen durch Bindung der Ubiquitinligase TRAF6 an Malt1 im Kontext des CBM Komplexes induziert [150]. Damit ist die Kopräzipitation von TRAF6 (Abbildung 3.5) mit dem CSN ein weiteres Indiz für die CSN/CBM Interaktion. Neben Malt1 und TRAF6 bindet auch Carma1 Stimulus-abhängig das CSN. Die CSN/Carma1 Interaktion konnte sowohl durch CSN1 IP als auch durch CSN5 IP detektiert werden (Abbildung 3.5). In HEK 293 Zellen interagierte CSN5 mit der GUK Domäne von Carma1 [219], so dass CSN5 die CSN/Carma1 Interaktion vermitteln kann (Abbildung 4.2). Weiterhin war in der Carma1 defizienten Jurkat T-Zelllinie JPM50.6 nach Aktivierung des TCR Signalwegs keine CSN/Malt1 Assoziation zu detektieren (Abbildung 3.5). Auf diese Weise wird die essentielle Bedeutung von Carma1 für die CSN/CBM Interaktion deutlich.

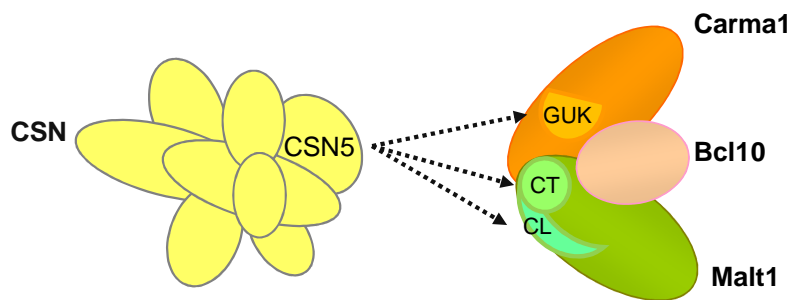


Abbildung 4.2 Mehrere Interaktionsflächen des CBM Komplexes sind für die CSN Interaktion bedeutend. Schematische Darstellung der CSN/CBM Interaktion. CSN5 interagiert mit der GUK (*guanylate kinase-like*) Domäne von Carma1 und Teilen der CL (*caspase-like*) Domäne und dem CT (C-Terminus) von Malt1.

Zu klären bleibt, ob die Modifikation von CBM Komponenten für die Rekrutierung des CSNs notwendig ist, ähnlich wie es im Fall der Malt1 Ubiquitinierung für den IKK Komplex beschrieben wurde [150], oder ob die Präsenz von Carma1 im CBM Komplex ausreicht, um die Interaktion von CSN und CBM Komplex zu vermitteln (Abbildung 4.2). Carma1 könnte der Initiator für die CSN/Malt1 Interaktion sein, so dass das CSN durch Carma1 an Malt1 binden kann. Andererseits könnte auch die Ubiquitinierung von Malt1 die CBM/CSN Interaktion unterstützen, da das CSN *in vitro* Ubiquitinketten direkt oder durch ein CSN-assoziiertes Protein binden kann [203]. Diese Ubiquitinbindung könnte die Bindung an ubiquitinierte Interaktionspartner begünstigen. Jedoch sprechen die in dieser Arbeit präsentierten Daten eindeutig dafür, dass vor allem die Präsenz aller CBM Komponenten in einem Komplex entscheidend für die CSN Interaktion ist. Im assemblierten CBM Modul scheinen mehr Interaktionsoberflächen für die CSN Bindung zur Verfügung zu stehen, als in inaktiven T-Zellen (Abbildung 4.2).

Das CSN kommt in Zellen als CSN Holoenzymkomplex mit acht Untereinheiten vor, aber auch Subkomplexe wurden beschrieben, die eine spezifische, vom Holoenzymkomplex unabhängige Funktion haben können [187, 221]. In T-Zellen interagiert der CBM Komplex mit dem CSN Holoenzymkomplex. Dies wurde durch Verwendung eines CSN1 Antikörpers, der das gesamte CSN präzipitiert, verifiziert (Abbildung 3.4 und [178]). Auch Gelfiltrationsexperimente mit aktivierten und unstimulierten Jurkat T-Zellen von M. Düwel in unserer Gruppe stützen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse [219]. So konnte gezeigt werden, dass der CSN Holoenzymkomplex mit dem CBM Komplex komigriert und mit ubiquitiniertem Malt1 im CBM Komplex interagiert. Die Assemblierung des CSN Holoenzymkomplexes mit dem CBM Komplex

erklärt auch, warum der CBM Komplex eine Größe von deutlich über 1000 kDa aufweist. Bis jetzt wurde die Größe vor allem durch Oligomerisierung von CBM Komponenten und durch die Ubiquitinierung von Malt1 begründet [150]. Die Bindung des 450 kDa großen CSNs an den CBM Komplex führt ebenfalls zu einer enormen Vergrößerung des CBM Komplexes in stimulierten T-Zellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der CSN Holokomplex durch T-Zell Aktivierung mit dem CBM Komplex interagiert. Die Akkumulation von CSN Bindungsstellen durch die CBM Komplex Assemblierung scheint ein entscheidendes Signal für die Interaktion der beiden Komplexe zu sein (siehe auch Modell Abbildung 4.2). Daneben können auch weitere Interaktionsoberflächen, wie etwa Ubiquitinierung oder Phosphorylierung eine Rolle für die CSN Interaktion spielen.

4.1.3 Das CSN reguliert Bcl10 Stabilität

Bcl10 ist ein essentieller Faktor für die Regulation der Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B, da die Deletion von Bcl10 in Mäusen zu einer Blockade der TCR-induzierten NF- κ B Aktivierung führt [102]. Weiterhin induziert die Stimulus-abhängige Degradation von Bcl10 eine Abschwächung der NF- κ B Aktivierung [158].

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass durch siRNA-vermittelte Inaktivierung des CSNs die Degradation von Bcl10 deutlich beschleunigt ist (Abbildung 3.10 und Schema Abbildung 4.1). Die Ubiquitinierung von Bcl10 ist dabei essentiell für den Degradationsprozess, da die Mutation zweier Lysinreste in der CARD Domäne von Bcl10 nicht nur die Bcl10 Ubiquitinierung, sondern auch die Bcl10 Degradation inhibiert [155]. In CSN-inaktivierten Zellen war die P/I-induzierte Ubiquitinierung beschleunigt (Abbildung 3.10), wodurch die deutlich schneller ablaufende Degradation von Bcl10 erklärt werden kann. Damit hemmt das CSN die Bcl10 Ubiquitinierung und wirkt somit der Degradation von Bcl10 entgegen. Unklar bleibt, wie das CSN diesen Mechanismus vermittelt.

Es sind verschiedene Szenarien für die Regulation der Bcl10 Ubiquitinierung durch das CSN möglich. Eine CSN-assoziierte DUB (Deubiquitinase) könnte der Bcl10 Ubiquitinierung entgegenwirken und dadurch Bcl10 stabilisieren. Schweitzer et al [204] konnten zeigen, dass nach TNF α Stimulation resynthetisiertes I κ B α durch die CSN-assoziierte DUB USP15 stabilisiert wird. Die siRNA-vermittelte Inaktivierung von USP15 in Jurkat T-Zellen hatte allerdings keinen Effekt auf Bcl10 Stabilität (Abbildung 3.11). Es ist dennoch möglich, dass andere CSN-assoziierte DUB Enzyme existieren, die die Ubiquitinierung von Bcl10

regulieren. Interessanterweise wurde erst kürzlich Brcc36, eine neue K63-spezifische Deubiquitinase, als CSN-assoziierte DUB identifiziert [222]. Brcc36 ist damit ein potentieller Kandidat, der die Deubiquitinierung von Bcl10 katalysieren könnte, und dadurch sicherlich interessant für weiterführende Studien.

Die Deubiquitinasen CYLD und A20 wurden schon als entscheidende Regulatoren von NF- κ B Signaltransduktionswegen identifiziert [38]. Allerdings konnten keine Belege dafür gefunden werden, dass CYLD und A20 die Bcl10 Deubiquitinierung induzieren, da eine Assoziation zwischen CSN und CYLD oder A20 nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Ferner führte die Inhibition von A20 durch siRNA zu keiner beschleunigten Degradation von Bcl10 (Daten nicht gezeigt). So müssen weitere Studien klären, ob eine Deubiquitinase für die Inhibition der Bcl10 Ubiquitinierung durch das CSN verantwortlich ist.

Alternativ könnte das CSN die Aktivität von E3 Ubiquitinligasen für Bcl10 steuern. Eine Reihe von Ubiquitinligasen wie cIAP2, Itch/Nedd4 und SCF β -TRCP (β -TRCP) wurden bis jetzt für die Bcl10 Ubiquitinierung vorgeschlagen [139, 158, 159]. Grundsätzlich gibt es für keine der Ubiquitinligasen eindeutige *in vivo* Daten für eine Bedeutung in der Bcl10 Ubiquitinierung nach TCR Stimulation. Eine bekannte Funktion des CSNs ist die Stabilisierung von CRL (Cullin-RING-Ubiquitinligasen) wie β -TRCP durch die Deneddylaseaktivität von CSN5 und durch die CSN-assoziierte Deubiquitinase USP15. Der Prozess der Neddylierung und Deneddylierung des Gerüstproteins Cullin verhindert die Autoubiquitinierung und damit die proteasomale Degradation von CRL, was zusätzlich durch die Deubiquitinaseaktivität von USP15 unterstützt wird [194, 203]. Die beschleunigte Ubiquitinierung von Bcl10 in Abwesenheit des CSNs spricht zumindest gegen eine Beteiligung von CRL an TCR-induzierter Bcl10 Ubiquitinierung, da CRL wie β -TRCP in Abwesenheit des CSNs instabil sind. Darüber hinaus ist bekannt, dass die CRL β -TRCP Proteine für proteasomale Degradation markiert [223]. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Bcl10 lysosomal degradiert wird (siehe übernächster Absatz). Dadurch ist ein β -TRCP-beinhaltenender Regulationsmechanismus für die Bcl10 Stabilität nicht wahrscheinlich. Ob das CSN die Aktivität anderer Bcl10 Ubiquitinligasen wie etwa der HECT Ubiquitinligasen Itch und Nedd4 oder der RING Ubiquitinligase cIAP2 beeinflusst, ist nicht klar.

Die Deneddylaseaktivität von CSN5 kann auch unabhängig von CRL eine Rolle für die Regulation von Bcl10 Stabilität spielen, da die Neddylierung und Deneddylierung von

anderen Proteinen oder von Bcl10 selbst die Bcl10 Stabilität beeinflussen könnte. Es wurde versucht, die Bedeutung der Deneddylaseaktivität für die Bcl10 Stabilität durch Rekonstitution von CSN5-inaktivierten Zellen mit der Deneddylase inaktiven CSN5 Mutante D151N zu untersuchen [190]. Allerdings war es nicht möglich Jurkat T-Zellen gleichzeitig mit CSN5 siRNA und einem CSN5 D151N-exprimierenden Plasmid zu transfizieren (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund bleibt die Bedeutung der CSN5 Deneddylaseaktivität für Bcl10 Stabilität ungeklärt.

Für den Mechanismus der Bcl10 Degradation werden sowohl die proteasomale Degradation als auch Proteasom-unabhängige Degradation diskutiert [139, 157, 158]. Im Fall einer proteasomalen Degradation von Bcl10 könnte die Ähnlichkeit des CSNs mit dem Deckel des 26S Proteasoms die Regulation der Bcl10 Stabilität beeinflussen. Es wird spekuliert, dass das CSN den Deckel des 19S Komplexes im 26S Proteasom ersetzen kann [224] und dadurch die proteolytische Aktivität des Proteasoms verlangsamt [225]. Das CSN könnte auf diese Weise die Degradation von Bcl10 nach Aktivierung der T-Zelle hinauszögern. Jedoch ist anzumerken, dass in dieser Arbeit kein Hinweis für eine proteasomale Degradation von Bcl10 gefunden werden konnte. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Bcl10 Degradation durch lysosomale Proteaseinhibitoren aber nicht durch proteasomale Inhibitoren inhibiert werden kann (Abbildung 3.9). Weiterhin wurde durch Bcl10 ProteinaseK Resistenz nach T-Zell Aktivierung ein Hinweis für Bcl10 in vesikulären Strukturen erbracht (Abbildung 3.9). Dies steht im Einklang mit der Kollokalisierung von Bcl10 nach T-Zell Aktivierung mit lysosomalen Strukturen [158]. Die gewonnenen Ergebnisse unterstützen klar die bisherige Hypothese, dass Bcl10 nicht proteasomal sondern lysosomal abgebaut wird und belegen deutlich die Translokation von Bcl10 in vesikuläre Strukturen nach Stimulation.

Bekannte Wege für lysosomale Degradation sind Autophagie und der MVBP (*multivesicular body pathway*). Für Autophagie ist bis jetzt mit Ausnahme der Chaperon-vermittelten Autophagie keine spezifische Degradation von einzelnen Proteinen bekannt [226, 227]. Die Chaperon-vermittelte Autophagie ist ein Mechanismus, der zur Degradation von zytosolischen Proteinen mit einer spezifischen Pentapeptidsequenz führt [227]. Allerdings ist in der Bcl10 Aminosäuresequenz diese Pentapeptidsequenz nicht zu finden und außerdem wurde die Induktion der Chaperon-vermittelten Autophagie bis jetzt hauptsächlich mit physiologischem Stress in Zusammenhang gebracht. Dadurch wäre mit den bekannten Mechanismen eine Autophagie-vermittelte Degradation von Bcl10 schwer zu erklären. Über den MVBP hingegen werden spezifisch Membranproteine wie Rezeptoren der lysosomalen

Degradation zugeführt [228]. Erst kürzlich konnte von zwei Gruppen gezeigt werden, dass TRAF2, ein wichtiger Adapter in vielen NF- κ B Signalwegen, lysosomal degradiert werden kann [229, 230]. Es wurde vermutet, dass dies über den MVBP geschieht. Unklar ist dennoch, wie einzelne Membran-assoziierte Proteine innerhalb eines Proteinkomplexes dem MVBP zugeführt werden können. Eine Möglichkeit dafür ist die Markierung der Proteine durch Ubiquitinierung. Für die Degradation von Membranproteinen wie Rezeptoren ist die Monoubiquitinierung oder K63-verknüpfte Ubiquitinierung ein Signal für die Degradation mittels MVBP [228]. Die Verknüpfung der Ubiquitinketten auf Bcl10 ist bis jetzt allerdings nicht genau definiert. Möglich ist aber, dass das CSN als Regulator von subzellulärer Lokalisation und Stabilität von Proteinen [176], dem MVBP Bcl10 reguliert zuführt.

Obwohl der genaue Mechanismus der Bcl10 Degradation zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt ist, so steht fest, dass das CSN als neuer CBM Interaktionspartner die CBM Komplex Integrität durch die Kontrolle der Bcl10 Degradation reguliert. Damit liefern die hier vorgestellten Ergebnisse klare Indizien für das Modell der CBM Komplex Regulation durch das CSN (Abbildung 4.1). Bcl10 ist somit das erste bekannte Protein, dessen lysosomaler Degradationsweg vom CSN reguliert wird.

4.1.4 CSN reguliert die T-Zell Rezeptor-induzierte IKK Aktivierung

Der IKK Komplex als zentrale Schaltstelle der NF- κ B Aktivierung ist ein guter Indikator für die Signaltransduktion über den CBM Komplex, da er in der Signaltransduktionskaskade direkt unterhalb des CBM Komplexes liegt. Die Inhibition des CSNs führte nicht nur zu einem beschleunigten Auflösen des CBM Komplexes, sondern auch zu einer starken Inhibition der IKK Kinaseaktivität (Abbildung 3.8). Dies steht im Einklang mit dem in dieser Arbeit aufgestellten Modell für die Regulation der Integrität des CBM Komplexes durch das CSN (Abbildung 4.1). Die Inhibition des CSNs induziert den Zusammenbruch des CBM Komplexes und damit eine beschleunigte Degradation von Bcl10. Da die Integrität des CBM Komplexes essentiell für die Aktivierung des IKK Komplexes ist [61], lässt sich auf diese Weise die reduzierte IKK Kinaseaktivität erklären. Die Signaltransduktion im MAPK Signalweg war hingegen nicht inhibiert (Abbildung 3.8), obwohl alle CBM Komplex Proteine an der Regulation von Signalkomponenten des MAPK Signalwegs beteiligt sind [231]. Somit scheint die Integrität des CBM Komplexes und die Bcl10 Degradation im MAPK Weg keine essentielle Bedeutung zu haben und lässt vermuten, dass für die MAPK Aktivierung eine

transiente Ausbildung des CBM Komplexes ausreicht. Daraus ergibt sich, dass das CSN spezifisch den IKK/NF- κ B Signalweg reguliert.

Auf Ebene der IKK Kinaseaktivität hatten CSN2 und CSN5 siRNAs unterschiedlich starke Effekte. Inhibition des CSNs durch CSN2 siRNAs führte zu einer stärkeren Reduktion der IKK Kinaseaktivität als durch CSN5 siRNA zu beobachten war (Abbildung 3.8). Allerdings waren wiederum bei Betrachtung der Bcl10 Degradation keine Unterschiede zwischen den CSN2 und CSN5 siRNAs sichtbar (Abbildung 3.10). Es ist daher möglich, dass das CSN neben der Regulation der Bcl10 Stabilität die Aktivierung des IKK Komplexes direkt beeinflusst und dass CSN5 für diesen Mechanismus eine geringere Bedeutung als CSN2 hat (siehe auch nächster Abschnitt). Der IKK Komplex wird über IKK γ an ubiquitiniertes Malt1 im CBM Komplex rekrutiert und auch das CSN bindet bevorzugt an Malt1 im Kontext des CBM Komplexes ([150] und Abbildung 3.4). Dadurch stehen das CSN und der IKK Komplex in räumlicher Nähe zueinander, so dass ein direkter Einfluss des CSNs auf den IKK Komplex nicht ausgeschlossen werden kann. Es ist möglich, dass eine CSN-assoziierte Kinase an der phosphorylierungsabhängigen Aktivierung des IKK Komplexes beteiligt sein könnte. Allerdings sprechen die Ergebnisse dafür, dass das CSN kein genereller IKK Regulator ist, da die TNF α -induzierte Kinaseaktivität durch die CSN siRNAs weitgehend unbeeinflusst war (Abbildung 3.8). Die Untersuchung anderer Zellsysteme und NF- κ B-induzierender Signale sollte Aufschluss darüber geben, ob der IKK Komplex direkt durch das CSN reguliert werden kann.

Das CSN scheint auf mehreren Ebenen der Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B zu agieren. Doch die Regulation der CBM Integrität durch das CSN ist ein entscheidender Mechanismus für die Weiterleitung des TCR-induzierten Signals zum IKK Komplex und damit auch eine wichtige Komponente in der IKK Komplex Aktivierung.

4.1.5 CSN Untereinheiten haben unterschiedliche Bedeutung in der T-Zell Aktivierung

Die konditionale Deletion von unterschiedlichen CSN Untereinheiten in T-Zellen induziert verschiedene Phänotypen. Die Deletion von CSN5 führt zu Defekten in verschiedenen Stadien der T-Zell Entwicklung und reduzierter NF- κ B Kerntranslokation [210]. Kongruent dazu sind die hier präsentierten Ergebnisse, da die siRNA-vermittelte Inaktivierung von CSN2 und CSN5 die Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B durch die Regulation der Bcl10

Stabilität beeinflusst (Abbildung 4.1). Im Gegensatz dazu inhibiert die konditionale CSN8 Deletion den Zellzyklus und lässt NF- κ B Aktivierung intakt [208]. In CSN8-defizienten T-Zellen war durch die Deletion von CSN8 auch die Expression von CSN3 stark reduziert. Expression von CSN2 oder CSN5 war hingegen vergleichbar mit Wildtypzellen [208]. Unterschiedliche CSN Untereinheiten vermitteln damit verschiedene Effekte. Allem Anschein nach üben aber CSN8 und CSN3 sich gegenseitig beeinflussende Funktionen aus, die jedoch unabhängig von CSN2 und CSN5 zu sein scheinen. Auf diese Weise könnten sich die unterschiedlichen Phänotypen von CSN8 Deletion und CSN5/CSN2 Deletion oder Inaktivierung in T-Zellen erklären lassen.

