

# **Modulierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in T-Zellen durch den Carma1-Bcl10-Malt1 Komplex**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Promotionsfach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Chemiker

Elmar Wegener

geboren am 21. August 1974 in Hildesheim

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:

1. PD Dr. Daniel Krappmann
2. Prof. Dr. Claus Scheidereit
3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

eingereicht am: 17.01.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2006

## **Kurzfassung**

Das Schicksal aktivierter T-Zellen wird durch eine Vielzahl NF- $\kappa$ B regulierter Ziel-Gene bestimmt, wobei aktivierende und deaktivierende Signale für die Ausbalancierung einer adäquaten T-Zell Antwort benötigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die negativ-regulatorische Modulation des Carma1-Bcl10-Malt1 (CBM)-Proteinkomplexes für die Steuerung der NF- $\kappa$ B Aktivität in T-Zellen von großer Bedeutung ist. Überraschenderweise ist die Bildung des CBM-Komplexes abhängig von IKK $\beta$ , einer Kinase, die zuvor ausschließlich mit CBM-nachgelagerten Effektorfunktionen in Verbindung gebracht wurde. IKK $\beta$  übernimmt eine duale Funktion bei der Regulation des CBM-Komplexes: Obwohl IKK $\beta$  zunächst für die Bildung des CBM-Komplexes benötigt wird, führt die Phosphorylierung der CBM-Komplexkomponente Bcl10 durch IKK $\beta$  bereits kurze Zeit nach Beginn der T-Zell Aktivierung zu einer Dämpfung der Signalübertragung. Biochemische Analysen zeigen, dass die Phosphorylierung von Bcl10 die Proteinaffinitäten innerhalb des CBM-Komplexes beeinflusst, wodurch es zu einer Umlagerung des Komplexes mit negativ-regulatorischem Effekt kommt. Weiterführende Experimente haben aufgedeckt, dass Bcl10 im Zuge anhaltender T-Zell Stimulation lysosomal degradiert wird. Die Degradation von Bcl10 führt zum Zerfall des CBM-Komplexes und unterbindet die weitere Signalübertragung trotz persistenter Stimulation. Die Tatsache, dass beide in dieser Arbeit identifizierten negativ-regulatorischen Mechanismen am CBM-Komplex angreifen, unterstreicht die Bedeutung dieses Komplexes für die Signalübertragung in T-Zellen. Weiterhin besteht aufgrund der präsentierten Daten Anlass zur Annahme, dass in aktivierten T-Zellen ein vielfältig positiv und negativ regulierter Multikomponentenkomplex gebildet wird, der eine nicht-hierarchische Signalübertragung unterstützt.

Schlagworte: T-Zell Aktivierung, CBM-Komplex, Phosphorylierung, lysosomale Degradation

## **Abstract**

A multitude of NF- $\kappa$ B regulated target genes determines the fate of activated T cells, whereas activating and de-activating signals are crucial for balancing adequate T cell responses. The presented data illustrate that negative-regulatory modulation of the Carma1-Bcl10-Malt1 (CBM)-complex is of great importance for the control of NF- $\kappa$ B activity in T cells. Surprisingly IKK $\beta$ , a kinase that so far was thought to be involved in CBM-downstream effector functions, is needed for CBM-complex formation. IKK $\beta$  exhibits a dual function regulating the CBM-complex: while initially being essential for the formation of the CBM-complex, phosphorylation of the CBM-complex component Bcl10 by IKK $\beta$  shortly after the onset of T cell activation leads to a damping of signal transduction. Biochemical analysis reveal that Bcl10 phosphorylation influences the intermolecular protein affinities of the CBM-complex components causing a remodeling of the complex with a negative-regulatory effect. Further experiments uncover that upon persistent T cell activation Bcl10 is degraded by the lysosome. Bcl10 degradation promotes the collapse of the CBM-complex and thereby interferes with ongoing signal transduction despite persistent stimulation. Considering the fact that both negative-regulatory processes affect CBM-complex activity underscores the important role of this complex in T cell signal transduction. Moreover, the presented data demonstrate that formation of a multi-component signaling complex in activated T cells facilitates versatile positive, negative and non-hierarchical regulation.

Keywords: T cell activation, CBM complex, phosphorylation, lysosomal degradation

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbstständig unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt.

Berlin, 17.01.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Molekulare Grundlagen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	5
1.1.1	Die NF- $\kappa$ B-Familie.....	5
1.1.2	Der Mechanismus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.....	7
1.1.3	Der IKK-Komplex .....	9
1.2	Die Rolle von NF- $\kappa$ B bei der Steuerung der angeborenen Immunantwort ....	10
1.2.1	Die proinflammatorische Wirkung von NF- $\kappa$ B.....	10
1.2.2	Mechanismus der TLR, IL-1- und TNF $\alpha$ -vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung ...	11
1.3	Die Rolle von NF- $\kappa$ B bei der Steuerung der erworbenen Immunantwort.....	14
1.3.1	Grundlagen der T-Zell Antwort .....	14
1.3.1.1	Aktivierung von T-Zellen .....	14
1.3.1.2	Der T-Zell/APC Kontakt.....	15
1.3.1.3	Kostimulation und Anergie.....	16
1.3.1.4	Beeinflussung des Schwellenwerts der T-Zell Aktivierung durch Kostimulation .....	17
1.3.1.5	Die Immunologische Synapse .....	18
1.3.2	PKC $\theta$ -vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in T-Zellen.....	19
1.3.2.1	Die Funktion von PKC $\theta$ .....	20
1.3.2.2	Der Mechanismus der Aktivierung von PKC $\theta$ .....	21
1.3.3	Carma1, Bcl10 und Malt1, essentielle Regulatoren der Antigenrezeptor- vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	22
1.3.3.1	Carma1 .....	22
1.3.3.2	Bcl10.....	23
1.3.3.3	Malt1 .....	24
1.3.3.4	Die Funktion von Carma1, Bcl10 und Malt1 bei der Aktivierung des IKK- Komplexes .....	26
1.4	Zielsetzung .....	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1	Geräte und Zubehör .....	29
2.2	Chemikalien.....	30
2.3	Enzyme und Kits .....	32