Es ist bekannt, dass die Deletion oder Inaktivierung von Untereinheiten die Integrität des CSN unterschiedlich stark beeinflussen können [183, 184, 204, 208]. In der hier präsentierten Arbeit führte die siRNA-vermittelte Inhibition von CSN2 neben einer Inaktivierung des CSN2 Proteinlevels auch zu einer abgeschwächten Expression des CSN5 Proteinlevels. Im Gegensatz dazu inhibierte die CSN5 siRNA nur das CSN5 Proteinlevel (Abbildung 3.7 und [215]). CSN3 und CSN8 Proteinlevel waren sowohl durch CSN2 als auch durch CSN5 siRNA nur minimal zu beeinflussen (Abbildung 3.7). Auf welche Weise die Untereinheiten gegenseitig ihre Expression regulieren ist unklar. Möglicherweise wird für bestimmte CSN Aktivitäten nicht der gesamte intakte CSN HoloKomplex benötigt, sondern bereits ein Teil des Komplexes reicht für bestimmte Funktionen aus. Die CSN2 und CSN5 siRNAs, die in dieser Arbeit verwendet wurden, scheinen die Funktion des CSNs qualitativ vergleichbar zu beeinflussen, es konnten allerdings quantitative Unterschiede in den Effektstärken beobachtet werden. Ein Beispiel dafür ist die stärkere Inhibition des IKK Komplexes durch CSN2 siRNAs als durch CSN5 siRNA (Abschnitt 4.1.4). Im Gegensatz dazu führte die Inaktivierung von CSN5 durch siRNA zu einer stärkeren Reduktion der IL-2 mRNA Induktion nach T-Zell Aktivierung als durch CSN2 siRNAs (Abbildung 3.7). Anscheinend vermittelt das CSN pleiotrope Effekte in der Signaltransduktion im TCR Signalweg. Auf diese Weise kann die IL-2 Produktion, die zu einem späteren Zeitpunkt nach T-Zell Aktivierung stattfindet als die IKK Aktivierung, durch weitere CSN-regulierte Prozesse beeinflusst sein, so dass sich die unterschiedlich starken Effekte der CSN2 und CSN5 siRNAs erklären lassen. Damit scheinen CSN5 und CSN2 ähnliche Prozesse zu regulieren, für die die jeweilige Untereinheit aber unterschiedlich starke Bedeutung haben kann.

4.1.6 Einfluss der CSN/CBM Interaktion auf andere Malt1/Bcl10-abhängige Signalwege

Malt1 und Bcl10 regulieren nicht nur die Antigenrezeptor-abhängige IKK/NF- κ B Aktivierung in T-Lymphozyten. Sie sind auch verantwortlich für die Signaltransduktion zu IKK von Fc-Rezeptoren oder GPCRs (*G-protein coupled receptors*) zusammen mit Proteinen der Carma Familie oder PRRs (*pattern recognition receptors*), wie zum Beispiel Dectin1 in Kooperation mit dem CARD-beinhaltenen Protein CARD9 [129, 130, 133, 134]. Auch in diesen Signalwegen ist die Regulation der CBM-ähnlichen Komplexe durch das CSN möglich. Durch die Ähnlichkeit des CBM Komplexes mit dem Carma3-Bcl10-Malt1 Komplex ist im GPCR Signalweg die Interaktion mit dem CSN wahrscheinlich, muss aber in zukünftigen Experimenten verifiziert werden. CARD9 im Dectin1 Signalweg hat im Gegensatz zu Carma Proteinen kein MAGUK Motiv. Für CSN/Carma1 Interaktion ist aber die GUK Domäne erforderlich (siehe Schema Abbildung 4.2). Ob die Präsenz des Malt1/Bcl10 Moduls im CARD9-regulierten CBM-ähnlichen Komplex ausreicht, um das CSN zu rekrutieren, oder ob CARD9/CSN Interaktion auf eine andere Weise vermitteln werden kann, ist unklar.

Die Identifikation weiterer Signalmediatoren für die Malt1/Bcl10-abhängige Signaltransduktion zu NF- κ B zeigt, dass ein Netzwerk von Proteinen und deren Modifikation dafür verantwortlich ist, dass Signale im richtigen Maß übermittelt werden. Das CSN als CBM Komplex Regulator und möglicherweise auch als Regulator von CBM-ähnlichen Komplexen ist einer von vielen positiven und negativen Regulatoren der NF- κ B Aktivierung und nur die Summe aller Regulationsmechanismen führt zu einer einwandfreien Induktion und Beendigung der NF- κ B Signaltransduktion.

4.2 Malt1 Isoformen und ihre Paracaspase-Aktivität in der Aktivierung von T-Zellen

Das Malt1 Gen wird in zwei Splicevarianten exprimiert, so dass zwei Isoformen gebildet werden. Es ist nicht bekannt, ob die beiden Isoformen sich in ihrer Fähigkeit zur NF- κ B Aktivierung unterscheiden. Darüber hinaus konnte kürzlich für Malt1 proteolytische Aktivität identifiziert werden. Auch die Bedeutung der Malt1 Paracaspase-Aktivität in der Aktivierung von NF- κ B ist nicht geklärt. Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Malt1 Isoformen und die

Malt1 Paracaspase-Aktivität auf genetischer Ebene zu untersuchen und damit die Bedeutung für die NF- κ B Aktivierung herauszustellen.

4.2.1 Malt1 Isoformen haben unterschiedliches Potential zur NF- κ B Aktivierung

In unterschiedlichen Spezies wie Mensch, Maus oder Schimpanse werden zwei Malt1 Splicevarianten exprimiert. Diese Isoformen unterscheiden sich durch das Exon7, welches elf Aminosäuren kodiert und zwischen der Ig und CL Domäne liegt. Exon7 ist nur in Malt1 A zu finden, fehlt aber in Malt1 B. Die Auswirkung des Exon7 auf die Funktionalität der beiden Malt1 Isoformen in der Signaltransduktion zu NF- κ B war bisher nicht untersucht. In einem cIAP2/Malt1 A Fusionsprotein, das in einigen MALT Lymphomen auftritt, konnte gezeigt werden, dass Malt1 A neben den C-terminalen TRAF6 Bindungsstellen noch zwei zusätzliche potentielle TRAF6 Bindungsstellen im Exon7 trägt [151]. TRAF6 Bindung an Malt1 spielt eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B [149, 150]. Allerdings gibt es keine funktionellen Daten, ob die zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen in Malt1 A die Aktivität von Malt1 beeinflusst. Ziel dieser Studie war es die Bedeutung der Isoformen in der Aktivierung von T-Zellen zu untersuchen. Tatsächlich ergaben sich Unterschiede von Malt1 A und B in der initialen NF- κ B Aktivierung.

Durch Einzelzellanalysen von Malt1 A- oder B-rekonstituierten Malt1-defizienten T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die I κ B α Degradation durch Malt1 A Rekonstitution deutlich stärker induziert wird als durch Malt1 B (Abbildung 3.17). Die Stärke der Degradation von I κ B α im NF- κ B Signalweg ist ein Maß für die Aktivität des Signalwegs. Durch verstärkte I κ B α Degradation werden mehr NF- κ B Dimere freigesetzt (Abbildung 4.3). Dies spiegelte sich in einer gesteigerten und früheren NF- κ B DNA Bindeaktivität in Malt1 A-rekonstituierten T-Zellen im Vergleich zu Malt1 B-rekonstituierten T-Zellen wieder (Abbildung 3.18 und Schema Abbildung 4.3). Dieses Ergebnis stimmt mit der Studie von Noels et al [151] überein, in der die Überexpression von cIAP2/Malt1 A durch die zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen zwischen der Ig und CL Domäne untersucht wurde. Durch die Präsenz der zusätzlichen Bindungsstellen war die Aktivierung eines NF- κ B Reporters in HEK293 Zellen deutlich erhöht. Damit kann die verstärkte Aktivierung des initialen NF- κ B Signalwegs durch Malt1 A mit den zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen erklärt werden (Schema Abbildung 4.3). Bisher war unklar, ob sich die TRAF6 Bindung durch die beiden Malt1 Isoformen unterscheidet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Malt1 A deutlich stärker als Malt1 B an TRAF6 bindet (Abbildung 3.13).

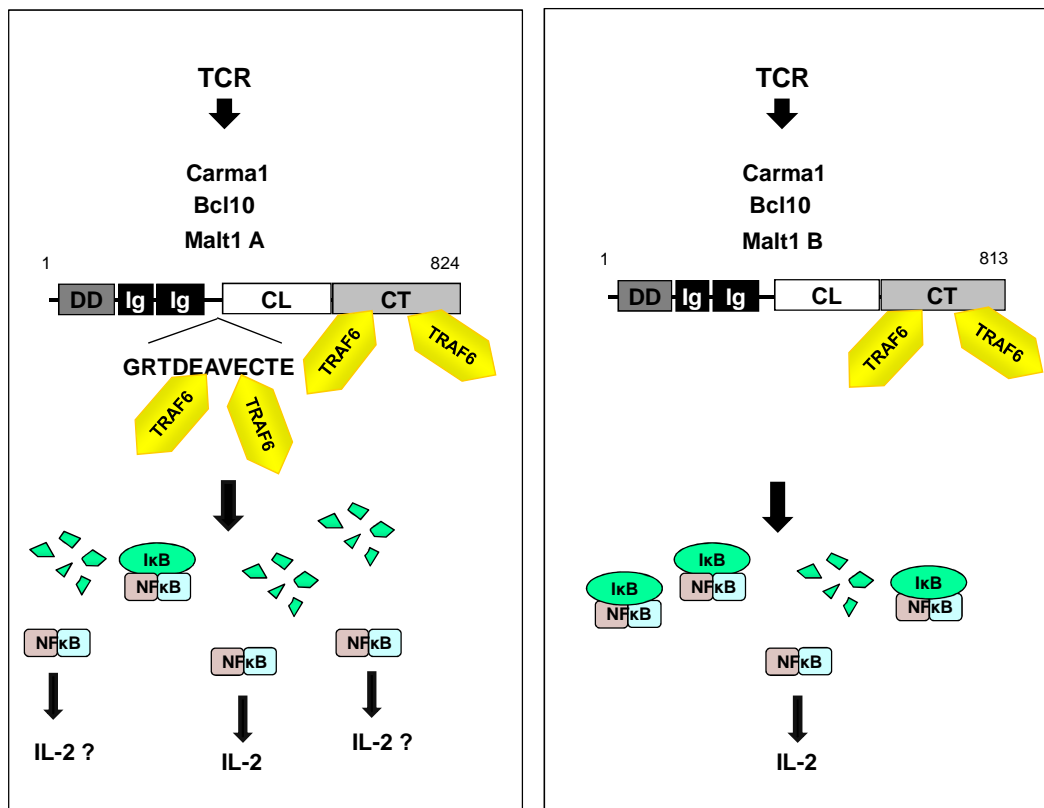


Abbildung 4.3 Malt1 A besitzt stärkere Fähigkeit zur NF-κB Aktivierung als Malt1 B. Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade vom TCR zu NF-κB über Malt1 A (linke Seite) oder Malt1 B (rechte Seite). Durch die zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen induziert Malt1 A eine gesteigerte Aktivierung des Signalwegs stromabwärts des CBM Komplexes. DD: *death* Domäne, Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne, CL: *caspase-like* Domäne, CT: C-terminale Domäne

Die Bindung von TRAF6 an Malt1 im Kontext des CBM Komplexes führt zu Malt1 Ubiquitinierung und Rekrutierung des IKK Komplexes [150]. Eine vermehrte Bindung von TRAF6 an Malt1 im CBM Komplex könnte zu gesteigerter Ubiquitinierung von Malt1 und besserer Rekrutierung des IKK Komplexes führen. Aber auch die Oligomerisierung von TRAF6 durch den CBM Komplex scheint zur Aktivierung von TRAF6 beizutragen [149] und dieses könnte ebenfalls durch die zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen begünstigt sein. Eine weitere Erklärung wäre, dass durch eine verstärkte K63-Ubiquitinierung von Malt1 die Anzahl der Bindungsstellen für den TAB/TAK Komplex zunimmt und dies die Rekrutierung des Komplexes intensiviert. Unter der Annahme, dass der TAB/TAK Komplex die IKK Kinase darstellt [40, 41], würde dadurch einer verstärkte Aktivierung des IKK Komplexes induziert werden. Ob IKK Aktivierung in Malt1 A-beinhaltenden Signalwegen im Vergleich zu Malt1 B-beinhaltenden Signalwegen gesteigert ist, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Allerdings spricht die deutlich stärkere Degradation von IκBα in Malt1 A-

rekonstituierten Malt1-defizienten T-Zellen dafür (Abbildung 3.17), da das Ausmaß der I κ B α Degradation durch die Aktivität des IKK Kinasekomplexes bestimmt wird [3].

Durch Überexpression von Malt1 B in Jurkat T-Zellen wird Bcl10 modifiziert (Abbildung 3.13). Es konnte in unserer Gruppe und von anderen Gruppen gezeigt werden, dass Bcl10 phosphoryliert wird [138, 139, 141, 157]. Die Phosphorylierung von Bcl10 nach TCR Stimulation kann eine negativ regulatorische Funktion für die NF- κ B Aktivierung haben [138, 139, 157]. Die Phosphorylierung von Bcl10 im C-Terminus interferiert mit der Interaktion zwischen Malt1 und Bcl10 [138]. Die hier detektierte Malt1 B-ausgelöste Bcl10 Modifikation war im Gegensatz zu der C-terminalen Bcl10 Phosphorylierung nicht Stimulus-abhängig und könnte damit eine andere negativregulatorische Funktion haben. Möglich wäre, dass durch die Malt1 B-ausgelöste Bcl10 Modifikation die Aktivierung des CBM Komplexes und damit eine TRAF6 Bindung inhibiert wird. Allerdings ist nicht verstanden auf welche Weise Malt1 B aber nicht Malt1 A Modifikationen induzieren kann, die eventuell den CBM Komplex modulieren. Augenscheinlich unterscheidet sich die Assemblierung des CBM Komplexes in Gegenwart von Malt1 A oder B nicht, da Bcl10 und Carma1 mit Malt1 A und mit Malt1 B gleich stark interagieren (Abbildung 3.13). Damit beeinflussen Malt1 A oder B eher die Zugänglichkeit oder Konformation des CBM Komplexes als die CBM Komplex Assemblierung.

Die verstärkte initiale NF- κ B Aktivierung durch Malt1 A sollte auch zu einer erhöhten Expression von NF- κ B Zielgenen führen. Jedoch konnte auf Ebene der IL-2-produzierenden Zellen die gesteigerte Aktivität, die auf Ebene der I κ B α Degradation und NF- κ B Freisetzung reproduzierbar zu sehen war, nicht beobachtet werden (Abbildung 3.19). Der experimentelle Aufbau für die Messung von IL-2 setzt darauf, die Zellen maximal zu aktivieren, um eine starke IL-2 Produktion zu erhalten. Schwache Effekte, die auf Ebene der NF- κ B Aktivierung auftreten, können möglicherweise auf Ebene der IL-2-produzierenden Zellen nicht sichtbar sein. Außerdem wird IL-2 Produktion nicht nur durch NF- κ B, sondern auch durch die Transkriptionsfaktoren NF-AT und AP-1 reguliert [94]. Wie viel NF- κ B Aktivität nötig ist, um in dem verwendeten experimentellen System eine effiziente IL-2 Produktion zu erhalten, ist daher nicht klar. Jedoch spielen unter physiologischen Bedingungen geringe Unterschiede in der NF- κ B Aktivierung sehr wohl eine Rolle. Für die Aktivierung einer Zelle ist neben der Kostimulation auch die Konzentration und Affinität des Antigen/MHC Komplexes und die Dauer des Kontakts zwischen der T-Zell und der Antigen-präsentierenden Zelle entscheidend [66]. Damit auch schwache Stimuli, die durch suboptimale Antigene induziert werden, zur

Aktivierung einer T-Zelle führen, ist eine Verstärkung der NF- κ B Aktivierung notwendig. Eine solche Verstärkung kann durch Malt1 A induziert werden.

Zwar sind noch viele Fragen offen, was die Bedeutung der unterschiedlichen Malt1 Isoformen in der Aktivierung von T-Zellen betrifft, aber es konnte gezeigt werden, dass die Isoformen die initiale Signaltransduktion zu NF- κ B unterschiedlich stark beeinflussen und damit zur dynamischen Feinregulation der NF- κ B Aktivierung beitragen können. Damit zeigen diese Daten, dass die bisherigen Ergebnisse zur Rolle von Malt1 im TCR-Signalweg oder auch in anderen Malt1-beinhaltenen Signalwegen im Lichte der hier gewonnenen Ergebnisse sorgfältig reevaluiert werden sollten.

4.2.2 Malt1 Paracaspase-Aktivität reguliert die IL-2 Produktion unabhängig von initialer IKK/NF- κ B Aktivierung

Die erst kürzlich identifizierte proteolytische Aktivität der Paracaspase Malt1 wird durch T-Zell Stimulation induziert. Bis jetzt identifizierte Substrate sind Bcl10 und die Deubiquitinase A20 [147, 148]. Die Spaltung von A20 wurde mit der Regulation des NF- κ B Signalwegs in Verbindung gebracht [148] und A20 gilt als negativer Regulator der NF- κ B Aktivierung [38]. Auf welcher Ebene A20 in T-Zellen NF- κ B Aktivierung beeinflusst ist jedoch unbekannt. Darüber hinaus gibt es bis jetzt keine genetischen Evidenzen dafür, welche Bedeutung die Paracaspase-Aktivität in der Aktivierung von NF- κ B hat. Die Untersuchung der Malt1 Paracaspase-Aktivität auf genetischer Ebene und durch einen Paracaspaseinhibitor in dieser Arbeit ergab, dass die aktivierungsabhängige IL-2 Produktion durch die Malt1 Paracaspase-Aktivität auf positive Weise reguliert wird. Jedoch ist die initiale Signaltransduktion zu NF- κ B nach T-Zell Aktivierung von der Malt1 Paracaspase-Aktivität unabhängig.

A20 inhibiert P/I-induzierte NF- κ B Aktivierung [160], interagiert nach T-Zell Aktivierung mit Malt1 und wird durch die Malt1 Paracaspase gespalten [148]. Daraus ergab sich ein Modell für die Regulation der NF- κ B Aktivierung durch A20 Spaltung [148]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die A20 Spaltung durch die Malt1 Paracaspase untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass die Aktivierung von T-Zellen die Spaltung von A20 zu einem A20p37 Fragment induziert (Abbildung 3.20). Die Bedeutung der Malt1 Paracaspase für diesen Mechanismus konnte durch die Verwendung des Paracaspaseinhibitors Z-VRPR-FMK verifiziert werden. Z-VRPR-FMK ist ein kompetitiver Peptidinhibitor, der spezifisch auf Paracaspasen und Metacaspasen wirkt. Durch das antagonistische Peptid konnte die A20

Spaltung in Langzeit- und Kurzzeit-Stimulationsexperimenten inhibiert werden (Abbildung 3.20). Allerdings war die aktivierungsabhängige Degradation von A20 und die A20 Resynthese, ein Mechanismus ähnlich des negativen Rückkopplungsmechanismus von I κ B α , durch die Inhibition der Malt1 Paracaspase-Aktivität unbeeinflusst (Abbildung 3.20 und [234]). Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass der gespaltene Anteil von A20 an der gesamten A20 Menge sehr gering ist, so dass die Degradation von A20 kaum beeinflusst wird (Abbildung 3.20 und [148]). Michael Düwel konnte in unserem Labor zeigen, dass die Degradation von A20 ein hauptsächlich proteasomaler Prozess ist und dass durch A20 Deubiquitinaseaktivität die Ubiquitinierung von Malt1 reguliert wird. Dadurch wird die Dauer und Stärke der NF- κ B Aktivierung bestimmt [234].