2.4	Bakterien .....	32
2.5	Eukaryontische Zelllinien .....	33
2.6	Vektoren und Oligonukleotide.....	33
2.7	Antikörper .....	37
2.8	Rekombinante Proteine .....	38
2.9	Puffer und Lösungen.....	39
2.10	Zellbiologische Methoden.....	40
2.10.1	Kultur adhärenter Zellen.....	40
2.10.2	Suspensionskultur von Jurkat T-Zellen.....	41
2.10.3	Aufreinigung und Kultur primärer Suspensionszellen .....	41
2.10.4	Lagerung des Zellvorrats .....	43
2.10.5	Zellstimulation.....	43
2.10.6	Transiente Transfektion .....	45
2.10.7	Präparation von Zellextrakten.....	47
2.11	Nukleinsäuretechniken .....	47
2.11.1	PCR.....	47
2.11.2	PCR-basierte Mutagenese.....	48
2.11.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	49
2.11.4	Restriktionspaltung.....	49
2.11.5	Ligation und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	50
2.11.6	Bakterien-Übernachtskultur .....	50
2.11.7	Herstellung kompetenter Bakterien.....	50
2.11.8	Transformation kompetenter Bakterien.....	51
2.11.9	DNA-Aufreinigung.....	51
2.11.10	Hybridisierung von Oligonukleotiden .....	52
2.11.11	Radioaktive Markierung von DNA-Enden .....	52
2.11.12	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	53
2.11.13	Kapillar-Sequenzierung von DNA .....	53
2.12	Proteinchemische und immunologische Methoden .....	54
2.12.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	54
2.12.2	SDS-PAGE.....	54
2.12.3	Coomassie-Färbung .....	54
2.12.4	Western Blot .....	55
2.12.5	Immunologischer Proteinnachweis.....	55
2.12.6	Bakterielle Expression rekombinanter Proteine .....	55

2.12.7	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	56
2.12.8	Immunopräzipitationen.....	56
2.12.9	Nachweis Ubiquitin-konjugierter Proteine.....	57
2.12.10	<i>In vitro</i> Kinasereaktionen.....	57
2.12.11	Gelretardationsexperiment.....	58
2.12.12	Färbung von Oberflächenproteinen.....	58
2.12.13	Intrazelluläre Proteinfärbung.....	59
2.12.14	Konfokal-Mikroskopie.....	59
2.12.15	Retrovirale Infektion Bcl10-defizienter CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	59
2.12.16	Messung intrazellulärer Zytokin-Produktion Bcl10-defizienter CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>64</b>
3.1	Regulierung der CBM-Komplexaktivität durch IKK $\beta$ und Phosphorylierung von Bcl10.....	64
3.1.1	CBM-Komplexbildung nach T-Zell Aktivierung.....	64
3.1.2	Die Bildung des CBM-Komplexes ist abhängig von IKK $\beta$ -Kinaseaktivität....	66
3.1.3	IKK $\beta$ -Inaktivierung durch RNAi blockiert die Bildung des CBM-Komplexes... .....	68
3.1.4	IKK $\beta$ phosphoryliert Bcl10 im C-Terminus.....	73
3.1.5	C-terminale Bcl10-Phosphorylierung ist keine Voraussetzung für primäre NF- $\kappa$ B-Aktivierung.....	79
3.1.6	C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 reguliert Bindungsaffinitäten innerhalb des CBM-Komplexes.....	81
3.1.7	C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 schwächt T-Zell Aktivierung.....	83
3.2	Regulierung der CBM-Komplexaktivität durch Degradation von Bcl10.....	86
3.2.1	Lysosomale Degradation von Bcl10 nach T-Zell Aktivierung.....	86
3.2.2	Bcl10-Phosphorylierung ist kein Signal für anschließende Bcl10-Degradation.. .....	89
3.2.3	Bcl10-Ubiquitinierung durch die HECT E3-Ubiquitin-Ligasen Itch und Nedd4 .....	91
3.2.4	Charakterisierung der Bcl10-Ubiquitinierung.....	93
3.2.5	Inaktivierung von Nedd4 und Itch durch RNAi stabilisiert Bcl10.....	96
3.2.6	Die Degradation von Bcl10 dient der Deaktivierung TCR-vermittelter NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion.....	98
3.2.7	Jnk induziert Bcl10-Degradation.....	99
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>101</b>
4.1	IKK $\beta$ Funktion bei der CBM-Komplexbildung.....	101