Neben der unbeeinflussten Degradation von A20 war auch die initiale Degradation von I κ B α und NF- κ B DNA-Bindeaktivität in Jurkat T-Zellen sowohl in Kurzzeit- und Langzeit-Stimulationen als auch in FACS Einzelzellanalysen nicht durch die Behandlung mit Peptidinhibitor Z-VRPR-FMK beeinflusst (Abbildung 3.20). Auch von Rebeaud et al [147] konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Malt1 Paracaspase-Aktivität durch das antagonistische Peptid, keinen Einfluss auf initiale Phosphorylierung von I κ B α hat.

Durch Vergleich von Caspasen, Metacaspasen und Paracaspasen konnten ein Cystein (C464 in Malt1 A und C453 in Malt1 B) und ein Histidin (H415 in Malt1 A und H404 in Malt1 B) in der *Caspase-like* Domäne von Malt1 als katalytisches Zentrum identifiziert werden [136]. Durch Rekonstitution von Malt1-defizienten T-Zellen mit katalytisch inaktiven Malt1 Paracaspasemutanten war es möglich, die Paracaspase-Aktivität auf genetischer Ebene zu untersuchen (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Die Rekonstitution von Malt1-defizienten Zellen mit Malt1 A C464 lieferte zum ersten Mal genetische Evidenzen dafür, dass die initiale Aktivierung von NF- κ B unabhängig von der Malt1-Paracaspaseaktivität ist. Ferner führte die Rekonstitution von Malt1-defizienten T-Zellen mit den katalytisch inaktiven Paracaspasemutanten in Malt1 A (C464A) und Malt1 B (C453A, H404A und H404A/C453A) zu einer Inhibition der IL-2 Produktion (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Diese Experimente bestätigen die Bedeutung der Paracaspase-Aktivität für die aktivierungsabhängige IL-2 Produktion auf genetischer Ebene. Zu beachten ist allerdings, dass der Effekt der Paracaspasemutanten in Malt1 B auf die IL-2 Produktion nicht so stark ausgeprägt war, wie im Fall von Malt1 A. Warum die Ausprägung in diesem Phänotyp durch Malt1 B schwächer ausfällt, ist bis jetzt nicht klar. Man kann die Bedeutung des zusätzlichen

Exons in Malt1 A für die Unterschiede zwischen den Malt1 Splicevarianten zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschätzen, da neben den zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen auch ein Cystein in Exon7 zu finden ist, welches Verbindungen eingehen und dadurch auch Einfluss auf die Malt1 Aktivität haben könnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Malt1 die IL-2 Produktion durch einen von der initialen NF- κ B Aktivierung unabhängigen, bis jetzt noch nicht bekannten Mechanismus reguliert (Siehe Schema Abbildung 4.4). Es wäre möglich, dass Malt1 ein noch zu identifizierendes Protein spaltet und dass diese Spaltung einen positiven Einfluss auf die IL-2 Produktion hat (siehe Schema Abbildung 4.4). Dieser Mechanismus würde der Spaltung von Bcl10 ähneln, die Integrin-abhängig aber NF- κ B unabhängig, die Adhäsion von T-Zellen reguliert [147]. Aber auch ein NF- κ B-abhängiger Mechanismus ist nicht auszuschließen, da die Inhibition der Malt1 Paracaspase durch den Paracaspaseinhibitor zu reduzierter NF- κ B

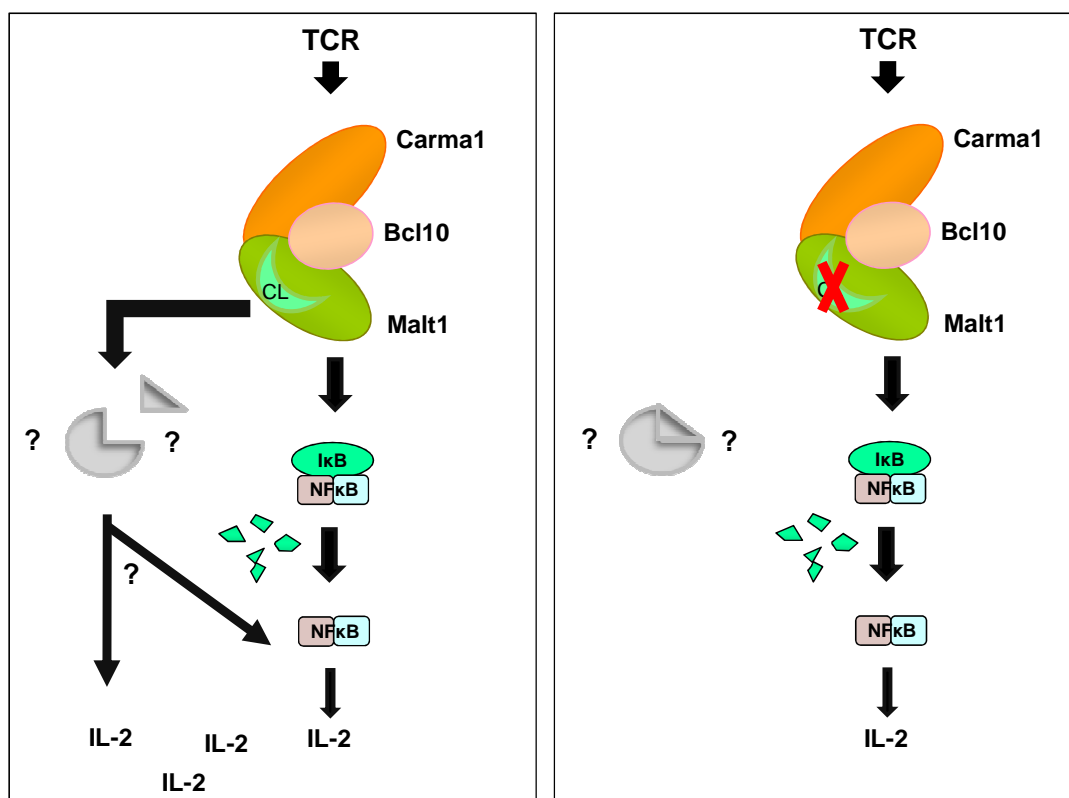


Abbildung 4.4 Die Malt1 Paracaspase-Aktivität reguliert die IL-2 Produktion unabhängig von der initialen NF- κ B Aktivierung. Schematische Darstellung der Bedeutung der Paracaspase-Aktivität in der T-Zell Aktivierung. Die Malt1 Paracaspase-Aktivität (linke Seite) unterstützt die IL-2 Produktion über einen bis jetzt unbekannt Mechanismus, in dem die Spaltung eines Substrats entscheidend sein kann. Die Inhibition der Malt1 Paracaspase-Aktivität (rechte Seite) führt zu einer verringerten IL-2 Produktion. CL: *caspase-like* Domäne

Reporter-Aktivität führt [147]. Hierbei könnte Malt1 durch die Spaltung eines Proteins die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B regulieren und dadurch IL-2 Produktion positiv beeinflussen (Schema Abbildung 4.4). Um diesen Mechanismus weiter aufzuschlüsseln ist die Untersuchung von weiteren NF- κ B Zielgenen entscheidend.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zusammen mit den Ergebnissen von M. Düwel aus unserem Labor [234] sprechen dafür, dass die Malt1 Paracaspase-Aktivität die initiale NF- κ B Aktivierung unabhängig von der A20 Spaltung reguliert. Offen ist allerdings, ob die A20 Spaltung durch die Malt1 Paracaspase die IL-2 Produktion in aktivierten T-Zellen beeinflussen kann.

4.3 Ausblick

Für die Signaltransduktion vom TCR zu NF- κ B ist Malt1 eine zentrale Komponente. Die Malt1 Paracaspase-Aktivität und die zwei unterschiedlichen Malt1 Isoformen sowie Malt1 Interaktoren können Einfluß auf die TCR induzierte Signaltransduktion nehmen. Da Fehlregulationen im NF- κ B Signalweg Autoimmunerkrankungen oder Krebs induzieren, ist ein detailliertes Verständnis, welche Änderungen Signaltransduktionsprozesse deregulieren, essentiell.

Durch die Identifikation des CSNs als Regulator von Bcl10 Stabilität wurde eine weitere Komponente der TCR/NF- κ B Signaltransduktion entschlüsselt. Zwar konnte gezeigt werden, dass das CSN die Bcl10 Stabilität durch Regulation der Bcl10 Ubiquitinierung beeinflusst, es bleibt aber zu klären, wodurch das CSN die Regulation der Bcl10 Ubiquitinierung vermittelt. Die Identifikation von neuen CSN-assoziierten Deubiquitinasen, die die Deubiquitinierung von Bcl10 katalysieren, wäre ein Ansatzpunkt für zukünftige Experimente. Aber auch eine Regulation der Bcl10 Stabilität durch Neddylierung und CSN-vermittelter Deneddylierung von Bcl10 selbst oder anderen Proteinen des NF- κ B Signalwegs wären denkbar. Aus diesem Grund bietet die Identifikation von neddylierten Proteinen im NF- κ B Signalweg eine Möglichkeit, dem CSN-vermittelten Regulationsmechanismus der Bcl10 Stabilität auf die Spur zu kommen. Weiterhin ist auch die Bedeutung des CSNs in anderen Malt1/Bcl10-regulierten Signaltransduktionskaskaden von großem Interesse, denn gerade in diesen

Signalwegen ist wenig darüber bekannt, wie die Signaltransduktion ausgehend vom Rezeptor über den CBM-ähnlichen Komplex reguliert wird.

Deregulierte Aktivität des CBM Komplexes kann zur Entstehung von Lymphomen führen. Daher ist auch die Bedeutung des CSNs in MALT Lymphomen oder DLBCL ein interessanter Aspekt. Darüber hinaus konnte deregulierte CSN Aktivität mit einer schlechten Prognose bei Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Deshalb wäre die Untersuchung der Bedeutung des CSNs in Lymphomen aufschlussreich. Interessant wäre z.B. ob das CSN mit dem cIAP2/Malt1 Fusionsprotein, das in einigen MALT Lymphomen zu finden ist, interagieren kann und welchen Effekt diese Interaktion hätte. Es gibt etliche Hinweise darauf, dass das CSN eine entscheidende Rolle in der Regulation von vielen Krebsarten spielt und damit ein attraktives Ziel für den therapeutischen Eingriff sein könnte. Die Entschlüsselung von CSN Funktionen und Wirkorten ist ein entscheidender Schritt hin zum Verständnis von Fehlregulationen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Malt1 A die aktivere der beiden Malt1 Isoformen darstellt, aber die Effekte konnten nicht bis auf Ebene von IL-2 als NF- κ B Zielgen verfolgt werden. Um dieses Phänomen zu klären, sollten die Malt1 Isoformen genauer biochemisch untersucht werden. Zusätzlich wird die Definition des Malt1 Expressionsmusters in unterschiedlichen Zelltypen dazu beitragen, die Bedeutung der Isoformen in Signaltransduktionsprozessen besser zu verstehen. Geschätzte 75 % aller Gene unterliegen alternativen Splicingprozessen [235, 236]. Auch die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer Änderung in der Expression von Genen. Durch alternatives Splicing werden in aktivierten T-Zellen andere Proteinisoformen exprimiert als in naiven T-Zellen [237]. Auch für Malt1 ist aktivierungsabhängiges alternatives Splicing vorstellbar. Die Definition des Malt1 Expressionsmusters in naiven und aktivierten T-Zellen oder auch in T-Zell Subpopulationen wird Aufschluss über alternative Splicingprozesse geben. Ferner wird auch die Untersuchung der Expression von Malt1 Isoformen in anderen Malt1/Bcl10-regulierten Signalwegen dazu beitragen den Einfluss der Splicevarianten auf die unterschiedlichen Signalwege zu verstehen. Auch die Bedeutung von Malt1 Isoformen in Lymphomzellen darf nicht unterschätzt werden. Deregulierte Expression von Malt1 ist in einigen B-Zell Lymphomen zu finden [238]. Da Malt1 A die aktivere Isoform repräsentiert, könnte das Wachstum von Lymphomen durch die Überexpression von Malt1 A positiv beeinflusst werden. Die zusätzlichen TRAF6 Bindungsstellen in Exon7 wurden in einem cIAP2/Malt1

Fusionsprotein aus MALT Lymphomen identifiziert [151]. Demnach wird Malt1 A in einigen MALT Lymphomen exprimiert. Weiterhin weist auch das cIAP2/Malt1 A Fusionsprotein eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B auf [151], was die Entstehung von Lymphomen begünstigen kann [238].

Für die Erforschung der Malt1 Paracaspase-Aktivität in der Aktivierung von T-Zellen ist die Identifikation weiterer Substrate essentiell. Außerdem kann die Untersuchung der Paracaspase-Aktivität in der Regulation anderer NF- κ B Zielgene und in anderen Malt1/Bcl10-regulierten Signalwegen Aufschluss darüber geben, inwieweit die Malt1 Paracaspase-Aktivität NF- κ B Aktivierung beeinflusst. Auch die Rolle der Paracaspase-Aktivität für das Überleben von Lymphomzelllinien ist ein interessanter Ansatzpunkt, um die Bedeutung der Paracaspase-Aktivität für die Lymphomentstehung abschätzen zu können. Hilfreich hierbei ist sicherlich die Verwendung des Paracaspaseinhibitors Z-VRPR-FMK. Es wird sich zeigen, ob die Inhibition von Paracaspase-Aktivität dazu beitragen kann, das Wachstum von Lymphomen einzugrenzen. Offen ist, welche Effekte durch deregulierte konstitutiv aktive Paracaspase-Aktivität verursacht wird. Das in MALT Lymphomen auftretende cIAP2/Malt1 Fusionsprotein kann in HEK293 Zellen A20 ohne weitere Faktoren spalten [148], so dass eine deregulierte Paracaspase-Aktivität in MALT Lymphomen denkbar wäre.

Die weitere Analyse der Malt1 Isoformen und ihrer Paracaspase-Aktivität in T-Zell Populationen, Malt1/Bcl10-regulierten Signalwegen oder Lymphomzellen wird maßgeblich zu unserem Verständnis der molekularen Malt1 Aktivität beitragen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Malt1 Paracaspase auf die Antigen-vermittelte Aktivierung von NF- κ B in T-Zellen zu untersuchen. NF- κ B ist ein essentieller Transkriptionsfaktor, der die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen reguliert. Dadurch ist NF- κ B einer der entscheidenden Transkriptionsfaktoren in der Induktion der adaptiven Immunantwort. Antigen-vermittelte Aktivierung von Lymphozyten induziert NF- κ B-abhängige Prozesse wie Differenzierung in Effektorzellen und Gedächtniszellen. Fehlregulationen können aufgrund der zentralen Stellung von NF- κ B in Lymphozyten zu Autoimmunerkrankungen oder Krebs führen. Die zentrale Schaltstelle für die Induktion von NF- κ B ist der IKK (*I κ B kinase*) Komplex, der die proteasomale Degradation der Inhibitoren von NF- κ B (I κ Bs) induziert. Die Aktivierung des IKK Komplexes in T-Zellen wird durch Carma1, Malt1 und Bcl10 (CBM) vermittelt. Die Regulation des CBM Komplexes in T-Zellen ist der entscheidende Faktor für die Signaltransduktion zu IKK und NF- κ B.

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Analyse der Funktion von Malt1 Interaktionen, Aktivitäten und Isoformen in der CBM-vermittelten Aktivierung von NF- κ B. Das Ziel des ersten Teils bestand darin die Funktion des neu identifizierten Malt1 Interaktors CSN5 in der Antigen-vermittelten Aktivierung von T-Zellen zu charakterisieren. Durch einen *Yeast-Two-Hybrid Screen* konnte CSN5 (COP9 Signalosom Untereinheit 5) als neuer Malt1 Interaktor ermittelt werden. CSN5 ist eine Untereinheit des COP9 Signalosoms, einem pleiotropen Regulator für Proteinstabilität. Durch Überexpressionsstudien in HEK293 Zellen wurde nicht nur CSN5 als Malt1 Interaktor bestätigt, sondern auch Carma1 als CSN5 Interaktor identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das COP9 Signalosom nach TCR (*T cell receptor*) Stimulation mit Malt1 im Kontext des CBM Komplexes interagiert und dass Carma1 für diese Interaktion essentiell ist. Die COP9 Signalosom/CBM Interaktion verhindert eine schnelle Degradation von Bcl10 nach TCR Stimulation. Es ist bekannt, dass die Bcl10 Degradation die Signaltransduktion zu NF- κ B inhibiert und dass für die Degradation von Bcl10 Ubiquitinierung essentiell ist. Sowohl proteasomale als auch lysosomale Degradation wurden für Bcl10 vorgeschlagen. In dieser Arbeit konnten weitere Indizien für eine lysosomale Degradation gefunden werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das COP9 Signalosom die Stabilität von Bcl10 durch die Regulation der Bcl10 Ubiquitinierung bestimmt. Damit ergeben sich erste Hinweise, dass das CSN die Stabilität eines lysosomal

degradierten Proteins regulieren kann. Die Ergebnisse tragen dazu bei die Regulationsmechanismen des CBM Komplexes in T-Zellen besser zu verstehen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch Experimente in T-Zelllinien und durch Rekonstitutionsexperimente in Malt1-defizienten T-Zellen die Funktion von Malt1 Isoformen und ihre Paracaspase-Aktivität untersucht. Im Menschen aber auch in anderen Spezies werden zwei Malt1 Splicevarianten exprimiert. Exon7 in Malt1 A kodiert elf Aminosäuren (AS 309-319), die in Malt1 B fehlen. Bis jetzt wurde nicht erforscht, ob die zwei Malt1 Isoformen unterschiedliche Fähigkeit zur NF- κ B Aktivierung aufweisen, obwohl Sequenzvergleiche zeigen, dass sich in Exon7 von Malt1 A zwei potentielle TRAF6 Bindungsstellen befinden. Vorherige Experimente konnten zeigen, dass die Interaktion von TRAF6 mit dem Malt1 C-Terminus die Ubiquitinierung von Malt1 induziert und damit die Rekrutierung des IKK Komplexes an den CBM Komplex steuert. CBM/IKK Bindung ist ein essentieller Schritt für die Aktivierung des IKK/NF- κ B Signalwegs. Durch die hier präsentierten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die längere Malt1 Isoform tatsächlich stärkere TRAF6 Bindung vermittelt. Im Einklang mit diesem Resultat steht, das Malt1 A die aktivere Isoform in der initialen NF- κ B Aktivierung ist.