4.2	Der Zusammenhang zwischen CBM-Komplexbildung und Phosphorylierung von Bcl10 .....	103
4.3	IKK $\beta$ -Funktion bei der Phosphorylierung von Bcl10 .....	104
4.4	IKK $\beta$ phosphoryliert Bcl10 im C-Terminus .....	105
4.5	Umbau und negative Regulation des CBM-Komplexes durch Bcl10-Phosphorylierung .....	106
4.6	Bcl10-Degradation durch HECT E3-Ligasen.....	109
4.7	Der lysosomale Abbauweg.....	111
4.8	Der Einfluss von Jnk auf die Stabilität von Bcl10 .....	113
4.9	Reprimierende Regulationsmechanismen nach T-Zell Aktivierung .....	115
4.10	Ausblick.....	117
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>139</b>
8.1	Publikationen .....	139
8.2	Lebenslauf.....	140
8.3	Danksagung .....	141

## **1 Einleitung**

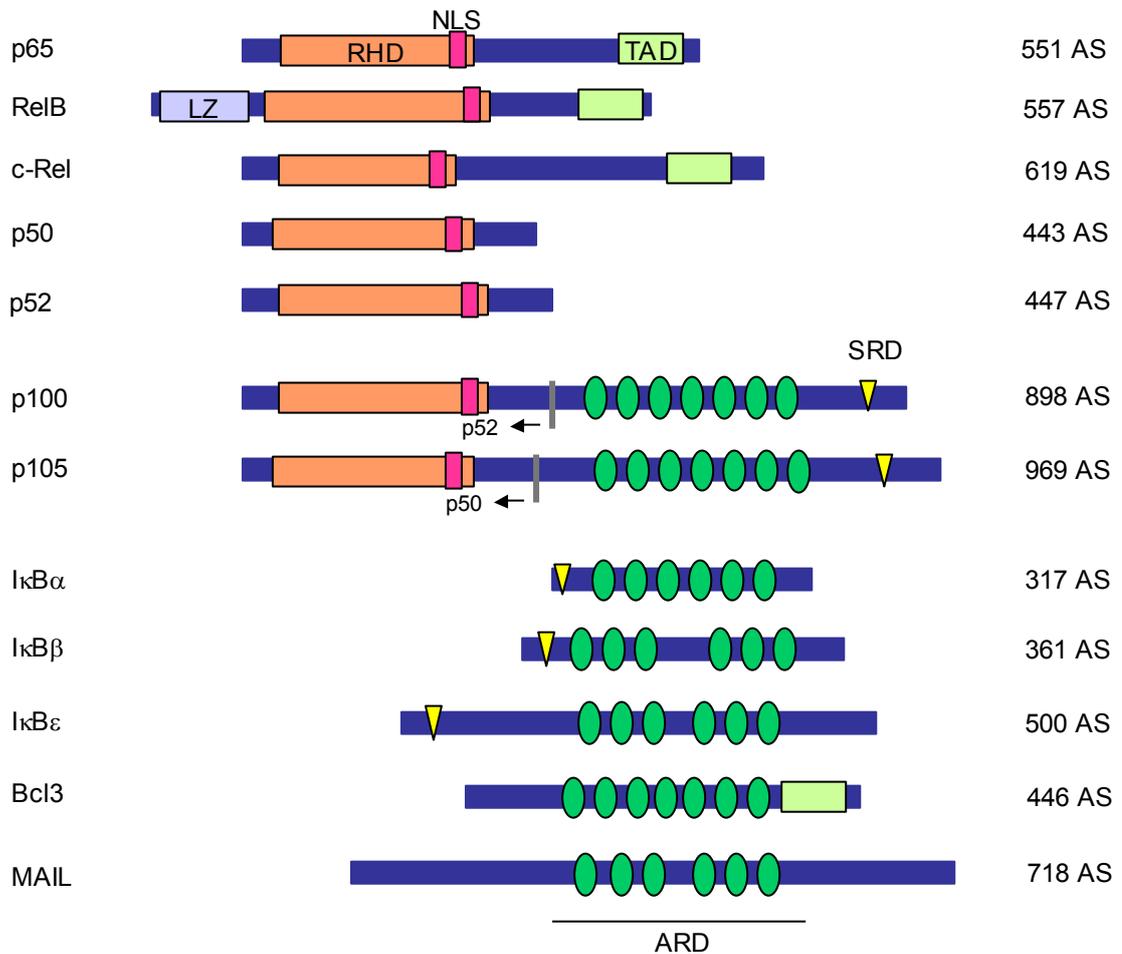
Pathogene werden von einem Organismus als fremd erkannt und durch das Immunsystem effizient bekämpft. Zur Einleitung der Immunantwort exprimieren Immunzellen Pathogen-aktivierbare Oberflächenrezeptoren, die das zellexterne Signal über zahlreiche zytosolische Regulationsstufen an eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren weitergeben. Diese aktivieren im Zellkern ein breites Spektrum von Zielgenen und befähigen dadurch den Organismus zu einer gezielten Abwehrreaktion. Einer der Signal-induzierbaren Transkriptionsfaktoren, NF- $\kappa$ B („Nuclear Factor  $\kappa$ B“), spielt bei den Prozessen zur Steuerung der Immunantwort eine zentrale Rolle. Rezeptor-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zur Transkription einer großen Zahl unterschiedlicher Zielgene wie Zytokine, Chemokine, Adhisionsmoleküle, Akute-Phase Proteine und anderer induzierbarer Effektorenzyme. Viele der Zielgene selbst übernehmen bei der Immunantwort wichtige Funktionen, da sie die Migration, Maturation und Proliferation von Immunzellen regulieren [Ghosh et al, 1998].

Fehlregulation der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade kann zu chronischen Entzündungen wie Arthritis, Asthma oder anderen Autoimmunkrankheiten führen. Weiterhin wurde unkontrollierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit der Entstehung von Neoplasien in Verbindung gebracht. Vor dem Hintergrund therapeutischer Strategien zur Bekämpfung dieser Krankheiten besteht Interesse an der detaillierten Aufklärung der komplexen Regulationsmechanismen, die zur Modulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität in Immunzellen beitragen.

### **1.1 Molekulare Grundlagen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

#### **1.1.1 Die NF- $\kappa$ B-Familie**

Die Familie der NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren wird von fünf strukturell verwandten Proteinen in Säugern gebildet, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p105/p50) und NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), deren gemeinsames strukturelles Merkmal die N-terminale „Rel Homology“-Domäne (RHD) ist (Abbildung 1.1). Über dieses Multifunktionsmotif können die unterschiedlichen Faktoren Homo- und Heterodimere bilden und im Zellkern an spezifische Promotor-Sequenzen von Zielgenen binden [May und Ghosh, 1998].



**Abbildung 1.1 Übersicht zur Familie der NF-κB/IκB Proteinfamilie.** Charakteristisches Merkmal der NF-κB Transkriptionsfaktoren ist die „Rel Homology“-Domäne (RHD), welche für DNA-Bindung und Dimerisierung der Rel-Faktoren untereinander verantwortlich ist. Die Transaktivierungsdomäne (TAD) wird für die Aktivierung der Transkription nach DNA-Bindung benötigt. Die inhibitorischen IκB-Proteine binden über die „Ankyrin Repeat“-Domäne (ARD) an den C-terminalen Teil der RHD und verhindern den Kernimport der Rel-Faktoren durch Maskierung des Kernlokalisierungssignals. Innerhalb der „Signal Response“-Domäne (SRD) liegen Phosphoakzeptorstellen, die für die IκB-basierte Regulation von NF-κB von essentieller Bedeutung sind. p100 und p105 bilden Vorläufermoleküle, die proteolytisch zu p50 und p52 prozessiert werden. Wichtige zytosolische IκBs sind IκBα, IκBβ und IκBε, bei MAIL und Bcl3 handelt es sich um nukleäre IκBs.

In der Regel reicht für Transkriptionsaktivierung durch NF-κB die DNA („Desoxyribonucleic Acid“)-Bindung eines Dimers allein nicht aus. Einer der beteiligten Faktoren muss zusätzlich eine Transaktivierungsdomäne (TAD) besitzen, die nur p65, RelB und c-Rel im C-terminalen Bereich aufweisen [Hannink und Temin, 1989]. Daher zeigen ausschließlich Dimere mit

einem dieser drei Faktoren transkriptionelle Aktivität [Bull et al, 1994; Schmitz et al 1994]. p50 und p52 hingegen wirken als Homodimere inhibitorisch, als Heterodimer mit p65, RelB oder c-Rel wiederum bilden sie potente Transkriptionsaktivatoren [Plaksin D, 1993].