Proteolytische Aktivität der Malt1 Paracaspase-Domäne wurde erst kürzlich identifiziert und der Beitrag dieser enzymatischen Aktivität in der NF- κ B Aktivierung ist weitgehend unverstanden. Behandlung von Jurkat T-Zellen und primären T-Zellen mit einem antagonistischen Peptidinhibitor gegen die proteolytische Malt1 Aktivität zeigen, dass die Malt1 Paracaspase keinen Einfluss auf NF- κ B Signaltransduktion ausübt. Allerdings wirkt sich Malt1 Paracaspase-Aktivität positiv auf die IL-2 Produktion in T-Zellen aus. Ein genetischer Nachweis für die Ergebnisse konnte durch Mutation des katalytischen Zentrums von Malt1 und retrovirale Rekonstitution muriner Malt1 defizienter T-Zellen erbracht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Malt1 Paracaspase-Aktivität nach T-Zellstimulation eine neue Funktion unabhängig von der initialen NF- κ B Aktivierung ausübt.

6 Material

6.1 Geräte und Zubehör

Agarosegelkammern	Harnischmacher (Kassel)
CO ₂ -Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Cryoröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Durchflussszytometer/FACS (BD LSR II)	BD (Heidelberg)
Elektroporationsküvetten	Bio Rad (München)
Elektroporator (Gene Pulser Xcell System)	Bio Rad
Hyperfilme	GE Healthcare (Freiburg)
Heizblock	Techne (Staffordshire, UK)
Inkubatoren	Sartorius (Göttingen), Memmert (Schwabach)
Kodak BioMax MS Film	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kühltruhe	Liebherr (Ochsenhausen)
Magnetic Particle Concentrator 6	Dynal (Invitrogen, Karlsruhe)
Mikroskop Zellkultur	Leica (Wetzlar)
Mikrotiterplatten	Roth (Karlsruhe)
Mikrowelle	Sharp (Hamburg)
Rotator	Neolab (München)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
pH-Meter	HANNA instruments (Tanneries Cedex, Frankreich)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Plastikküvetten	Brand (Wertheim)
Spannungsquelle	Consort (Turnhout, Belgien)
PVDF-Membran	Millipore (Schwalbach)
SDS-PAGE-Kammern	Harnischmacher (Kassel)
Semi-dry Blotter	Harnischmacher
	PHASE (Lübeck)
Thermocycler	Eppendorf
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellkultur-Sterielbank	Nunc (Langenselbold)
Zellkultur-Platten und -Flaschen	Nunc, BD
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf
gekühlte Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Avanti J-26 XP	Beckmann Coulter (Krefeld)

6.2 Chemikalien

[³² P]-αATP	Perkin Elmer (Wiesbaden)
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agar	Roth
Agarose	Bio Sell (Nürnberg)
Ammoniumpersulfat	Bio Rad
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Atufect	Silence Therapeutics (Berlin)
Bacto Agar	BD
Bacto Pepton	BD
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA (Cölbe)
Protein Dye Reagent Concentrate	Bio Rad
BrefeldinA	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Bio Rad
mCD4 (L3T4)-Beads	Invitrogen
DYNAL T Cell Negative Isolation Kit (human)	Invitrogen
Protease inhibitor Tabletten	Roche (Mannheim)
Detachabeads mCD4	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM	Invitrogen
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA 1kb ladder	Invitrogen
dNTP-Mix	Fermentas (St. Leon-Roth)
DTT	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Heringssperma DNA	Sigma-Aldrich
mIL-2, rIL-2	Roche
L-Adeninhemisulfat (Ade)	Sigma-Aldrich
L-Arginin HCl	Roth
L-Glutamin	Invitrogen
L-Histidin HCl (His)	Roth
L-Isoleucin	Roth
L-Leucin (Leu)	Roth
L-Lysin HCl	Roth
L-Methionin	Roth
L-Phenylalanin	Roth
L-Threonin	Roth

L-Tryptophan (Trp)	Roth
L-Tyrosin	Roth
L-Uracil	Roth
L-Valin	Roth
LB (<i>lysogeny broth</i>)	Roth
Lymphoprep	Axis Shield (Oslo, Norwegen)
Natriumpyruvat	Invitrogen
NEM	Calbiochem (Schwalbach)
NP-40	Sigma-Aldrich
OptiMEM I	Invitrogen
Page Ruler	Fermentas
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
PMA	Calbiochem
Polyethylenglycol (2000)	Sigma-Aldrich
Poly dIdC	Roche
Proteaseinhibitoren	Roche
Protein-G-Sepharose	GE Helthcare
Säuregewaschene Glasperlen	Sigma-Aldrich
TEMED	Bio Rad
TNF α	Biomol (Hamburg)
Tris	Roth
Triton-X-100	Roth
Trypanblau	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Tween 20	Sigma-Aldrich
X-Gal	Fermentas
Z-VRPR-FMK	Alexis (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach)

6.3 Enzyme und Kits

High Pure RNA isolation Kit	Roche
Nucleospin Mini Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Pfu DNA Polymerase; Klenow Polymerase	Fermentas
ProteinaseK	New England Biolabs (Frankfurt)
Qiagen One Step RT PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Quick Gel Extraction and PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsendonukleasen und -puffer	New England Biolab, Fermentas

T4-DNA Ligase	New England Biolabs
Gatewaykit	Invitrogen

6.4 *Escherichia coli* Stämme

Top10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻
HB101	F ⁻ mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ m _B ⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm ^R) glnV44 λ ⁻

6.5 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-. 200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ
-------	--

6.6 Eukaryotische Zelllinien

HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i> = HEK), die mit einem Teil der Adenovirus 5 DNA transformiert sind.
Jurkat	human T-Zelllinie (abgeleitet von akuter T Zell Leukämie)
Phoenix	Verpackungszelllinie zur Herstellung ekotropher Viren, HEK293 Derivat

6.7 Nucleinsäuren

6.7.1 Plasmide

Leervektoren	
pEF 3xFlag	Basisvektor pEF4HIS-C (Invitrogen). Die His Sequenz wurde durch drei aufeinander folgende Flag Sequenzen ersetzt (HindIII/KpnI, D. Krappmann)
pEF HA	Basisvektor pEF4HIS-C. Die His Sequenz wurde durch eine HA Sequenz ersetzt (HindIII/BamHI).
pENTR4 und 11	(Invitrogen)
pcDNA3	(Invitrogen)
pMSCV	Retroviraler Vektor. Eine IRES Sequenz ermöglicht simultane Expression von Thy1.1 (CD90.1) und eingefügter cDNA (V. Heissmeyer)
pAS2-1	GAL4 (1-147) DNA-BD, Auxotrophiemarker: TRP1
pACT	GAL4 AD, Auxotrophiemarker: LEU2
B-Zell cDNA Bank	
pAct Library	Die B-Zell cDNA Library wurde in pAct in die XhoI Schnittstelle der MCS

	kloniert (E. Wegener)
Malt1 Konstrukte	
pAS2-1 DD-IG	AS 1-332 wurde mittels PCR amplifiziert und durch NdeI/BamHI Restriktion in den pAS2-1 Vektor integriert 5' Primer 5' ACTCATATGATGTCGCTGTTGGGGGACCCG 3' Primer 5' CATGGATCCTTACTCTTTATTATCAGGATGACCAAG
pAS2-1 Casp-CT	AS 324-813 wurde mittels PCR amplifiziert und durch EcoRI/BamHI Restriktion in den pAS2-1 Vektor integriert 5' Primer 5' CATGAATTCCTTGGTCATCCTGATAAT AAAGAG 3'Primer 5' CATGGATCCTCATTTTTTCAGAAATTCTGAGCCT
3xFlag Malt1	Die Malt1 cDNA wurde mittels BamHI/NotI in pEF3xFlag gesetzt (E. Wegener)
3xFlag Malt1 Fragmente	Konstrukte (AS 1-321, 1-351, 1-407,1-452, 1-490, 448-813, 314-557, 482-813, 612-813, 647-813, 684-813) wurden mittels PCR amplifiziert und über BamHI/NotI Schnittstellen in den pEF 3xFlag Vektor gebracht. (E. Wegener, A. Oeckinghaus, K. Demski)
3xFlag Malt1 H404A, C453A H404A/C453A	Die Punktmutation wurde mittels PCR basierter Mutagenese in zwei Schritten eingeführt. In der ersten PCR wurde ein CT Megaprimer mit der Punktmutation hergestellt, der in der zweiten PCR zusammen mit dem 5' Malt1 Primer verwendet wurde. Für die Doppelmutante wurde die Malt1 H404A Mutante als Matrize in den PCR Reaktionen eingesetzt und die C453A Mutation wie zuvor beschrieben eingefügt. 5' Primer (Malt1 BamHI) 5' AAGGGATTCTCGCTGTTGGGGGACCCG 3' Primer (Malt1 NotI) 5' CTGGCGGCCGCTCATTTTTTCAGAAATTCTGAGCCTG Interner Mutagenese Primer H404A 5' tattatgcaggaGcTggttatga Interner Mutageneseprimer C453A 5' ggtaagGcTcaccttaccaaag
Flag Malt1 WT, C464A pMSCV	Die Klonierung wurde mittels des Gatewaysystems (Invitrogen) durchgeführt. Das pENTR4 Konstrukt mit Flag Malt1 wurde von M. Baens zur Verfügung gestellt. Flag Malt1 wurde mittels LR Clonase Reaktion in den pMSCV Vektor umgesetzt.
3 x Flag Malt1 IsoA, IsoB pMSCV	Malt1 A (AS 1-824) und B (AS 1-813) wurden zusammen mit 3xFlag über <i>HindIII/NotI</i> Restriktion in den pENTR11+ <i>HindIII</i> Vektor (V. Heissmeyer) gesetzt und via LR Clonase Reaktion in den pMSCV Vektor überführt. (A. Oeckinghaus und E. Wegener)
CSN5 Konstrukte	
His CSN5	N-terminales His-Epitop, BamHI/XhoI in pcDNA3 (zur Verfügung gestellt von M. Naumann)
Carma1 Konstrukte	
3 x Flag Carma1	mittels EcoRI/NotI in pEF 3xFlag kloniert (A. Oeckinghaus)
Bcl10 Konstrukte	
3 x Flag Bcl10	mittels BamHI/NotI in pEF 3xFlag kloniert (D. Krappmann)
TRAF Konstrukte	
Flag TRAF6	SalI/NotI in pRK5 Vektor, N-terminales Epitop (P. Bäuerle, Tularik)
Flag TRAF2	SalI/NotI in pRK5 Vektor, N-terminales Epitop (P. Bäuerle, Tularik)

Human cDNAs mit den folgenden Zugangsnummern (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov) wurden verwendet: CSN5 (NM_006837), CSN2 (NM_004236), Malt1 A (NM_006785), Malt1 B (NM_173844), Bcl10 (NM_003921) and Carma1 (NM_032415).

6.7.2 siRNAs

siCSN2-1	5' GCACUGAAACAAAUGAUUA
siCSN2-2	5' GAUAGACUGUGGUUUAAG
siCSN5-1	5' AAGCUCAGAGUAUCGAUGAAA
siUSP15	5' GCACGUGAUUAUCCUGUU

6.7.3 Primer für RT-PCR

GAPDH	5' Primer 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC
	3' Primer 5' 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA
IL-2	5' Primer 5' GCAACTCCTGTCTTGCATTGC
	3' Primer 5' CAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC

6.8 Antikörper

6.8.1 Erstantikörper

β-Aktin (I-19)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Bcl10 (331.3)	Santa Cruz Biotechnology
Carma1	Abcam (Cambridge, UK)
Carma1 (1D12)	Cell Signalling / New England Biolabs
hCD3 (HIT3a)	BD
mCD3 (145-2C11)	BD
hCD28 (CD28.2)	BD
mCD28 (37.51)	BD
mCD16/CD32 (Fc Block)	BD
CSN1	Biomol
CSN5 (FL-334 und B-7)	Santa Cruz Biotechnology
CSN2	Abcam
CSN3	Calbiochem
CSN8	Biomol
Cullin1	Santa Cruz Biotechnology
c-myc (9E10)	Santa Cruz Biotechnology
Flag M2	Sigma-Aldrich
Flag M2-FITC	Sigma-Aldrich
Gal4 DNA-BD	Clontech (Mountain View, CA, USA)
HA (Y-11)	Santa Cruz Biotechnology
Hase Isotypkontroll-Antikörper	Sigma-Aldrich

α -Hamster	MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich)
I κ B α (135A5)	Cell Signalling / New England Biolabs
I κ B α (c-21)	Santa Cruz Biotechnology
IKK γ (FL-419)	Santa Cruz Biotechnology
IKK β	Cell Signalling / New England Biolabs
Lamin B (M-20)	Santa Cruz Biotechnology
mIL2-FITC	eBioscience (Frankfurt)
Malt1 (B12, H300)	Santa Cruz Biotechnology
p65 (c-20)	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-ERK1/2	Cell Signalling / New England Biolabs
Phospho- I κ B α	Cell Signalling / New England Biolabs
Phospho-JNK	Cell Signalling / New England Biolabs
Phospho-p38	Cell Signalling / New England Biolabs
Thy1.1-APC	eBioscience
TRAF6 (H274)	Santa Cruz Biotechnology
Ubi-Fk2	BioTrend (Köln)
Ubi-P4G7	HISS Diagnostics (Freiburg)
USP15 (M01)	Abnova Heidelberg

6.8.2 Zweitantikörper

FITC Ratte anti-Maus IgG1	BD
HRP-konjugiert anti-Hase	JacksonImmunoResearch (Newmarket, UK)
HRP-konjugiert anti-Maus	JacksonImmunoResearch
HRP-konjugiert anti-Ziege	JacksonImmunoResearch
Ratte anti-Maus IgG1	BD
Ratte anti-Maus IgG2a	BD

6.9 Puffer und Lösungen

Kultivierung von Mikroorganismen		
10 x Aminosäuremix (AS)	L-Isoleucin	300 mg/l
	L-Valin	1500 mg/l
	L-Adenin-hemisulfat	200 mg/l
	L-Arginin HCl	200 mg/l
	L-Histidin Monohydrat	200 mg/l
	L-Leucin	1000 mg/l
	L-Lysin HCl	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Threonin	2000 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l	

	L-Tyrosin L-Uracil	300 mg/l 200 mg/l
Hefe Einfriermedium	Glycerol in Hefemedium	25 % (v/v)
LB (Agar)	LB Agar	20 g/l 15 g/l
2 x LB Glycerin	LB Medium mit Glycerin	69 % (v/v)
M9 Minimalmedium (MM)	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl NH ₄ Cl 10 x AS mix Bacto Agar MgSO ₄ * CaCl ₂ * Glucose *(wasserfrei) Prolin * Thiamin-HCl * Agar und Salzlösung wurden getrennt autoklaviert * = nach Autoklavieren zugegeben	22 mM 4,8 mM 8,5 mM 18,7 mM 10 ml pro Liter 3 % (w/v) 1 mM 0,1 mM 0,4 % (w/v) 40 µg/ml 1 mM
Selektionsmedium	Difco Hefe Stickstoff Basis (YNB) ohne Aminosäuren Agar (für Platten) 10 x Aminosäuremix Glucose pH 5,8	6,7 g/l 20 g/l 100 ml/l 2 % (w/v)
YPDA	Difco Pepton Hefeextrakt Agar (für Platten) Glucose Adenin pH 5,8	20 g/l 10g/l 18g/l 2 % (w/v) 0,003 % (w/v)
Yeast-Two-Hybrid		
Hefe Lysispuffer	Triton X-100 SDS NaCl Tris pH 8,0 EDTA	2 % (v/v) 1 % (w/v) 100 mM 10 mM 1 mM
PEG/LiAc	PEG 4000 10 x TE Puffer LiAc	40 % (w/v) 100ml/l 0,1 M
10 x TE Puffer	Tris-HCl EDTA pH 7,5	0,1 M 10 mM
TE/LiAc	10 x TE Litiumacetat (LiAc)	100 ml/l 0,1 M
X-Gal Lösung	X-Gal in N,N- Dimethylformamid	20 mg/ml
Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O KCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O	16,1 g/l 5,5 g/l 0,75 g/l 0,246 g/l

	pH 7,0	
Z-Puffer/X-Gal	Z-Puffer β-Mercaptoethanol X-Gal Lösung	100 ml 0,27 ml 1,67 ml
Molekularbiologie		
Inoue Transformationspuffer	PIPES pH 6,7 MnCl CaCl ₂ KCl	10 mM 55 mM 15 mM 250 mM
Lysozym	Tris pH 8,0 Lysozym	50 mM 10 mg/ml
STET Puffer	Tris pH 8,0 EDTA Sucrose Triton x-100	50 mM 50 mM 8 % (w/v) 5 % (v/v)
TBE Puffer	Tris Borsäure EDTA pH 8,3	50 mM 50 mM 1 mM
TE Puffer	Tris/HCl pH 8,0 EDTA	10 mM 1 mM
TE mit RnaseA	RNaseA in TE	0,1 µg/µl
Zellkultur		
2x HBS (HEPES buffered saline) Puffer	HEPES pH 7,0 NaCl Na ₂ HPO ₄	50 mM 280 mM 1,5 mM
TAC (Tris-Ammonium-Chlorid) - Lysispuffer	Tris pH 7,2 NH ₄ Cl	20 mM 0,83 % (w/v)
Biochemie		
SDS PAGE		
Sammelgelpuffer (4x)	Tris pH 6,8	0,5 M
Sammelgel (1 ml)	Acrylamid/Bisacrylamid Sammelgelpuffer (4x) SDS 1 % H ₂ O APS 10 % TEMED	100 µl 250 µl 100 µl 540 µl 10 µl 1 µl
SDS Elektrophoresepuffer (10x)	Tris pH 8,8 Glycin SDS	0,25 M 1,92 M 1 % (w/v)
Trenngelpuffer (5x)	Tris pH 8,8	1,88 M
Trenngel 10 % (5 ml)	Acrylamid/Bisacrylamid Trenngelpuffer (5x) SDS 1 % H ₂ O APS 10 % TEMED	5 ml 3 ml 1,5 ml 5,35 ml 0,15 ml 15 µl
Westernblot		
Blockpuffer	BSA in PBS-T	3 % (w/v)
Blotpuffer	Tris (pH 8,3) Glycin	48 mM 39 mM

	Methanol SDS	20 % (v/v) 0,037 % (w/v)
10 x PBS	NaCl Na ₂ HPO ₄ KCl KH ₂ PO ₄	1,37 M 81 mM 27 mM 14,7 mM
PBST	PBS Tween-20	0,1 % (v/v)
Strippuffer	Glycin SDS Tween-20 pH 2,2	0,2 M 0,1 % (w/v) 1,0 % (v/v)
Lyse/Immunopräzipitation/Kinase		
Bäuerlepuffer (Hochsalzpuffer)	HEPES pH 7,9 NaCl Glycerin MgCl ₂ EDTA EGTA NP-40	20 mM 350 mM 20 % (v/v) 1 mM 0,5 mM 0,1 mM 1 % (v/v)
CoIP (<i>coimmunoprecipitation</i>) Puffer	HEPES pH 7,5 NaCl Glycerol NP-40 SDS * *(für Malt1 Ubiquitinierung)	25 mM 150 mM 1 mM 0,2 % (v/v) 0,5 % (w/v)
Kinaselysepuffer	HEPES pH 7,5 NaCl MgCl ₂ EDTA Triton x-100	50 mM 150 mM 1,5 mM 1 mM 1 % (v/v)
Kinasepuffer	HEPES pH 7,5 MgCl ₂ ATP β-Glycerophosphat Natriumvanadat DTT	20 mM 10 mM 300 μM 20 mM 50 μM 1 mM
Zytoplasma Extraktionspuffer (Niedrigsalzpuffer)	HEPES pH 7,9 KCl EDTA DTT in Protease Inhibitor Cocktail	10 mM 10 mM 0,1 mM 1 mM
Kern Extraktionspuffer (Hochsalzpuffer)	HEPES pH 7,9 NaCl EDTA DTT in Protease Inhibitor Cocktail	20 mM 0,4 M 1 mM 1 mM
Protease- und Phosphatase- Inhibitor zusätze	Complete protease inhibitor Tablette (Roche) β-Glycerophosphat DTT Natriumvanadat Natriumfluorid	1 / 50 ml 8 mM 1 mM 300 μM 10 mM
Triton CoIP Puffer	Tris pH 7,4	50 mM

	NaCl EDTA Triton x-100	150 mM 1mM 1 % (v/v)
Ubiquitinlysispuffer	Tris pH 7,5 NaCl Triton x-100 NEM	50 mM 150 mM 0,5 % (v/v) 30 mM
EMSA		
Shiftpuffer	HEPES pH 7,9 KCl Ficoll	20 mM 120 mM 4 % (w/v)
Poly dI-dC	Poly dI-dC Tris pH 8,0 NaCl	2 mg/ml 10 mM 100 mM

7 Methoden

7.1 Kultivierung von Mikroorganismen

7.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden, soweit nicht anders erwähnt, in autoklaviertem LB Medium unter aeroben Bedingungen bei 37°C angezogen. Dem Medium wurde, wenn erforderlich, Ampicillin (100 mg/ml) oder Kanamycin (20 mg/ml) zugesetzt. Zur Kultivierung auf Festmedium wurde LB-Agar verwendet, wenn erforderlich mit oben genannter Konzentration an Ampicillin oder Kanamycin. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden über Nacht (üN) Kulturen mit LB-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:2 gemischt und bei -80°C eingefroren

7.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Flüssigkulturen von *S. cerevisiae* wurden auf YPDA oder Selektionsmedium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Die Zugabe von steriler Glucose oder Aminosäuren erfolgte nach dem Autoklavieren. Die Kulturen wurden üN oder über mehrere Tage bei 30°C angezogen. Die Kultivierung auf Festmedium wurde auf YPDA-Agar oder Selektions-Agar durchgeführt. Für Dauerkulturen wurden üN Kulturen mit 25 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

7.2 Yeast-Two-Hybrid (Y2H)

Die Modularität des Transkriptionsfaktors GAL4 ermöglicht die Trennung in GAL4 DNA Bindedomäne und GAL4 Aktivierungsdomäne. Durch Fusion eines Köder-Proteins an die DNA Bindedomäne und einer cDNA Bank an die Aktivierungsdomäne werden die beiden Domänen bei Interaktion eines Proteins aus der cDNA Bank mit dem Köder-Protein in räumliche Nähe gebracht und können die Transkription von Reporter genen aktivieren. Die Methoden für den Y2H wurden nach den Protokollen von Clontech durchgeführt.