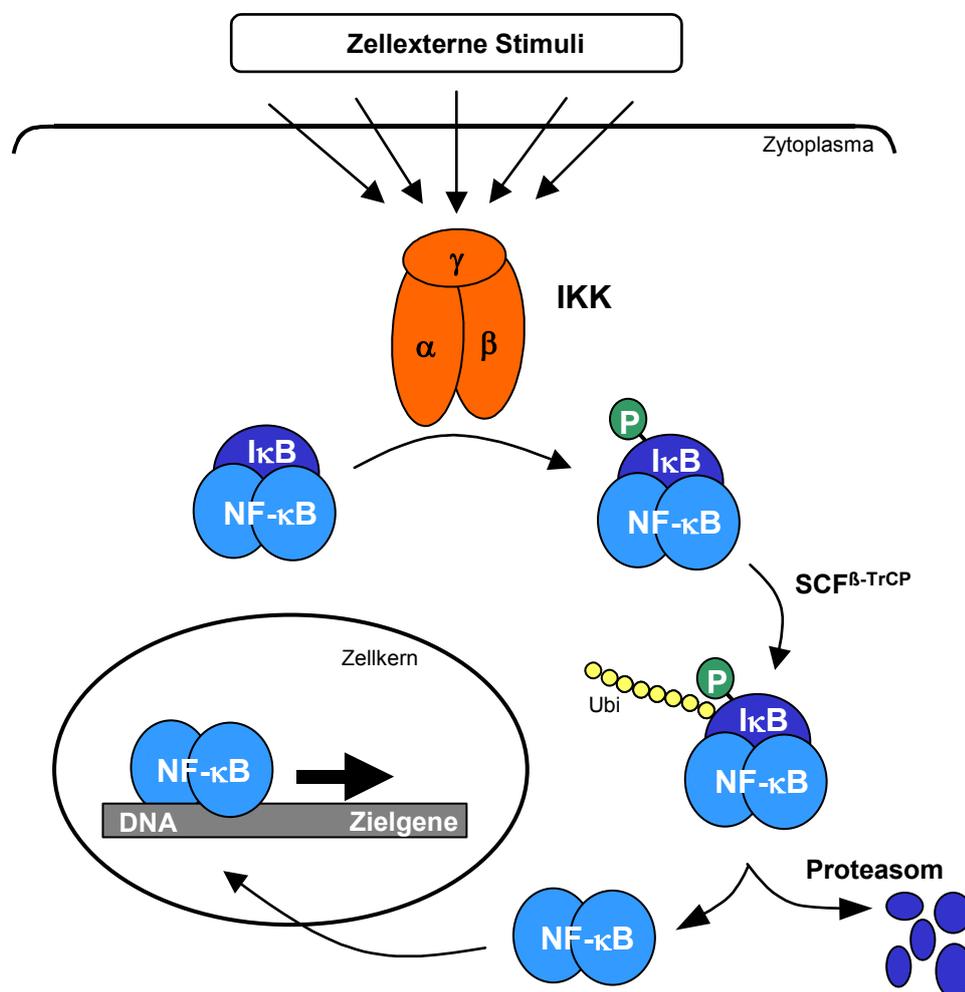
Die „Ankyrin Repeat“-Domäne ist das gemeinsame Merkmal der NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteine, den I $\kappa$ Bs („Inhibitors of NF- $\kappa$ B“, I $\kappa$ Bs). Diese interagieren über die ARD mit der RHD der NF- $\kappa$ B. Durch die Wechselwirkung wird der Kerneintritt von NF- $\kappa$ B reguliert, da die I $\kappa$ Bs neben des DNA-bindenden Bereichs auch die Kernlokalisierungssequenz der RHD maskieren [Hatada et al, 1993; Siebenlist et al, 1994]. Die wichtigsten Inhibitorproteine stellen die zytosolischen I $\kappa$ Bs I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  dar. Im Zellkern greifen zusätzlich die nukleären I $\kappa$ Bs MAIL („Molecule Possessing Ankyrin Repeats Induced By Lipopolysaccharide“) und Bcl3 („B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia/Lymphoma Associated 3“) in die Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität ein [Haskill et al, 1991; Wulczyn et al, 1992; Zhang et al, 1994; Thompson et al, 1995; Whiteside et al, 1997; Kitamura et al, 2000]. Bei p100 und p105 handelt es sich um Vorläufermoleküle, die N-terminale RHD und C-terminale ARD in einem Protein vereinen und proteolytisch zu p50 und p52 prozessiert werden [Fan und Maniatis, 1991; Palombella et al, 1994; Betts et al, 1996; Xiao et al, 2001; Mordmüller et al, 2003].

### **1.1.2 Der Mechanismus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

In Säugerzellen führt die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges in der Regel zur Zielgen-Regulation durch p65/p50- oder c-Rel/p50-Heterodimere. In Abwesenheit externer Stimuli befindet sich der Hauptteil der NF- $\kappa$ B-Dimere gebunden von I $\kappa$ Bs inaktiv im Zytoplasma (Abbildung 1.2) [Baldwin, 1996]. Nach zellulärer Stimulation phosphoryliert ein hochmolekularer, aus mehreren Untereinheiten bestehender Proteinkomplex, der I $\kappa$ B-Kinasekomplex (IKK), die I $\kappa$ Bs [Brockman et al, 1995; Brown et al, 1995]. Die Phosphorylierung wiederum dient als Signal zur Polyubiquitinierung der I $\kappa$ Bs durch die E3-Ubiquitin-Ligase SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> („Skp1/Cul1/F-Box-Protein“, „ $\beta$ -Transducin Repeat Containing Protein“) und zieht deren proteosomalen Abbau nach sich [Rodriguez et al, 1996; Yaron A et al, 1998; Spencer et al, 1999]. Hierdurch wird die Kernlokalisierungssequenz von NF- $\kappa$ B zugänglich und transkriptionsaktive Heterodimere translozieren in den Zellkern, um dort spezifische Zielgene zu aktivieren. Die Tatsache, dass bei kanonischer Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf einen ruhenden zytoplasmatischen Proteinvorrat zurückgegriffen und keine *de novo*

Proteinsynthese benötigt wird, ermöglicht eine extrem schnelle Übertragung extrazellulärer Information.

Kürzlich wurde ein alternativer Signalweg zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B identifiziert, der durch Signal-induzierte Prozessierung von p100 die Bildung transkriptionsaktiver RelB/p52-Heterodimere bewirkt und wichtige Funktionen bei längerfristigen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen ausübt [Senftleben et al, 2001; Bonizzi et al, 2004; Bonizzi und Karin, 2004]. Allerdings spielt der alternative Signalweg aufgrund verzögerter Kinetik in dieser Arbeit keine Rolle, sodass im Folgenden ausschließlich auf kanonische Signalübertragung Bezug genommen wird.



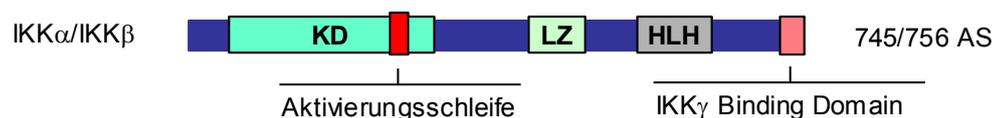
**Abbildung 1.2 Mechanismus der kanonischen Signal-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung.** Schematische Abbildung zur Verdeutlichung der zentralen Rolle des IKK-Komplexes bei der kanonischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli führt zur Aktivierung dieses zytoplasmatischen Kinasekomplexes, der daraufhin die NF- $\kappa$ B-bindenden I $\kappa$ B-Inhibitorproteine phosphoryliert. Dies initiiert die Ubiquitin (Ubi)-vermittelte, proteosomale Degradation der I $\kappa$ Bs, wodurch transkriptionsaktive NF- $\kappa$ B-Dimere freigegeben werden und in den Zellkern translokieren, um die Transkription spezifischer Zielgene in Gang zu setzen.

### 1.1.3 Der IKK-Komplex

Alle bisher bekannten Rezeptor-vermittelten NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden konvergieren auf der Ebene des IKK-Komplexes, der daher eine der wichtigsten Schaltstellen bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B darstellt. Die zentralen Bestandteile dieses Komplexes sind die Untereinheiten IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  [Mercurio et al, 1997; DiDonato et al, 1997; Krappmann et al, 2000]. Bei IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  stimmen 52% der Gesamtproteinsequenz und 65% der Proteinsequenz der katalytischen Domänen überein. Diese Untereinheiten beinhalten die Kinase-Domänen zur Substrat-spezifischen Phosphorylierung der I $\kappa$ Bs, wobei IKK $\beta$  *in vitro* die stärkere Kinase ist als IKK $\alpha$  [Zandi et al, 1997]. Im Falle von IKK $\gamma$  handelt es sich um eine regulatorische Komponente des Komplexes ohne enzymatische Aktivität, die keine strukturellen Ähnlichkeiten zu IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  aufweist, aber für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B unerlässlich ist. [Yamaoka et al, 1998; Rothwarf et al, 1998].

Sowohl IKK $\alpha$  als auch IKK $\beta$  besitzen in der N-terminalen Kinase-Domäne eine Aktivierungsschleife, die das Aminosäuremotif SLCTS beinhaltet (Abbildung 1.3). Phosphorylierung der beiden Serine innerhalb dieser konservierten Sequenz führt zur Aktivierung der Kinasen [Mercurio et al, 1997]. Im mittleren Teil der Proteine befindet sich eine „Leucin-Zipper“-Domäne, die zur Dimerisierung der Proteine benötigt wird, während im äußersten C-terminalen Bereich die IKK $\gamma$ -Interaktionsstelle liegt (Abbildung 1.3) [Zandi et al, 1998; May et al, 2000].

Die stöchiometrische Zusammensetzung des ca. 900 kD großen Komplexes ist noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund von Analysen rekombinanter Proteine und Komplexrekonstitution in Hefen wurden stöchiometrisch äquivalente Mengen der Komponenten IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  vorgeschlagen [Miller und Zandi, 2001]. Die Daten neuerer Studien deuten an, dass ein IKK $\gamma$ -Tetramer vier katalytisch aktive Untereinheiten bindet [Tegethoff et al, 2003].



**Abbildung 1.3 Domänenstruktur von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ .** Phosphorylierung innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne (KD) aktiviert IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ . Die „Leucin-Zipper“ (LZ)-Domäne vermittelt Dimerisierung. Über den äußersten C-terminalen Teil der Proteine wird IKK $\gamma$ , die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, gebunden („IKK $\gamma$  Binding Domain“). Obwohl die „Helix-Loop-Helix“ (HLH)-Domäne zur Aktivierung benötigt wird, ist ihre genaue Funktion unbekannt.