7.2.1 Transformation nach der Litiumacetat-Methode für einen Y2H Screen

1 Liter YPDA Medium wurde mit Hefen aus einer Übernachtskultur beimpft, um eine OD von 0,2 herzustellen. Die Ausgangskultur wurde für 3 Stunden schüttelnd inkubiert und dann durch Zentrifugation bei 1000 x g und Raumtemperatur (RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 500 ml sterilem Wasser gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet in 8 ml TE/LiAc resuspendiert. 0,5 mg einer B-Zell cDNA Bank wurden mit 1 mg pAS2-1 CL-CT und 20 mg Heringssperma-DNA vermischt. Die 8 ml Hefesuspension wurde zusammen mit 60 ml PEG/LiAc Lösung auf die DNA gegeben und bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach 30 Minuten wurde DMSO mit einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugefügt und für 15 min ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen auf Eis gekühlt und bei 1000 x g 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml TE aufgenommen. 100 µl einer 1:1000, 1:100 und 1:10 Verdünnung wurden auf Selektionsmediumplatten (100mm) -Trp/-Leu ausplattiert, um die Transformationseffizienz zu bestimmen. Die Effizienz sollte größer als 1×10^6 getestete Klone sein. 1 µl des Transformationsansatzes in 100 µl TE wurden auf Selektionsmedium -Trp oder -Leu ausplattiert, um die Transformationseffizienz jedes Plasmids einzeln zu bestimmen. Der Rest des Ansatzes wurde auf Selektionsmediumplatten (150 mm) -Trp/-Leu/-His/-Ade verteilt (200 µl pro Platte). Nach Inkubation bei 30°C für 5-10 Tage wurden die Kolonien mit einem Durchmesser größer als 2mm auf eine Rasterplatte überimpft und ein β -Galaktosidase Filtertest durchgeführt.

7.2.2 β -Galaktosidase Filtertest

Mit dem β -Galaktosidase Filtertest wurden auf Rasterplatten überimpfte Hefe Klone auf β -Galaktosidaseaktivität getestet. Von der Platte wurde ein Abdruck auf einem Filterpapier gemacht und die Platte für spätere Experimente wieder bei 30°C inkubiert. Zum Permeabilisieren der Zellen auf dem Filterpapier wurde dieses in flüssigem Stickstoff gefroren und bei RT wieder aufgetaut. Der Filter mit den Zellen auf der Oberseite wurde schließlich auf ein weiteres Filterpapier gelegt, das zuvor mit 3 ml Z-Puffer/X-Gal Lösung getränkt wurde. Der Filter inkubierte dann bei 30°C für 30 min – 8 h und die Blaufärbung der Hefeklone wurde dokumentiert. Von Hefeklonen die eine Blaufärbung im β -Galaktosidase Filtertest aufwiesen wurde die Autoaktivierung getestet und Plasmide isoliert, um sie in *E.coli* zu amplifizieren.

7.2.3 Plasmid-Isolation aus Hefe

Ein im β -Galaktosidase Filtertest positiv getesteter Hefeklon wurde in 5 ml Selektionsmedium -Leu/-Trp/-His/-Ade angeimpft und bei 30°C für mindestens 20 h schüttelnd inkubiert. Die gesamte über Nacht Kultur wurde pelletiert (1000 x g, 5 min), in 0,2 ml Hefe-Lysispuffer resuspendiert und 0,3 g Glasperlen sowie 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und für 2 Minuten geschüttelt. Der ganze Ansatz wurde anschließend bei 14 000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetats pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Das nach Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, danach getrocknet und in 20 μ l TE Puffer aufgenommen.

7.2.4 Elektroporation von HB101

In den *E.coli* Stamm HB101 wurden die aus Hefe isolierten Plasmide mittels Elektroporation transformiert. HB101 wurde verwendet, da durch Selektion auf M9 Medium -Leu speziell auf das pAct Plasmid selektiert werden konnte. Plasmid DNA wurde mittels des Nucleospin-Mini-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Das cDNA Insert wurde durch XhoI Restriktion überprüft und nach erfolgreicher Restriktion sequenziert.

Erhaltene Sequenzen wurden durch BLAST (*basic local alignment search tool*) mit der NCBI Datenbank identifiziert.

7.2.5 Test auf Autoaktivierung

Die Autoaktivierung der im β -Galaktosidase Filtertest positiv getesteten Hefeklone wurde zur Identifizierung von falsch Positiven verwendet. Der pAS2-1 Leervektor wurde zusammen mit dem neuen potentiellen Interaktor in pACT in den Hefe Stamm AH109 transformiert auf -Trp/-Leu/-His/-Ade ausplattiert. Die Hefekolonien wurden auf Wachstum und β -Galaktosidaseaktivität überprüft.

7.3 Molekularbiologische Methoden

7.3.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR – *polymerase chain reaction*) verwendet. Alle PCR Reaktionen wurden nach dem Folgenden Reaktionsansatz zusammengestellt.

Reaktionsansatz:

5µl Pfu DNA Polymerase 10xPuffer (mit MgSO₄)
 1µl dNTP mix (10 mM)
 0,5 µl 5'Primer (25 mM)
 0,5 µl 3'Primer (25 mM)
 <0,5 µg Matrizen-DNA
 1,25 U Pfu-DNA-Polymerase
 H₂O ad 50µl

PCR-Programm:

	4 min	94°C	anfängliche Denaturierung
29x	0,5 min	94°C	Denaturierung
		40-70°C	Anlagerung, abhängig von Primern
	1 min	72°C	Elongation (2 min pro kb für Pfu)
	10 min	72°C	abschließende Polymerisation

PCR Fragmente wurden mittels des *PCR Purification Kits* von Qiagen aufgereinigt.

7.3.2 PCR-basierte Mutagenese

Zur Einführung von Mutationen in cDNA wurden zwei gestaffelte PCR Reaktionen kombiniert. Die erste PCR Reaktion wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei in der Regel ein cDNA-flankierender Standardprimer und ein cDNA-interner Mutageneseprimer zum Einsatz kamen. Je Mutageneseprimer wurden maximal sechs Basen ausgetauscht, wobei der mutierte Bereich von mindestens zehn nichtmutierten Basen flankiert war. In der zweiten

Mutagenese-PCR wurde das aufgereinigte Produkt der ersten PCR wiederum als Primer mit einem cDNA-flankierenden Standardprimer eingesetzt. Für die zweite PCR wurden folgende Komponenten gemischt und mit H₂O auf 50µl aufgefüllt:

Template DNA	1 ng
Standardprimer	25 mM
Produkt von PCR 1	750-facher molarer Überschuss zum Template
dNTPs	10 mM
Reaktionspuffer	1 x
Pfu DNA Polymerase	1,25 U

Das PCR Programm entsprach dem im Abschnitt zuvor angegebenem Programm, außer dass für die Mutagenese 35 Zyklen und eine variierende Anlagerungstemperatur für die Primer verwendet wurden. Das Produkt der zweiten Mutagenese-PCR, welches die vollständige cDNA inklusive eingeführter Mutationen enthält, wurde aufgereinigt und zur weiteren Verwendung in ein Plasmid eingefügt.

7.3.3 RT-PCR

Die Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) wurde zur Detektion von mRNA Mengen in der Zelle verwendet. RNA wurde mittels *High Pure RNA isolation kit* aufgereinigt und 100 ng in der RT-PCR eingesetzt. Für die RT-PCR wurde das *Qiagen One Step RT PCR kit* nach Herstellerangaben verwendet.

7.3.4 Restriktions-Analyse von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktionsendonucleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Fermentas nach Herstellerangaben genutzt.

Bei Verwendung zweier Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch Star-Aktivitäten aufzuweisen. War dies nicht möglich oder weniger optimal, so wurde die DNA zunächst mit dem einem Enzym geschnitten und dann mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 14.000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol, nochmaliger Zentrifugation und anschließendem Trocknen wurde

das Pellet in einem geeigneten Volumen H₂O gelöst und die DNA mit dem zweiten Enzym im entsprechenden Puffer geschnitten.

7.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von DNA Fragmenten wurde mittels T4 DNA-Ligase durchgeführt. Für die Ligation von Fragmenten in ein linearisiertes Plasmid wurden in 15 µl die errechnete Menge Plasmid DNA und Fragment mit 1,5 µl 10xLigasepuffer und 0,5 U Ligase versetzt. Der gesamte Ansatz wurde üN bei 15°C inkubiert.

Bestimmung der DNA Mengen für die Ligation:

$$\text{Masse Fragment [ng]} = \frac{3 \times \text{Masse Vektor [ng]} * \text{Länge Fragment [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$

7.3.6 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophoreseapparatur verwendet. Eine Suspension von 0,8 bis 2 % Agarose in TBE Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgeköcht und auf ca. 60°C abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 µg/ml) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm gezogen und der Schlitten in die mit TBE Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gelegt. DNA Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Als Größenstandard diente die 1 kb Plus DNA Leiter von Invitrogen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 50 - 120 V. Durch Einlagerung des Ethidiumbromids in DNA, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Nach der Gelelektrophorese wurden einzelne Banden aus den Agarosegelen ausgeschnitten und die DNA isoliert. Hierzu wurde der *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

7.3.7 Bestimmung der DNA Konzentration

Die DNA Konzentration wurde durch photometrische Analyse bestimmt. Hierfür wurde die präparierte DNA 1:100 in Wasser verdünnt und die Absorption im Bereich zwischen 220 nm und 280 nm gemessen. $A_{260} = 1$ entspricht der Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA; das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der DNA. Reine DNA hat einen $A_{260}/280$ Wert zwischen 1,7-1,9.

7.3.8 DNA Sequenzierung

Zu sequenzierende Plasmide oder PCR Produkte wurden an die Firma Eurofins MWG GmbH geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm DNA Star ausgewertet.

7.3.9 Transformation von *E.coli*

7.3.9.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode von Inoue verwendet [239]. 200 ml LB Medium wurde mit 2 ml einer Übernachtskultur des Stammes Top10 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD600 von 0,6-0,8 angezogen. Es folgte eine Inkubation in Eiswasser für 10 min. Danach wurde die Kultur bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand nach der Zentrifugation verworfen und die Zellen in 80 ml Inouepuffer resuspendiert und erneut 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in 20 ml Inouepuffer mit 15 % Glycerin resuspendiert. Je 100 μl der Zellsuspension wurden aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

7.3.9.2 Transformation chemisch kompetenten *E.coli* Zellen

Zur Transformation von DNA aus Ligationsansätzen in chemokompetente *E. coli* Zellen wurde der Ligationsansatzes mit 100 μl chemokompetenten Zellen vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C erwärmt und anschließend mit 800 μl LB Medium versetzt. Es folgte eine Inkubation für mindestens 30 min bei 37°C auf einem Thermoschüttler. Schließlich wurde der Ansatz auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

7.3.9.3 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Zellen

Aus einer üN Kultur wurden Bakterien 1:10 in 250 ml LB verdünnt, bei 37°C schüttelnd inkubiert bis eine OD600 von 0,5 erreicht wurde. Die Kultur wurde dann eine halbe Stunde auf Eis gestellt. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (5 min, 6000 rpm, 0°C) und der Überstand verworfen. Es folgten mehrere Waschschrte, in denen die Zellen zuerst mit 250 ml eiskaltem sterilem ddH₂O und dann mit 50 ml ddH₂O gewaschen wurden, um Elektrolyte zu entfernen. Weitere Waschschrte mit 10 % (v/v) Glycerin folgten, bei dem das Volumen ausgehend von 5 ml über 2,5ml auf 1000 µl verringert wurde. Die 1000 µl Zellsuspension wurde aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

7.3.9.4 Transformation elektrokompetenter *E.coli* Zellen

Während die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut wurden, wurden die 0,2 cm-Elektroporationsküvetten auf Eis gekühlt. Für die Elektroporation wurden 10-100 ng DNA eingesetzt. Zu den Zellen wurde das zu transformierende Plasmid gegeben, die Suspension in die Elektroporationsküvetten überführt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde in Küvetten bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde sofort LB-Medium auf die Zellen gegeben, die Zellen bei 37°C für 1 h schüttelnd regeneriert und anschließend auf Selektionsagarplatten ausplattiert.

7.3.10 Plasmidpräparation aus *E. coli* nach der Methode der „Kochenden Lyse“

1,5 ml einer *E. coli* üN Kultur wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT) und das Pellet nach Entfernen des Überstandes in 350 µl STET-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym wurde die Zellsuspension 5 min bei RT und anschließend 40 Sekunden bei 95°C inkubiert und schließlich für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet (Zelltrümmer, Proteine, genomische DNA) wurde mit einem Zahnstocher entfernt und die DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 40 µl 3M Natriumacetat pH 5,8 und 400 µl Isopropanol gefällt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13000 rpm. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 30 µl TE mit RNaseA gelöst.

Die Präparation von Plasmid DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Qiagen Maxi-Kit nach Herstellerangaben.

7.4 Zellkultur

7.4.1 Lagerung der Zellen

Zur Lagerung über längere Zeiträume wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden entweder HEK293-Zellen einer 75 % konfluenten 10 cm-Schale oder 1×10^7 Suspensionszellen durch Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert, in 1 ml Lagerungsmedium aufgenommen (DMEM/RPMI, 20 % FCS, 15 % DMSO) und in ein Gefriergefäß abgefüllt. In einem Gefrierkontainer wurden die Proben über Nacht langsam auf -80°C abgekühlt und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Bei Bedarf wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, zur Entfernung des DMSOs mit Medium gewaschen und in Kultur genommen

7.4.2 Kultivierung von Zelllinien

7.4.2.1 Adhärente Zellen

HEK293 Zellen wurden auf 5 cm- oder 10 cm-Zellkulturschalen unter Verwendung von Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, mit 10 % fötalem Kälber-Serum (FCS), 100 U Penicillin-Streptomycin pro ml und 1 mM Natriumpyruvat) kultiviert. Durch Passagieren im Abstand von zwei bis drei Tagen wurden die Zellen in einem Konfluenzbereich zwischen 30 % und 80 % gehalten. Vor dem Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch dreiminütige Inkubation in 1 ml 0,5 % Trypsin-EDTA von der Platte abgelöst und zur Inaktivierung des Trypsins in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. Nach adäquater Verdünnung mit Kulturmedium wurde die Zellsuspension erneut ausplattiert.

Phoenix-Verpackungszellen wurden auf 15 cm-Zellkulturschalen unter Verwendung von DMEM (mit 10 % FCS, 100 U Penicillin-Streptomycin pro ml, 1 mM Natriumpyruvat und $50 \mu\text{M}$ β -Mercaptoethanol) kultiviert. Das Passagieren erfolgte wie bei HEK293 Zellen unter Verwendung von 2 ml Trypsin/EDTA je Platte.

7.4.2.2 Suspensionszellen

Jurkat T-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium (10 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 2mM Glutamin) kultiviert. Durch regelmäßiges Verdünnen der Zellsuspension wurden die Zellen in einem Dichtebereich von $0,5 \times 10^6$ bis $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml gehalten.

7.4.3 Transfektion

7.4.3.1 Transfektion von adhärenenten Zellen - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode

Die Methode basiert darauf, dass $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Kristalle während des Kristallwachstums Plasmid DNA einschließen können. Zellen sind in der Lage, diese Kristalle aufzunehmen und exprimieren daraufhin ektopisch die Plasmid-kodierten Proteine.

HEK293 und Phoenix Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion so verdünnt, dass zum Zeitpunkt der Zugabe der Transfektionslösung eine maximale Konfluenz von 40 % erreicht wurde. Für die Transfektion einer 10 cm-Kulturschale mit HEK293 Zellen wurde folgender Transfektionsansatz verwendet:

10-20 μg DNA

50 μl 2,5 M CaCl_2

ad 500 μl H_2O

500 μl 2 x HeBs wurde Tröpfchen-weise unter kontinuierlichem Mischen zugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die Mischung gleichmäßig ins Medium der zu transfizierenden Zellen gegeben. Für weiterführende Analysen wurden die Zellen mindestens 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

7.4.3.2 Transfektion von DNA in Jurkat T-Zellen

Während der Einwirkung eines elektrischen Impulses auf Zellen in Lösung werden spannungsgesteuerte Zellmembranporen kurzzeitig geöffnet, wodurch extrazelluläre Plasmid DNA ins Zytoplasma diffundieren kann (Elektroporation). Um Jurkat T-Zellen zu transfizieren, wurden 1×10^8 Zellen in einer Elektroporationsküvette (4 mm) mit 20 μg Gesamt DNA gemischt und unter Verwendung eines Gene Pulsers elektroporiert (220 V,

1000 μ F). Die Zellen wurden nach dem Puls in 10 ml Medium aufgenommen und mindestens 48 Stunden vor der Analyse im Brutschrank kultiviert (Abbildung 7.1).