## **1.2 Die Rolle von NF- $\kappa$ B bei der Steuerung der angeborenen Immunantwort**

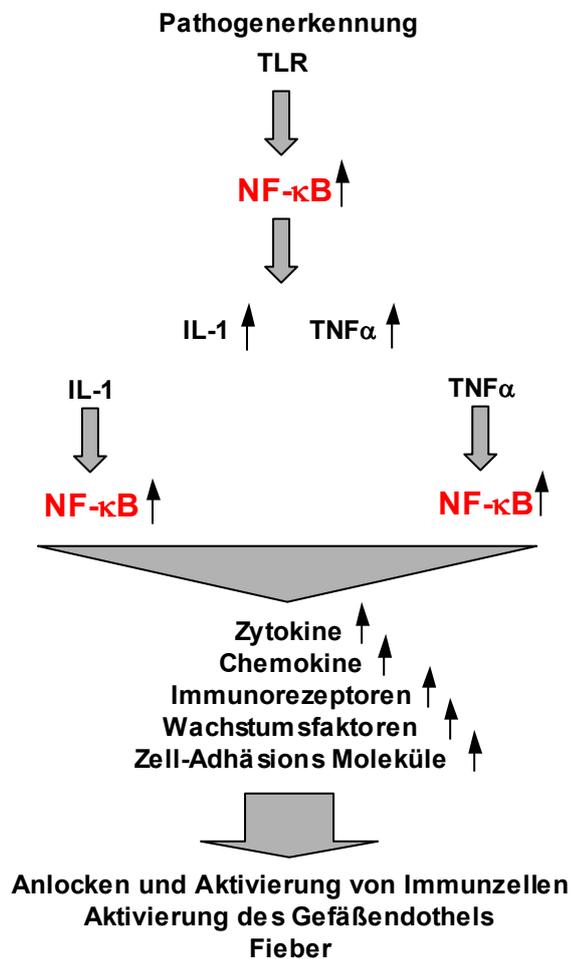
Der Körper ist einem permanenten Angriff infektiöser Mikroorganismen ausgesetzt, doch nur selten kommt es zu einer schwerwiegenden Erkrankung. Durch die Entwicklung des Immunsystems sind Wirbeltiere in der Lage, pathogene Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten zu erkennen und wirkungsvoll zu bekämpfen. Dabei lassen sich die Abwehrprozesse zwei Kategorien zuteilen, der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Die Fähigkeit zum Aufbau einer primären Verteidigungsreaktion, die bereits in den ersten Minuten nach der Infektion eingeleitet wird, geht auf Keimbahn-kodierte Erbinformation zurück. Immunzellen erkennen über „Pattern Recognition“-Rezeptoren (PRR) konservierte Oberflächenmerkmale („Pathogen Associated Microbial Patterns“, PAMPs) oder Stoffwechselprodukte von Pathogenen und leiten eine wirkungsvolle, aber recht unspezifische erste Abwehrreaktion ein [Janeway und Medzhitov, 2002].

### **1.2.1 Die proinflammatorische Wirkung von NF- $\kappa$ B**

Ursprünglich wurde NF- $\kappa$ B in reifen B-Zellen als ein nukleärer Faktor beschrieben, der die Transkription der Immunglobulin- $\kappa$ -Leichtkette reguliert [Sen und Baltimore, 1986]. Schnell stellte sich heraus, dass NF- $\kappa$ B nicht nur in B-Zellen, sondern auch in vielen anderen Immun- und Nicht-Immunzellen die Transkription einer Vielzahl von Genen steuert, mit dem übergeordneten Ziel, die Immunantwort zu koordinieren [Sen und Baltimore, 1986; Cross et al, 1989; Griffin et al, 1989].

Eine der wichtigsten Proteinfamilien von PRRs in Säugern wird von mindestens elf bekannten „Toll-like“ Rezeptoren (TLRs) gebildet, die für die schnelle Bekämpfung einer großen Zahl von Pathogenen durch Zellen des Immunsystems essentiell sind [Kopp und Medzhitov, 2003, Takeda et al, 2003]. TLR-vermittelte Erkennung Pathogen-spezifischer Strukturen führt zur Aktivierung NF- $\kappa$ B-gesteuerter Expression auto-, para- und endokrin wirksamer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) oder Interleukin-8 (IL-8) [Baeuerle und Baichwal, 1997; Barton und Medzhitov, 2003]. Deren Sekretion fördert die Entstehung einer Entzündung u.a. durch die Aktivierung des Gefäßendothels, die Anlockung einer Vielzahl weiterer Immunzellen zum Ort der Infektion sowie die Einleitung der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder die Reifung von dendritischen Zellen. Wie beispielhaft anhand von IL-1 und TNF $\alpha$  ersichtlich ist, reguliert NF- $\kappa$ B hierbei

als zentraler Koordinator der angeborenen Immunantwort nicht nur die primäre Produktion einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, sondern steuert auch die durch diese Zytokine eingeleitete Expression weiterer Zielgene (Abbildung 1.4) [Ghosh und Karin, 2002; Hayden und Ghosh, 2004].



**Abbildung 1.4** Schema zur Verdeutlichung der zentralen Rolle von NF- $\kappa$ B bei der Steuerung der angeborenen Immunantwort. Pathogenerkennung z.B. durch TLRs führt zu einer NF- $\kappa$ B-regulierten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 und TNF $\alpha$ , deren proinflammatorische Wirkung durch Aktivierung weiterer NF- $\kappa$ B-regulierter Zielgene gesteuert wird. Auf diese Weise wird eine Kaskade systemischer Effekte angestoßen, die eine effiziente erste Immunabwehr ermöglicht.

### 1.2.2 Mechanismus der TLR, IL-1- und TNF $\alpha$ -vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Wie bereits erwähnt, lösen eine Reihe von PAMPs oder entzündungsfördernde Substanzen wie TNF $\alpha$  und IL-1 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B aus. Diese unterschiedlichen Stimuli werden von spezialisierten Oberflächenrezeptoren der Zelle erkannt und leiten das Signal über

spezifische intrazelluläre Signalwege weiter, die letztlich alle in der Aktivierung des IKK-Komplexes münden [Hatada et al, 2000].