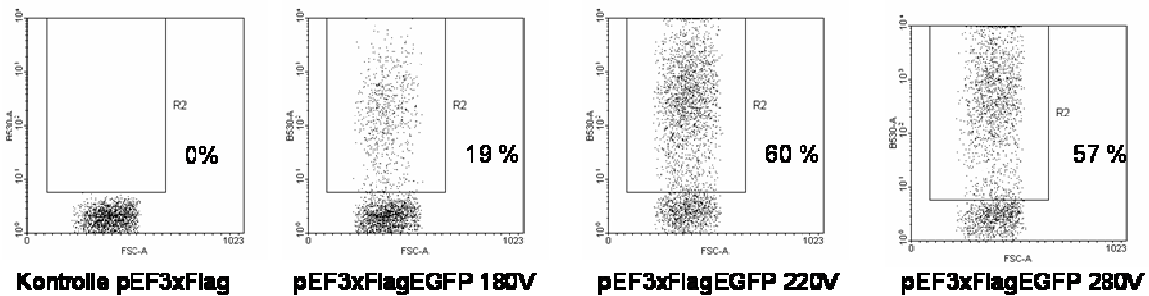


Abbildung 7.1 Bestimmung der optimalen Transfektion durch Elektroporation von Jurkat T-Zellen. Jurkat T-Zellen wurden mit verschiedenen Voltzahl mit 15 μ g pEF3xFlagEGFP oder pEF3xFlag elektroporiert. Mittels FACS Analyse wurde die Anzahl grünfluoreszierender Zellen 48 Std. nach Elektroporation gemessen. Zur Auswertung wurde die Hauptpopulation herangezogen, als Referenz wurden Leervektor-transfizierte Zellen verwendet. Die beste Transfektionsrate wurde mit Elektroporation bei 220 V erreicht.

7.4.3.3 siRNA Transfektion von Jurkat T-Zellen

Zur siRNA Transfektion von Jurkat T-Zellen wurde die Methode der Lipofektion verwendet. Sie basiert darauf, dass genetisches Material mit Hilfe von Liposomen, die leicht mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle eingebracht wird.

Für die Transfektion von siRNA in Jurkat T-Zellen wurden 500.000 Zellen in 800 μ l RPMI mit allen Zusätzen in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte vorgelegt. 0,5 μ l einer 100 μ M siRNA Stammlösung wurden in 100 μ l OPTIMEM gegeben und 1 μ l Atufect mit 100 μ l OPTIMEM gemischt. siRNA/OPTIMEM und Atufect/OPTIMEM Lösungen wurden zusammengeführt und bei 37°C für 30 min inkubiert, so dass sich RNA/Lipid Komplexe bilden konnten. Schließlich wurde der gesamte Ansatz auf die vorgelegte Zellsuspension gegeben und die Zellen im CO₂ Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden frühestens 72 Stunden nach Transfektion analysiert.

7.4.4 Primäre murine CD4⁺ T-Zellen

7.4.4.1 Aufreinigung und Kultur

Murine CD4⁺ T-Zellen wurden durch Dynal-Bead-basierte Positivselektion aus Milz sowie inguinalen, cervicalen und mesenterialen Lymphknoten isoliert und mit anschließender IL-2-induzierter Proliferation angereichert.

Das Dynal-Bead-Protokoll beruht auf der spezifischen Interaktion CD4-exprimierender Zellen mit mCD4-Antikörper beschichteten Partikeln (mCD4-Dynal-Beads). Da diese Partikel magnetisch sind, können gebundene Zellen im Magnetfeld aus einer Zellsuspension abgetrennt werden. Zur Herstellung der Zellsuspension wurden Milz und Lymphknoten separat in Medium durch einen *Cell Strainer* (Siebgröße 100 µm) gepresst und durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, 4°C) von Geweberesten befreit. Um rote Blutkörperchen abzutrennen, wurden die Milzzellen einer partiellen Zellyse unterworfen. Hierfür wurde das Zellpellet in ungekühltem TAC Lysepuffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Unter diesen Bedingungen platzen die Erythrozyten aufgrund verminderter Fähigkeit zur Osmoregulation. Die verbleibenden Milzzellen wurden in PBS gewaschen und für die weitere Aufreinigung mit den Lymphknotenzellen vereinigt.

Um die Bindung der Antikörperpartikel an die CD4⁺ T-Zellen zu ermöglichen, wurde die Zellsuspension für 30 Minuten mit 100 µl CD4-Dynal-Beads pro Maus inkubiert. Unter Verwendung eines *Magnetic Particle Concentrators* wurden die gebundenen CD4⁺ T-Zellen im Magnetfeld von den restlichen Milzzellen und Lymphknotenzellen abgetrennt. Zur Elution der Zellen von den Partikeln wurden 50 µl CD4-Detachabeads pro Maus eingesetzt.

Die gereinigten CD4⁺ Zellen wurden in Medium resuspendiert und für weiterführende Analysen in mCD3 und mCD28 Antikörper-beschichteten 6-Well Platten kultiviert. Innerhalb von 30 Minuten setzen sich die Zellen auf dem beschichteten Plastik ab, wonach durch Aktivierung der Zellen morphologische Veränderungen auftreten. Nach 48 Stunden wurden die haftenden Zellen vom Well-Boden mit Medium (20 U IL-2/ml) abgespült und auf eine Dichte von 0,7- 1x10⁶ Zellen verdünnt. Durch verstärkt einsetzende Proliferation der T-Zellen stieg die Zellzahl innerhalb der nächsten fünf Tage auf das 10- bis 30-fache an. Durch Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen zwischen 1x10⁶ und 3x10⁶ gehalten.

7.4.4.2 Retrovirale Infektion

Zur Anreicherung von ekotrophen Retroviren in Zellkulturüberständen wurden Phoenix Verpackungszellen verwendet. Die zu infizierenden CD4⁺ T-Zellen wurden wie beschrieben unter Verwendung von mCD4-Dynal-Beads aus Mäusen aufgereinigt.

Die Phoenix Zellen wurden auf 10 cm-Schalen transfiziert. Hierfür wurde ein pMSCV Vektor verwendet: Dieser ermöglicht aufgrund einer IRES Sequenz neben der Expression des gewünschten Proteins die Expression des Oberflächenmarkers Thy1.1 (CD90.1) zur

Bestimmung der Infektionseffizienz. Zum besseren Verständnis des Experimentablaufs siehe Tabelle 7.1.

Tabelle 7.1 Experimenteller Ablauf der retroviralen Infektion von primären CD4+ T-Zellen

Tag	Transfektion 1	Transfektion 2	CD4+ T Zellen
1	Eine 15 cm-Schale Phoenix pro Konsturkt → 10 x 10 cm-Schalen		
2	Transfektion	1x15 cm-Schale Phoenix pro Konsturkt → 10 x 10 cm-Schalen	6-Well Platten werden mit anti-Hamster beschichtet
3	10 ml Medium werden durch 4,5ml Medium ersetzt	Transfektion	Isolation CD4+ T Zellen, CD3/CD28 Stimulation zur Expansion
4	Virusernte → 6000g RT üN, 4,5 ml frisches Medium	10 ml Medium werden durch 4,5ml Medium ersetzt	
5	Virusernte	Virusernte	Infektion mit vereinigtem Virusüberstand
6-8			Kultur in RPMI mit IL-2
9			Stimulation und Analyse

Die Transfektion der Phoenix Zellen wurde unter Einsatz der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode durchgeführt. Zur Optimierung der Infektionsrate, wurden zwei Transfektionsreihen Phoenix Zellen zur Virusproduktion herangezogen, die an aufeinander folgenden Tagen transfiziert wurden. Nach einem Tag wurde das Medium der transfizierten Zellen abgesaugt und durch 4,5 ml frisches Medium je Schale ersetzt. Der an Tag 4 anfallende Virusüberstand der Transfektion 1 wurde filtriert (0,45 μm Porengröße) und einer 12-stündigen Zentrifugation (6000g, RT) zur Pelletierung der Viruspartikel unterzogen. Der frische Virusüberstand der beiden Transfektionen wurde an Tag 5 filtriert, mit dem Pellet der 12-Stunden Zentrifugation vereint und nach Zugabe von Polybren (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) für die Infektion der Zielzellen verwendet.

Die zu infizierenden CD4+ T-Zellen wurden an Tag 3 aufgereinigt und auf eine Dichte von 1 bis 2×10^6 Zellen/ml gebracht. Die Zellsuspension wurde in einem anti-CD3/CD28-Antikörper-beschichtete Vertiefung einer 6-Well Platte ausgesät und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am Tag 5 wurden die T-Zellen mit 10 ml Virusüberstand überschichtet, die 6-Well Platte bei 2000 rpm RT eine Stunde zentrifugiert und anschließend weitere 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Schließlich wurden die Zellen vom Plattenboden abgespült, zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in IL-2-haltigem Medium (20 U/ml)

aufgenommen und weitere 3 Tage im Brutschrank kultiviert, bevor sie für Stimulationen und FACS Analysen verwendet wurden.

7.4.4.3 Färbung von CD4⁺ T-Zellen für FACS Analysen (IL-2, I κ B α und Flag)

Proteine in oder auf Zellen können mittels eines Fluorophor-gekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht werden und durch FACS analysiert werden. Für die Detektion von intrazellulären Proteinen ist die Permeabilisierung der Zellmembran wichtig. Retroviral rekonstituierte CD4⁺ T-Zellen konnten mittels des Oberflächenmarkers Thy1.1 identifiziert werden. Expression des gewünschten Flag-gekoppelten Proteins wurde mit einer Flag Färbung überprüft. Die Fähigkeit zur CD3/CD28-induzierten Produktion des Zytokins IL-2 oder Stimulus-abhängiger I κ B α Degradation wurde an Tag 4-6 nach der Infektion gemessen.

Flag-Färbung

Zur Analyse der Expression von Flag gekoppelten Proteinen in infizierten Zellen wurden ca. 2×10^6 Zellen pro Ansatz mit PBS gewaschen, mit 200 μ l 1 % FCS/PBS / 0,2 μ g Thy1.1-APC Antikörper versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 300 μ l 4 % Formaldehyd/PBS für 15 min fixiert. Anschließend wurden sie zwei Mal mit PBS gewaschen und dann zum Permeabilisieren mit 200 μ l 0,5 % Saponin/ 1 % BSA/PBS / 0,5 μ g FcBlock versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde 1,1 μ g Flag M2-FITC Antikörper zugegeben und bei RT für 45 min inkubiert. Schließlich folgten drei Waschschritte mit PBS bevor die Zellen mittels FACS Analyse untersucht wurden.

IL-2 Färbung

Die Zytokinproduktion wurde durch intrazelluläre Färbung von IL-2 bestimmt. Hierzu wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen, um exogenes IL-2 zu entfernen. Anschließend wurde die Aktivierung der Zellen durch Ausplattieren in CD3/CD28 Antikörper-beschichteten 6-Well Platten eingeleitet. BrefeldinA (10 μ g/ml Endkonzentration), ein Inhibitor des intrazellulären Proteintransports, wurde zwei Stunden vor Ende der Stimulation zugegeben, um die Akkumulation der produzierten Zytokine im Endoplasmatischen Retikulum hervorzurufen. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und 20 Minuten auf Eis in 100 μ l 1 % FCS/PBS mit 0,2 μ g APC markiertem Thy1.1 Antikörper inkubiert. Durch Zugabe von 200 μ l 4 % Formaldehyd/PBS wurden die Zellen 10 Minuten bei RT fixiert und danach erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte in 200 μ l

0,5 % Saponin/ 1 % BSA/PBS. Nach Zugabe von 0,5 µg FcBlock für 10 min wurde 0,5 µg FITC-IL-2 zugesetzt und der Ansatz für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die intrazelluläre Färbung der Zellen mit einem BD FACS LSR II analysiert.

IκBα-Färbung

Zur Detektion von IκBα Degradation in T-Zellen wurden diese in 300 µl RPMI Medium mit 0,2 µg Thy1.1 Antikörper für 20 min mit PMA/Ionomycin stimuliert und dann durch Zugabe von 400 µl 4 % Formaldehyd/PBS für 15 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 50 µl 0,5 % Saponin/ 1 % BSA/PBS aufgenommen und 10 min permeabilisiert. Danach wurden 1 µl IκBα Antikörper (Cell Signalling) zugesetzt und der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und in 50 µl 0,5 % Saponin/ 1 % BSA/PBS mit FITC Ratte-anti-Maus-IgG1 Antikörper(1:300) aufgenommen. Nach 20 min wurde der Ansatz dreimal gewaschen um dann mittels FACS Analyse untersucht zu werden.

7.4.5 Primäre humane T-Zellen

7.4.5.1 Aufreinigung

Primäre humane T-Zellen wurden mittels des *Dynal T cell Negative Isolation Kit* nach Herstellerangaben aus Blut aufgereinigt. Der für die Negativselektion verwendete Antikörpermix mit Antikörpern gegen CD14, CD16, HLA Klasse II DR/DP, CD56 und CD235a kann alle Zellen (B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten etc.) außer T-Lymphozyten binden. Die Antikörper-gebundenen Zellen werden mittels magnetischer Partikel, die die Antikörper binden, aus der Zellsuspension entfernt.

Frisch gespendetes Blut wurde direkt nach der Abnahme mit Heparin (16 U/(ml Blut)) versetzt und bei 300 g 10 min bei RT zur Anreicherung von Leukozyten abzentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstehen drei Fraktionen. Die obere klare Fraktion besteht aus Plasma, die mittlere Fraktion wird als *Buffy Coat* bezeichnet und enthält hauptsächlich Leukozyten, und die untere Fraktion besteht aus den konzentrierten Erythrozyten. Der *Buffy-Coat* von 50 ml Blut wurde mittels einer Pasteurpipette abgenommen und mit PBS auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt. Mit dem verdünnten *Buffy Coat* wurden 15 ml Lymphoprep überschichtet und bei 160 g für 20 min RT ohne Bremse in einem *swingout*-Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 20 ml Überstand abgenommen, um

Thrombozyten zu entfernen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 350 g für 20 min RT ohne Bremse führte zur weiteren Anreicherung von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) in einer Schicht zwischen Lymphoprep und *Buff Coat*/PBS. Die PBMC Schicht wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, mit PBS/0,1 % BSA/2 mM EDTA gewaschen und bei 400 g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte (225 g für 8 min 4°C) und schließlich wurden die PBMCs auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml gebracht. Zu 1×10^7 PBMCs wurden 20 µl Hitze-inaktiviertes FCS und 20 µl Antikörpermix gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Bei größeren Zellzahlen wurden die Mengen entsprechend erhöht. Der Zell/Antikörpermix wurde mit PBS/BSA/EDTA gewaschen, in 900 µl PBS/BSA/EDTA aufgenommen, mit 100 µl gewaschenen Dynalbeads versehen und für 15 min bei RT rotierend inkubiert, so dass die Antikörper/Zell Komplexe an die magnetischen Partikel binden konnten. Nach der Inkubation wurde zum entfernen von Zell/Partikel-Aggregaten die Suspension mehrmals pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS/BSA/EDTA wurden die Zell/Partikel-Komplexe aus der Suspension mittels eines *Magnetic Particle Concentrators* entfernt und die T-Zell Suspension in ein neues Gefäß überführt. Um restliche T-Zellen aus den Partikeln zu lösen, wurden sie mit 1 ml PBS/BSA/EDTA gewaschen und der Überstand zu den zuvor gewonnenen T-Zellen hinzugegeben.

7.4.5.2 Expansion und Kultur

Zur Expansion von primären humanen T-Zellen wurde der *Dynabeads CD3/CD28 T cell Expander* verwendet. Das Prinzip von diesem Kit basiert darauf, dass magnetische Partikel, die mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern besetzt sind, *in vivo* Stimulation durch Antigen-präsentierende Zellen imitieren.

Nach der Aufreinigung wurden die primären humanen T-Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 2mM Glutamin mit 20 µl *T cell Expander* pro 1×10^6 Zellen im CO₂ Inkubator kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen wurde rIL-2 mit einer Endkonzentration von 20 U/ml zugegeben und die Zellen bis zu 1,5 Wochen durch Verdünnung und Zugabe von rIL-2 expandiert. Die magnetischen Partikel wurden einen Tag vor Experimenten mit dem *Magnetic Particle Concentrators* entfernt.

7.4.6 Stimulation und Inhibition

Stimulierende Agenzien und Inhibitoren wurden dem Medium direkt zugesetzt. Stimulationszeiten oder Inhibitionsverlauf sind aus den Abbildungen der einzelnen Experimente ersichtlich. T-Zellen wurden entweder über anti-CD3/CD28 Antikörper oder mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) / Ionomycin stimuliert.

Die Stimulation des TCRs (CD3-Untereinheit) und des CD28 Kostimulationsrezeptors wurde mit spezifischen Antikörpern durchgeführt, die durch weitere Antikörper miteinander vernetzt wurden. Auf diese Weise wird T-Zell/APZ ausgelöste Rezeptoraggregation simuliert, was zur Aktivierung intrazellulärer Antigenrezeptor-spezifischer Signalkaskaden führt.

PMA, ein Phorbolester mit struktureller Ähnlichkeit zu Diacylglycerol (DAG), fungiert in T-Zellen als potenter Aktivator von PKC θ und damit auch von NF- κ B. Ionomycin hingegen induziert wie IP₃ den Ca²⁺-Influx aus intrazellulären Speicherkompartimenten und nimmt hauptsächlich Einfluss auf die Aktivierung von NF-AT [240, 241]. Falls nicht anders vermerkt, wurden folgende Konzentrationen der Substanzen eingesetzt:

Ionomycin	300 ng/ml
Leupeptin	100 μ M
MG132	25 μ M
PepstatinA	100 μ M
PMA	200 ng/ml
TNF α	25 ng/ml

Die Stimulation von Jurkat T-Zellen und primären humanen T-Zellen mit anti-CD3/CD28 Antikörpern wurde in Lösung durchgeführt. CD3/CD28 Vernetzung wurde durch die Zugabe von anti-IgG₁ und anti-IgG_{2a} Antikörpern ausgelöst. Folgende Antikörperkonzentrationen wurden verwendet:

hCD3 (IgG _{2a})	1 μ g/ml
hCD28 (IgG ₁)	4 μ g/ml
anti-IgG ₁	2 μ g/ml
anti-IgG _{2a}	2 μ g/ml

Die Stimulation von murinen CD4⁺ T-Zellen erfolgte unter Verwendung immobilisierter Antikörper auf zuvor mit anti-Hamster Antikörper beschichteten Zellkulturplatten nach

Zugabe von anti-mCD3/mCD28 Antikörpern. Folgende Antikörperkonzentrationen wurden verwendet:

mCD3	0,5 µg/ml
mCD28	1 µg/ml
Anti-Hamster	0,3 mg/ml

7.5 Biochemische Methoden

7.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Kolorimetrische Bestimmungen von Proteinkonzentrationen wurden mit *Protein Dye Reagent Concentrate* der Firma Biorad durchgeführt. Die Detektion beruht auf einer Extinktionsmessung bei 595 nm der nach Herstellerangaben behandelten Proben. Die Proteinkonzentrationen wurden über eine mit BSA erstellte Eichreihe ermittelt.

7.5.2 SDS PAGE

Proteine wurden unter Anwendung der diskontinuierlichen SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE) aufgetrennt. Der Vernetzungsgrad der verwendeten Gele wurde durch Variation der Acrylamidprozentigkeit den individuellen Erfordernissen angepasst. Durch Überschichten des Trenngels im nicht polymerisierten Zustand mit Isopropanol wurde ein gleichmäßiger Übergang zwischen Sammelgel und Trenngel gewährleistet. In das Sammelgel wurden Kämme mit bis zu 15 Taschen eingepasst. Die Proteinproben wurden in 4 x SDS Probenpuffer aufgenommen und zur Denaturierung 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in SDS Elektrophoresepuffer bei maximal 200 V durchgeführt und nach Austritt der Bromphenolblau-gefärbten Lauffront aus dem Gel beendet.

7.5.3 Western Blot und Immunodetektion

Zum immunologischen Nachweis wurden per SDS PAGE aufgetrennte Proteine auf PVDF Membranen transferiert (Western Blot). Hierfür wurde unter Verwendung einer *Semi-Dry* Blotting Apparatur ein Elektrotransfer durchgeführt. Gele und Methanol-aktivierte

Membranen wurden beidseitig umgeben von Blottingpuffer-getränktem Filterpapier zwischen den Elektroden platziert und 60 bis 90 Minuten einer Stromstärke von 60 mA pro Gel ausgesetzt.

Der immunologische Nachweis Membran-fixierter Proteine erfolgte über Protein-spezifische Erstantikörper und Spezies-spezifische Zweitantikörper. Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran mit PBST gewaschen, eine Stunde bei RT mit 3 %BSA/PBST blockiert und anschließend mit dem Protein-spezifischen Erstantikörper in 1,5 %BSA/PBST über Nacht bei 4°C inkubiert. Um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen, wurde die Membran mindestens dreimal für 5 Minuten mit PBST gewaschen und dann eine Stunde bei RT mit einem Zweitantikörper in 0,75 %BSA/PBST inkubiert. Die verwendeten Zweitantikörper sind an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Während der Peroxidasereaktion mit Substrat wird Licht emittiert, das durch Auflegen eines Films detektiert werden kann. Als Substratlösung wurde das LumiGLO System (New England Biolabs) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben eingesetzt. Die Membran kann nach Ablösen der gebundenen Antikörper durch Strippuffer erneut zur Detektion anderer Proteine verwendet werden.

7.5.4 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen (IP) werden zur Untersuchung von Proteinmodifikationen oder Protein/Protein Wechselwirkungen durchgeführt. Grundlage für diese Art der Analyse ist der Einsatz eines Protein-spezifischen Antikörpers, der die selektive Abtrennung des zu untersuchenden Proteins aus einem Zelllysate unter Verwendung von Immunglobulin-bindender Sepharose erlaubt. Bei weiterführender Analyse des Präzipitats mittels SDS PAGE und Western Blot besteht die Möglichkeit unter anderem Phosphorylierung- und Ubiquitinierung des gefällten Proteins zu untersuchen, aber auch Protein/Protein Interaktionen mit assoziierten Bindungspartnern nachzuweisen.

Zelllysate wurden unter Verwendung von CoIP Puffer, Triton CoIP Puffer oder Ubiquitinlysispuffer angefertigt. Dafür wurden 5×10^6 - 3×10^7 Zellen in dem entsprechenden Lysepuffer für 20 min auf dem Rotator bei 4°C lysiert. Die Lysate wurden dann für 10 Minuten bei 14000 rpm in einer Tischkühlzentrifuge zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Die Überstände wurden für die IP verwendet. Die Immunpräzipitation wurde nach Zugabe von bis zu 2 µg Antikörper zu dem Lysat über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zur Isolation des Antikörper/Protein Komplexes wurden am nächsten Tag 18 µl Protein G-Sepharose (PGS) Suspension (1:3) zugesetzt. Nach mindestens 30

Minuten Inkubation bei 4°C wurde die Sepharose durch Zentrifugation pelletiert und dreimal mit eiskaltem Lysepuffer gewaschen, in 15 µl 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Die erhaltenen Proben wurden per SDS PAGE und Western Blot analysiert.

7.5.5 Kern/Zytoplasma Extraktion

Zur Trennung von Kern und Zytoplasma wurden Zellen in 500 µl Niedrigsalzpuffer aufgenommen und auf Eis inkubiert. Nach 15 Minuten wurde NP-40 mit einer Endkonzentration von 0.13 % zugegeben und gemischt. Eine kurze Zentrifugation lieferte im Überstand die Zytoplasmafraktion, der Glycerol mit einer Endkonzentration von 5 % zugesetzt wurde. Das Pellet wurde in 50 µl Hochsalzpuffer aufgenommen, ebenfalls mit 5 % Glycerol versetzt und gut vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln bei 4°C, wurde der Ansatz zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4°C), so dass der Überstand die Kernfraktion enthielt.

7.5.6 Bestimmung der Proteinkinaseaktivität

In *in vitro* Kinasereaktionen wurde die Fähigkeit von Kinasen analysiert, bakteriell exprimierte und gereinigte Substrate zu phosphorylieren. Hierbei kamen IKK Immunpräzipitate aus ruhenden und aktivierten Jurkat T Zellen zum Einsatz, die in Kinasepuffer lysiert wurden. Für *in vitro* Kinasereaktionen wurden die Präzipitate wie für eine IP beschrieben gewaschen, durch einmaliges Waschen mit eiskaltem Kinasepuffer umgepuffert und schließlich in 20 µl Kinasepuffer aufgenommen. Die Kinasereaktion wurde nach Zugabe von 1 µg rekombinantem IκBα (AS 1-53) für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die PGS kurz abzentrifugiert und der Überstand entnommen. Überstand und PGS wurden getrennt mit 4 x SDS-Probenpuffer aufgeköcht, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Sowohl die Überstände, als auch die aufgeköchten PGS wurden mittels SDS PAGE und Western Blot analysiert. Zur Detektion von Phosphorylierte IκBα wurde ein phosphospezifischer IκBα Antikörper verwendet.

7.5.7 Bestimmung der NF- κ B DNA Bindung

7.5.7.1 Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten

Zur Auffüllung 5' überhängender Enden doppelsträngiger DNA Oligonukleotide wurde das Klenowfragment der *E.coli* Polymerase I verwendet. In einem Standardansatz von 25 μ l wurden folgende Komponenten eingesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert:

H2K	400 ng
10xKlenow Puffer	1x
dNTP-A	je 360 μ M
α [³² P]dATP	40 μ Ci
Klenowfragment	1 U

Der Reaktionsansatz wurde unter Verwendung des *Qiaquick Nucleotide Removal Kits* aufgereinigt.

7.5.7.2 EMSA (*elektro-mobility-shift assay*)

DNA-Fragmente wandern in einem nativen Polyacrylamidgel nach dem Anlegen einer Spannung zur Anode. Bei Anwesenheit Dpa-Bindender Proteine verlangsamt sich die Laufgeschwindigkeit, es kommt zur Retardierung. Unter Verwendung radioaktivmarkierter DNA Oligonukleotide lassen sich auf diese Weise geringe Mengen an DNA/Protein-Komplexen sichtbar machen.

Ein mit Klenowfragment radioaktiv markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid mit einer NF- κ B Bindestelle (H2K: gatcCAGGGCTGGGGATTCCCCATCTCCACAGG) wurde in Shiftpuffer zusammen mit 1 μ g BSA, 5 mM DTT, 2 μ g Poly dI-dC und mit Bäuerlepuffer hergestellten Proteinextrakt (2-10 μ g) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Inkubation wurde danach auf ein natives Polyacrylamidgel (5 %) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 25 mA pro Gel in TBE als Laufpuffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier Vakuum-getrocknet und ein Kodak BioMax MS Film aufgelegt.

8 Abkürzungen

ABC	activated-B cell
Ade	Adenin
Ag	Antigen
AP-1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARD	ankyrin-repeat Domäne
AS	Aminosäure
β-TRCP	β-transducin repeat containing protein
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
Bcl	B cell lymphoma
BCR	B cell receptor
BIR	baculovirus IAP repeats
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	caspase-recruitment domain
Carma	CARD-containing membrane-associated guanylate kinase protein
CBM	Carma1-Malt1-Bcl10
CC	coiled-coil Domäne
CD	clusters of differentiation
Cdk	cycin dependent kinase
cFLIP	cellular form of FLICE-inhibitory protein
cfu	colony forming unit
cIAP	cellular apoptosos inhibitor
CK	Casein-Kinase
CL	caspase-like Domäne
COP	constitutive photomorphogenesis
CRL	Cullin-RING-Ubiquitinligasen
CSN	COP9 Signalosom
CTLA	cytotoxic T lymphocyte antigen
CT	C-Terminus

CYLD	cylindromatosis
DAG	Diacylglycerol
DBD	DNA Bindedomäne
DD	death Domäne
DLBCL	diffuse large B cell lymphoma
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
eIF3	eukariotic translation initiation factor 3
EMSA	electro-mobility-shift assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable
FcεRI	high affinity IgE receptor
FCS	fetal calf serum
FMK	Fluoromethyl-Keton
FSC	forward scatter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GADS	Grb2-related adaptor protein
GAL	Galctosidase
GCB	germinal center B cell
GFP	green fluorescence protein
GPCR	G-protein coupled receptor
Grb	growth factor receptor bound protein
GUK	guanylate kinase-like
h	Stunde
HEK	human embryonic kidney
His	Histidin
HLH	helix-loop-helix Domäne
hnRNPLL	heterogenous ribonucleoprotein L-like
ICOS	inducible T cell costimulation

Ig	Immunglobulin-ähnlich
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	IκB Kinase
IL-2	Interleukin-2
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositoltrisphosphat
IRES	internal ribosomal entry site
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAB1	Jun activating binding protein
JNK	Jun N-terminale Kinase
kD	kilo Dalton
KO	knock-out
LAT	linker for activated T cells
LB	lysogeny broth
Leu	Leucin
LZ	leucinzipper
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
Malt1	mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MAPK	mitogen activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MPN	Mrp1-Pad1-N-terminal
NBD	NEMO Bindungsdomäne
NES	nuclear export signals
NF-AT	nuclear factor of activated T cells
NF-κB	nuclear factor-κB
NIK	NF-κB inducing kinase
NK	natural killer
NLS	nuclear localization signal
NM23-H2	Nukleosiddiphosphat Kinase Isoform2
NT	N-Terminus
OD	optische Dichte

P	Phosphorylierung
PAMP	pathogen-associated microbial pattern
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMCs	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCI	proteasom - COP9 signalosome - initiation factor 3
PCR	polymerase chain reaction
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PDZ	Psd-95/Dlg/ZO-1 Homolog
PGS	Protein G-Sepharose
P/I	PMA/Ionomycin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC θ	ProteinkinaseC Isoform θ
PKD	Proteinkinase D
PLC γ	PhospholipaseC γ
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMBL	primary mediastinal B cell lymphoma
PRRs	pattern recognition receptor
RAS	rat sarcoma
RHD	Rel-Homologie Domäne
RING	really interesting new gene
RIP	receptor interacting protein
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SCF	Skp1/Cullin1/F-box Protein
SDS	sodiumdodecylsulfate
SH3	Src homology 3
siRNA	small inhibitory RNA
SLP76	SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SSC	side scatter

TAB	TAK1-binding protein
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK	transforming growth factor- β - activated kinase
TCR	T cell receptor
Thy	thymus cell antigen
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor-necrosis factor
TNFR	TNF Rezeptor
TRAF	TNF receptor-associated factor
Trp	Tryptophan
U	unit
Ub	Ubiquitin
UBAP2L	ubiquitin associated protein 2 L
Ubc	ubiquitin conjugating enzyme
UBD	Ubiquitinbindungsdomäne
üN	über Nacht
USP	ubiquitin specific peptidase
wt	Wildtyp
Y2H	Yeast-Two-Hybrid Screen
ZAP70	zeta-associated protein kinase of 70 kDa
ZF	zinc-finger Domäne

9 Literaturverzeichnis

1. Sen, R. and D. Baltimore, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986. **46**(5): p. 705-16.
2. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh, Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6706-16.
3. Hayden, M.S. and S. Ghosh, Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
4. Gilmore, T.D., Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
5. Plaksin, D., P.A. Baeuerle, and L. Eisenbach, KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J Exp Med*, 1993. **177**(6): p. 1651-62.
6. Zhong, H., et al., The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*, 2002. **9**(3): p. 625-36.
7. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 225-60.
8. Mordmuller, B., et al., Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO Rep*, 2003. **4**(1): p. 82-7.
9. Solan, N.J., et al., RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem*, 2002. **277**(2): p. 1405-18.
10. Naumann, M., et al., NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors. *Oncogene*, 1993. **8**(8): p. 2275-81.
11. Fan, C.M. and T. Maniatis, Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, 1991. **354**(6352): p. 395-8.
12. Palombella, V.J., et al., The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, 1994. **78**(5): p. 773-85.
13. Xiao, G., E.W. Harhaj, and S.C. Sun, NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*, 2001. **7**(2): p. 401-9.
14. Wulczyn, F.G., M. Naumann, and C. Scheidereit, Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature*, 1992. **358**(6387): p. 597-9.
15. Lenardo, M. and U. Siebenlist, Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF-kappa B trans-activating factor. *Immunol Today*, 1994. **15**(4): p. 145-7.
16. Kitamura, H., et al., MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett*, 2000. **485**(1): p. 53-6.
17. Hacker, H. and M. Karin, Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*, 2006. **2006**(357): p. re13.
18. DiDonato, J., et al., Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(4): p. 1295-304.
19. Whiteside, S.T., et al., I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J*, 1997. **16**(6): p. 1413-26.
20. Brown, K., et al., Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*, 1995. **267**(5203): p. 1485-8.
21. Brockman, J.A., et al., Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(5): p. 2809-18.

22. Ben-Neriah, Y., Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol*, 2002. **3**(1): p. 20-6.
23. Scheidereit, C., IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6685-705.
24. Senftleben, U., et al., Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
25. Xiao, G., A. Fong, and S.C. Sun, Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, 2004. **279**(29): p. 30099-105.
26. Bonizzi, G. and M. Karin, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 2004. **25**(6): p. 280-8.
27. Perkins, N.D., Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(1): p. 49-62.
28. Pahl, H.L., Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
29. Neumann, M. and M. Naumann, Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J*, 2007. **21**(11): p. 2642-54.
30. Hershko, A. and A. Ciechanover, The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 425-79.
31. Pickart, C.M., Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 181-90.
32. Ikeda, F. and I. Dikic, Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep*, 2008. **9**(6): p. 536-42.
33. Weissman, A.M., Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(3): p. 169-78.
34. Chen, Z.J. and L.J. Sun, Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 2009. **33**(3): p. 275-86.
35. Chau, V., et al., A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, 1989. **243**(4898): p. 1576-83.
36. Hofmann, K. and P. Bucher, The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(5): p. 172-3.
37. Deng, L., et al., Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 351-61.
38. Krappmann, D. and C. Scheidereit, A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep*, 2005. **6**(4): p. 321-6.
39. Hofmann, R.M. and C.M. Pickart, Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 1999. **96**(5): p. 645-53.
40. Wang, C., et al., TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
41. Ishitani, T., et al., Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J*, 2003. **22**(23): p. 6277-88.
42. Ea, C.K., et al., Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*, 2006. **22**(2): p. 245-57.
43. Wu, C.J., et al., Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(4): p. 398-406.

44. Yamamoto, M., et al., Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol*, 2006. **7**(9): p. 962-70.
45. Tokunaga, F., et al., Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(2): p. 123-32.
46. Tang, E.D., et al., A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamm) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 2003. **278**(39): p. 37297-305.
47. Kanayama, A., et al., TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, 2004. **15**(4): p. 535-48.
48. Zhou, H., et al., Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*, 2004. **427**(6970): p. 167-71.
49. Yamamoto, M., et al., Cutting Edge: Pivotal function of Ubc13 in thymocyte TCR signaling. *J Immunol*, 2006. **177**(11): p. 7520-4.
50. Ni, C.Y., et al., Cutting edge: K63-linked polyubiquitination of NEMO modulates TLR signaling and inflammation in vivo. *J Immunol*, 2008. **180**(11): p. 7107-11.
51. Li, H., et al., Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13636-43.
52. Inoue, J., et al., Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res*, 2000. **254**(1): p. 14-24.
53. Meylan, E. and J. Tschopp, The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(3): p. 151-9.
54. Barton, G.M. and R. Medzhitov, Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1524-5.
55. Kopp, E. and R. Medzhitov, Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(4): p. 396-401.
56. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
57. Kawai, T. and S. Akira, TLR signaling. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(5): p. 816-25.
58. Aggarwal, B.B., Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 745-56.
59. Wajant, H., M. Grell, and P. Scheurich, TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1999. **10**(1): p. 15-26.
60. Festjens, N., et al., RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(3): p. 400-10.
61. Schulze-Luehrmann, J. and S. Ghosh, Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity*, 2006. **25**(5): p. 701-15.
62. Parkin, J. and B. Cohen, An overview of the immune system. *Lancet*, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
63. Dembic, Z., et al., Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature*, 1986. **320**(6059): p. 232-8.
64. Saito, T., et al., Specific antigen-Ia activation of transfected human T cells expressing murine Ti alpha beta-human T3 receptor complexes. *Nature*, 1987. **325**(7000): p. 125-30.
65. Sussman, J.J., et al., Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*, 1988. **52**(1): p. 85-95.
66. Gett, A.V., et al., T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 355-60.
67. Janeway, C.A., Jr., Travers P., Walport M., Shlomichik M.J., *Immunobiology - the immune system in health and disease*. sixth ed. 2005: Garland Science Publishing.

68. Kim, P.W., et al., A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science*, 2003. **301**(5640): p. 1725-8.
69. Zamoyska, R., CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol*, 1998. **10**(1): p. 82-7.
70. Singer, A. and R. Bosselut, CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision. *Adv Immunol*, 2004. **83**: p. 91-131.
71. Frauwirth, K.A. and C.B. Thompson, Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest*, 2002. **109**(3): p. 295-9.
72. Appleman, L.J. and V.A. Boussiotis, T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev*, 2003. **192**: p. 161-80.
73. Nurieva, R., et al., T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J*, 2006. **25**(11): p. 2623-33.
74. Schwartz, R.H., A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*, 1990. **248**(4961): p. 1349-56.
75. Rudd, C.E. and H. Schneider, Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(7): p. 544-56.
76. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(2): p. 116-26.
77. Watts, T.H., TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 23-68.
78. Lin, J., M.J. Miller, and A.S. Shaw, The c-SMAC: sorting it all out (or in). *J Cell Biol*, 2005. **170**(2): p. 177-82.
79. Pentcheva-Hoang, T., et al., B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 401-13.
80. Gringhuis, S.I., et al., C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*, 2007. **26**(5): p. 605-16.
81. Schmitz, M.L. and D. Krappmann, Controlling NF-kappaB activation in T cells by costimulatory receptors. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(5): p. 834-42.
82. Ferguson, S.E., et al., CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol*, 1996. **156**(12): p. 4576-81.
83. Wu, L.X., et al., CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway. *J Immunol*, 2005. **174**(1): p. 180-94.
84. Thomas, R.M., L. Gao, and A.D. Wells, Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4639-46.
85. Huse, M., et al., Spatial and temporal dynamics of T cell receptor signaling with a photoactivatable agonist. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 76-88.
86. Davis, M.M., et al., T cells as a self-referential, sensory organ. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 681-95.
87. Zhang, W., et al., LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, 1998. **92**(1): p. 83-92.
88. Costello, P.S., et al., The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 3035-40.
89. Herndon, T.M., et al., ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappa B activation in response to engagement of CD3 and CD28. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5654-64.

90. Bunnell, S.C., et al., Persistence of cooperatively stabilized signaling clusters drives T-cell activation. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(19): p. 7155-66.
91. Jordan, M.S., A.L. Singer, and G.A. Koretzky, Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol*, 2003. **4**(2): p. 110-6.
92. Isakov, N. and A. Altman, Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 761-94.
93. Kane, L.P., J. Lin, and A. Weiss, Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(3): p. 242-9.
94. Jain, J., C. Loh, and A. Rao, Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol*, 1995. **7**(3): p. 333-42.
95. Khoshnan, A., et al., The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *J Immunol*, 2000. **165**(4): p. 1743-54.
96. Zong, W.X., et al., The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*, 1999. **13**(4): p. 382-7.
97. Egawa, T., et al., Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF-kappa B activation and lymphocyte proliferation. *Curr Biol*, 2003. **13**(14): p. 1252-8.
98. Hara, H., et al., The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity*, 2003. **18**(6): p. 763-75.
99. Jun, J.E., et al., 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.
100. Pfeifhofer, C., et al., Protein kinase C theta affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med*, 2003. **197**(11): p. 1525-35.
101. Ruefli-Brasse, A.A., D.M. French, and V.M. Dixit, Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science*, 2003. **302**(5650): p. 1581-4.
102. Ruland, J., et al., Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell*, 2001. **104**(1): p. 33-42.
103. Ruland, J., et al., Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity*, 2003. **19**(5): p. 749-58.
104. Sun, Z., et al., PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*, 2000. **404**(6776): p. 402-7.
105. Baier, G., et al., Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J Biol Chem*, 1993. **268**(7): p. 4997-5004.
106. Meller, N., Y. Elitzur, and N. Isakov, Protein kinase C-theta (PKCtheta) distribution analysis in hematopoietic cells: proliferating T cells exhibit high proportions of PKCtheta in the particulate fraction. *Cell Immunol*, 1999. **193**(2): p. 185-93.
107. Monks, C.R., et al., Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
108. Bi, K., et al., Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol*, 2001. **2**(6): p. 556-63.
109. Huang, J., et al., CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(14): p. 9369-73.
110. Villalba, M., et al., Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. *J Cell Biol*, 2002. **157**(2): p. 253-63.

111. Bertin, J., et al., CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF-kappa B. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 11877-82.
112. Gaide, O., et al., Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation and NF-kappaB activation. *FEBS Lett*, 2001. **496**(2-3): p. 121-7.
113. Wang, D., et al., A requirement for CARMA1 in TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, 2002. **3**(9): p. 830-5. Epub 2002 Aug 5.
114. McAllister-Lucas, L.M., et al., Bimp1, a MAGUK family member linking protein kinase C activation to Bcl10-mediated NF-kappaB induction. *J Biol Chem*, 2001. **276**(33): p. 30589-97.
115. Pomerantz, J.L., E.M. Denny, and D. Baltimore, CARD11 mediates factor-specific activation of NF-kappaB by the T cell receptor complex. *Embo J*, 2002. **21**(19): p. 5184-94.
116. Gaide, O., et al., CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, 2002. **3**(9): p. 836-43.
117. Che, T., et al., MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 2004. **279**(16): p. 15870-6.
118. Tanner, M.J., et al., CARMA1 coiled-coil domain is involved in the oligomerization and subcellular localization of CARMA1 and is required for T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 2007. **282**(23): p. 17141-7.
119. Wang, D., et al., CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(1): p. 164-71.
120. Lee, K.Y., et al., PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation. *Science*, 2005. **308**(5718): p. 114-8.
121. Fanning, A.S. and J.M. Anderson, Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(4): p. 432-9.
122. Dimitratos, S.D., et al., Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays*, 1999. **21**(11): p. 912-21.
123. Ishiguro, K., et al., Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a modulator of CARMA1-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(14): p. 5497-508.
124. Zhang, Q., et al., Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, 1999. **22**(1): p. 63-8.
125. Willis, T.G., et al., Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*, 1999. **96**(1): p. 35-45.
126. Yan, M., et al., mE10, a novel caspase recruitment domain-containing proapoptotic molecule. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10287-92.
127. Costanzo, A., C. Guet, and P. Vito, c-E10 is a caspase-recruiting domain-containing protein that interacts with components of death receptors signaling pathway and activates nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*, 1999. **274**(29): p. 20127-32.
128. Koseki, T., et al., CIPER, a novel NF kappaB-activating protein containing a caspase recruitment domain with homology to Herpesvirus-2 protein E10. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 9955-61.
129. Wang, D., et al., 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.

130. Klemm, S., et al., 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.
131. Klemm, S., et al., 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.
132. Liu, Y., et al., Characterization of Bcl10 as a potential transcriptional activator that interacts with general transcription factor TFIIB. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **320**(1): p. 1-6.
133. Gross, O., et al., Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, 2006. **442**(7103): p. 651-6.
134. McAllister-Lucas, L.M., et al., CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF-kappaB activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(1): p. 139-44.
135. Srinivasula, S.M., et al., CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-kappaB activation and apoptosis. *J Biol Chem*, 1999. **274**(25): p. 17946-54.
136. Uren, A.G., et al., 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.
137. Lucas, P.C., et al., Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 19012-9.
138. Wegener, E., et al., Essential role for IkappaB kinase beta in remodeling Carma1-Bcl10-Malt1 complexes upon T cell activation. *Mol Cell*, 2006. **23**(1): p. 13-23.
139. Lobry, C., et al., Negative feedback loop in T cell activation through IkappaB kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(3): p. 908-13.
140. Ishiguro, K., et al., Bcl10 is phosphorylated on Ser138 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Immunol*, 2007. **44**(8): p. 2095-100.
141. Rueda, D., et al., Bcl10 controls TCR- and Fc gamma R-induced actin polymerization. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4373-84.
142. Akagi, T., et al., A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene*, 1999. **18**(42): p. 5785-94.
143. Morgan, J.A., et al., Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18. *Cancer Res*, 1999. **59**(24): p. 6205-13.
144. Ferch, U., et al., MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 984-91.
145. Hara, H., et al., 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.
146. Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschoopp, The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(5): p. 155-6.
147. Rebeaud, F., et al., The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 272-81.
148. Coornaert, B., et al., T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 263-71.

149. Sun, L., et al., The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell*, 2004. **14**(3): p. 289-301.
150. Oeckinghaus, A., et al., Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. *EMBO J*, 2007. **26**(22): p. 4634-45.
151. Noels, H., et al., A Novel TRAF6 binding site in MALT1 defines distinct mechanisms of NF-kappaB activation by API2middle dotMALT1 fusions. *J Biol Chem*, 2007. **282**(14): p. 10180-9.
152. Matsumoto, R., et al., Phosphorylation of CARMA1 Plays a Critical Role in T Cell Receptor-Mediated NF-kappaB Activation. *Immunity*, 2005. **23**: p. 575-585.
153. Sommer, K., et al., Phosphorylation of the CARMA1 Linker Controls NF-kappaB Activation. *Immunity*, 2005. **23**: p. 561-74.
154. Wan, Y.Y., et al., The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat Immunol*, 2006. **7**(8): p. 851-8.
155. Wu, C.J. and J.D. Ashwell, NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 3023-8.
156. Ruefli-Brasse, A.A., et al., Rip2 participates in Bcl10 signaling and T-cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 2004. **279**(2): p. 1570-4.
157. Zeng, H., et al., Phosphorylation of Bcl10 negatively regulates T cell receptor-mediated NF- $\{kappa\}$ B activation. *Mol Cell Biol*, 2007.
158. Scharschmidt, E., et al., Degradation of Bcl10 induced by T-cell activation negatively regulates NF-kappa B signaling. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(9): p. 3860-73.
159. Hu, S., et al., cIAP2 is a ubiquitin protein ligase for BCL10 and is dysregulated in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *J Clin Invest*, 2006. **116**(1): p. 174-81.
160. Stilo, R., et al., A20 is a negative regulator of BCL10- and CARMA3-mediated activation of NF-kappaB. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 8): p. 1165-71.
161. Snipas, S.J., et al., Characteristics of the caspase-like catalytic domain of human paracaspase. *Biol Chem*, 2004. **385**(11): p. 1093-8.
162. Vercammen, D., et al., Are metacaspases caspases? *J Cell Biol*, 2007. **179**(3): p. 375-80.
163. Heyninck, K. and R. Beyaert, A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(1): p. 1-4.
164. Isaacson, P.G. and M.Q. Du, MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(8): p. 644-53.
165. Ye, H., et al., High incidence of t(11;18)(q21;q21) in Helicobacter pylori-negative gastric MALT lymphoma. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2547-50.
166. Dierlamm, J., et al., The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*, 1999. **93**(11): p. 3601-9.
167. Zhou, H., M.Q. Du, and V.M. Dixit, 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.
168. Streubel, B., et al., T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood*, 2003. **101**(6): p. 2335-9.
169. Nakagawa, M., et al., MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10. *Blood*, 2005. **106**(13): p. 4210-6.
170. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*, 1997. **89**(11): p. 3909-18.

171. Davis, R.E., et al., Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*, 2001. **194**(12): p. 1861-74.
172. Ngo, V.N., et al., A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*, 2006. **441**(7089): p. 106-10.
173. Lenz, G., et al., Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*, 2008. **319**(5870): p. 1676-9.
174. Cope, G.A. and R.J. Deshaies, COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*, 2003. **114**(6): p. 663-71.
175. Wolf, D.A., C. Zhou, and S. Wee, The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(12): p. 1029-33.
176. Chamovitz, D.A., et al., The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*, 1996. **86**(1): p. 115-21.
177. Wei, N., D.A. Chamovitz, and X.W. Deng, Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, 1994. **78**(1): p. 117-24.
178. Wei, N. and X.W. Deng, Characterization and purification of the mammalian COP9 complex, a conserved nuclear regulator initially identified as a repressor of photomorphogenesis in higher plants. *Photochem Photobiol*, 1998. **68**(2): p. 237-41.
179. Seeger, M., et al., A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J*, 1998. **12**(6): p. 469-78.
180. Glickman, M.H., et al., A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 1998. **94**(5): p. 615-23.
181. Damoc, E., et al., Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2007. **6**(7): p. 1135-46.
182. Hinnebusch, A.G., eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(10): p. 553-62.
183. Tomoda, K., et al., Multiple functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 43013-8.
184. Lykke-Andersen, K., et al., Disruption of the COP9 signalosome Csn2 subunit in mice causes deficient cell proliferation, accumulation of p53 and cyclin E, and early embryonic death. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(19): p. 6790-7.
185. Yoneda-Kato, N., et al., Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *EMBO J*, 2005. **24**(9): p. 1739-49.
186. Kwok, S.F., et al., Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell*, 1998. **10**(11): p. 1779-90.
187. Fukumoto, A., et al., Small Jab1-containing subcomplex is regulated in an anchorage- and cell cycle-dependent manner, which is abrogated by ras transformation. *FEBS Lett*, 2005. **579**(5): p. 1047-54.
188. Bech-Otschir, D., M. Seeger, and W. Dubiel, The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 3): p. 467-73.
189. Schwechheimer, C., The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1695**(1-3): p. 45-54.

190. Cope, G.A., et al., Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, 2002. **298**(5593): p. 608-11.
191. Rabut, G. and M. Peter, Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*, 2008. **9**(10): p. 969-76.
192. Lyapina, S., et al., Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, 2001. **292**(5520): p. 1382-5.
193. Wu, J.T., et al., Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(10): p. 1014-20.
194. Bosu, D.R. and E.T. Kipreos, Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div*, 2008. **3**: p. 7.
195. Ohh, M., et al., An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep*, 2002. **3**(2): p. 177-82.
196. Furukawa, M., et al., The CUL1 C-terminal sequence and ROC1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(21): p. 8185-97.
197. Sun, Y., M.P. Wilson, and P.W. Majerus, Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *J Biol Chem*, 2002. **277**(48): p. 45759-64.
198. Uhle, S., et al., Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J*, 2003. **22**(6): p. 1302-12.
199. Naumann, M., et al., COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem*, 1999. **274**(50): p. 35297-300.
200. Bech-Otschir, D., et al., COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J*, 2001. **20**(7): p. 1630-9.
201. Oh, W., et al., Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2. *J Biol Chem*, 2006. **281**(25): p. 17457-65.
202. Tomoda, K., et al., The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem*, 2002. **277**(3): p. 2302-10.
203. Hetfeld, B.K., et al., The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol*, 2005. **15**(13): p. 1217-21.
204. Schweitzer, K., et al., CSN controls NF-kappaB by deubiquitinylation of IkkappaBalpha. *EMBO J*, 2007. **26**(6): p. 1532-41.
205. Patil, M.A., et al., Array-based comparative genomic hybridization reveals recurrent chromosomal aberrations and Jab1 as a potential target for 8q gain in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(12): p. 2050-7.
206. Esteva, F.J., et al., Jun activation domain binding protein 1 expression is associated with low p27(Kip1) levels in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(15): p. 5652-9.
207. Adler, A.S., et al., CSN5 isopeptidase activity links COP9 signalosome activation to breast cancer progression. *Cancer Res*, 2008. **68**(2): p. 506-15.
208. Menon, S., et al., COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nat Immunol*, 2007. **8**(11): p. 1236-45.
209. Perez, O.D., et al., Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol*, 2003. **4**(11): p. 1083-92.
210. Panattoni, M., et al., Targeted inactivation of the COP9 signalosome impairs multiple stages of T cell development. *J Exp Med*, 2008. **205**(2): p. 465-77.

211. Bianchi, E., et al., Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 617-21.
212. Thome, M. and R. Weil, Post-translational modifications regulate distinct functions of CARMA1 and BCL10. *Trends Immunol*, 2007. **28**(6): p. 281-8.
213. Van Crielinge, W. and R. Beyaert, Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online*, 1999. **2**: p. 1-38.
214. da Silva Correia, J., et al., The subunit CSN6 of the COP9 signalosome is cleaved during apoptosis. *J Biol Chem*, 2007. **282**(17): p. 12557-65.
215. Miyauchi, Y., et al., The COP9/signalosome increases the efficiency of von Hippel-Lindau protein ubiquitin ligase-mediated hypoxia-inducible factor-alpha ubiquitination. *J Biol Chem*, 2008. **283**(24): p. 16622-31.
216. Schwechheimer, C., et al., Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science*, 2001. **292**(5520): p. 1379-82.
217. Sommer, K., et al., Phosphorylation of the CARMA1 Linker Controls NF-kappaB Activation. *Immunity*, 2005. **23**(6): p. 561-74.
218. Hu, S., et al., CIAP2 inhibits antigen receptor signaling by targeting Bcl10 for degradation. *Cell Cycle*, 2006. **5**(13): p. 1438-42.
219. Welteke, V., Eitelhuber, A., Dewel, M., Schweitzer, K., Naumann, M. and Krappmann, D., COP9 signalosome controls the Carma1-Bcl10-Malt1 complex upon T cell stimulation. *EMBO Rep*, 2009. **akzeptiert**.
220. Richardson, K.S. and W. Zundel, The emerging role of the COP9 signalosome in cancer. *Mol Cancer Res*, 2005. **3**(12): p. 645-53.
221. Tomoda, K., et al., The Jab1/COP9 signalosome subcomplex is a downstream mediator of Bcr-Abl kinase activity and facilitates cell-cycle progression. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 775-83.
222. Cooper, E.M., et al., K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1. *EMBO J*, 2009. **28**(6): p. 621-31.
223. Winston, J.T., et al., The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev*, 1999. **13**(3): p. 270-83.
224. Li, L. and X.W. Deng, The COP9 signalosome: an alternative lid for the 26S proteasome? *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(10): p. 507-9.
225. Huang, X., et al., Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. *FEBS J*, 2005. **272**(15): p. 3909-17.
226. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1542-52.
227. Dice, J.F., Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 2007. **3**(4): p. 295-9.
228. Raiborg, C. and H. Stenmark, The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 2009. **458**(7237): p. 445-52.
229. Vince, J.E., et al., TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol*, 2008. **182**(1): p. 171-84.
230. Li, L., et al., The zinc finger protein A20 targets TRAF2 to the lysosomes for degradation. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(2): p. 346-53.
231. Thome, M., CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(5): p. 348-59.
232. Cummings, R., et al., Protein kinase Cdelta mediates lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem*, 2004. **279**(39): p. 41085-94.

233. Shahrestanifar, M., X. Fan, and D.R. Manning, Lysophosphatidic acid activates NF-kappaB in fibroblasts. A requirement for multiple inputs. *J Biol Chem*, 1999. **274**(6): p. 3828-33.
234. Duewel, M., Welteke, V., Oeckinghaus, A., Beans, M., Kloo, B., Ferch, U., Darnay, B.G., Ruland, J., Marynen, P. and Krappmann, D, A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-κB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *J Immunol*, 2009. **akzeptiert**.
235. Johnson, J.M., et al., Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, 2003. **302**(5653): p. 2141-4.
236. Modrek, B. and C. Lee, A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet*, 2002. **30**(1): p. 13-9.
237. Ip, J.Y., et al., Global analysis of alternative splicing during T-cell activation. *RNA*, 2007. **13**(4): p. 563-72.
238. Jost, P.J. and J. Ruland, Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 2700-7.
239. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990. **96**(1): p. 23-8.
240. Isakov, N. and A. Altman, Tumor promoters in conjunction with calcium ionophores mimic antigenic stimulation by reactivation of alloantigen-primed murine T lymphocytes. *J Immunol*, 1985. **135**(6): p. 3674-80.
241. Truneh, A., et al., Calcium ionophore plus phorbol ester can substitute for antigen in the induction of cytolytic T lymphocytes from specifically primed precursors. *J Immunol*, 1985. **135**(4): p. 2262-7.

10 Appendix

10.1 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind Teil folgender Publikationen:

Welteke V., Eitelhuber A., Duewel M., Schweitzer K., Naumann M. and Krappmann D. (2009) COP9 signalosome controls the Carma1-Bcl10-Malt1 complex upon T cell stimulation. Manuskript akzeptiert bei EMBO Reports

Duewel M., Welteke V., Oeckinghaus A., Beans M., Kloo B., Ferch U., Darnay B.G., Ruland J., Marynen P. and Krappmann D. (2009) A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF- κ B by cleaving Malt1 ubiquitin chains. Manuskript akzeptiert bei The Journal of Immunology

Weitere Publikationen im Verlauf dieser Doktorarbeit:

Oeckinghaus A., Wegener E., Welteke V., Ferch U., Col Arslan S., Ruland J., Scheidereit C., and Krappmann D. (2007) Malt1 Ubiquitination Triggers NF- κ B Signaling upon T cell Activation. The EMBO Journal 26(22):4634-45

10.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Verena Welteke

Geburtsdatum: 10.06.1981

Geburtsort: Bad Arolsen

Wissenschaftlicher Werdegang

- Seit 01/2006 Promotion
im Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für
Gesundheit und Umwelt in der Abteilung Zelluläre Signalintegration
von Dr. Daniel Krappmann
Dissertation: Funktion von Malt1 in der Antigenrezeptor-induzierten
NF- κ B Aktivierung in T-Lymphozyten
- 10/2000 – 10/2005 Studium Biologie
an der Philipps-Universität Marburg mit Schwerpunkten Genetik,
Virologie und Mikrobiologie.
Diplomarbeit: Untersuchung des Aktinzytoskeletts in *Ustilago maydis*
(Prof. Michael Bölker Philipps-Universität Marburg, Fachbereich
Biologie, Genetik).

Schulbildung

1991 – 2000 Christian-Rauch-Schule Bad Arolsen

1987 – 1991 Grundschule Bad Arolsen-Helsen

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben!

Daniel Krappmann

Alle Gutachter und Prüfer

Abteilung Zelluläre Signalintegration:

Andrea Eitelhuber, Bernhard Kloo, Daniel Nagel, Kamyar Hadian, Katrin Demski, Michael Düwel, Richard Griesbach

Andrea Oeckinghaus, Elmar Wegener, Evelyn Neve, Carmen Spiller

Uta Ferch, Jürgen Ruland, Katrin Schweitzer, Michael Naumann

Irene, Karl-Walter und Stefan Welteke

Holger Penning

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Erklärung

Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden. Ich erkläre weiterhin, dass ich nicht bereits anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, 19. Mai 2009

Verena Welteke