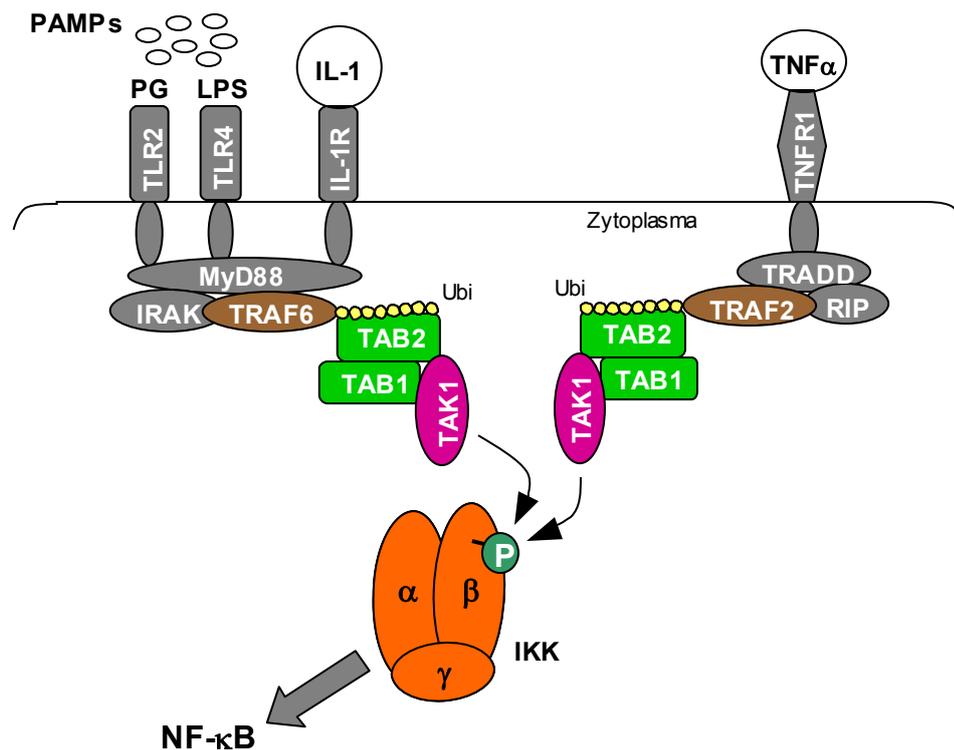
Proteoglykane (PG) oder Lipopolysaccharide (LPS) bilden klassische Beispiele für konservierte Bestandteile der Zellwände von Bakterien, dienen dem Organismus als PAMPs und werden durch unterschiedliche Vertreter der TLRs, TLR2 und TLR4 erkannt [Poltorak et al, 1998; Hoshino et al, 1999; Takeushi et al, 1999; Schwandner et al, 1999]. Die intrazellulären Bereiche der TLRs und des IL-1 Rezeptors (IL-1R) weisen eine hohe Homologie auf. In beiden Fällen ist eine C-terminale Protein-Interaktionsdomäne, die Toll/IL-1R (TIR)-Domäne, für die Signaltransduktion verantwortlich. Die TLR- und IL-1R-aktivierten Signalketten ähneln sich daher und greifen auf die gleichen Regulatorproteine zurück [Gay und Keith, 1991; Dunne und O'Neill, 2003]. Über die intrazellulären Domänen der Rezeptoren werden zytoplasmatische Regulatoren wie MyD88 („Myeloid Differentiation Factor 88“), IRAK („IL-1 Receptor Associated Kinase“) und TRAF6 („TNF Receptor Associated Factor 6“) rekrutiert, die das Signal zum IKK-Komplex weiterleiten (Abbildung 1.5) [Adachi et al, 1998; Kawai et al, 1999; Thomas et al, 1999; Suzuki et al, 2002; Lomaga et al, 1999].

Im Gegensatz zur TIR-abhängigen Signaltransduktion, die durch monomere Rezeptoren vermittelt wird, induziert die Bindung von  $\text{TNF}\alpha$  die Trimerisierung des TNF-Rezeptor 1 (TNFR1). Diese ist Voraussetzung für die Assoziation der zytoplasmatischen Regulatoren TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain), TRAF2 und RIP (Receptor Interacting Protein), die das Signal in einem noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus an den IKK-Komplex weitergeben [Hsu et al, 1995; Hsu et al, 1996a; Hsu et al, 1996b].

Trotz der strukturellen Übereinstimmungen der beiden katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes  $\text{IKK}\alpha$  und  $\text{IKK}\beta$  ergeben sich bei der Übertragung TLR- oder  $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Signale offensichtliche funktionale Unterschiede.  $\text{IKK}\alpha$ -defiziente Mäuse sind lebensfähig, sterben allerdings perinatal an Skelett- und Hautdefekten. Die IL-1- und  $\text{TNF}\alpha$ -abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Fibroblasten und Thymozyten dieser Tiere ist nicht oder nur schwach beeinträchtigt [Hu et al, 1999; Takeda et al, 1999; Li et al, 1999a]. Im Gegensatz dazu sterben  $\text{IKK}\beta$ -defiziente Mäuse bereits im Embryonalstadium an massiver Hepatozytenapoptose. Durch die Analyse embryonaler  $\text{IKK}\beta$ -defizienter Fibroblasten wurden schwere Defekte bei der IL-1- und  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung aufgedeckt [Li et al, 1999c; Li et al, 1999b; Tanaka, 1999]. Die Ergebnisse dieser Studien deuten an, dass  $\text{IKK}\beta$  bei IL-1- und  $\text{TNF}\alpha$ -gesteuerten proinflammatorischen Prozessen essentielle Funktionen ausübt, die nicht

von IKK $\alpha$  übernommen werden können. Im Einklang mit den Ergebnissen der „Knock Out“-Studien wurde gezeigt, dass IL-1- und TNF $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von IKK $\beta$ , aber nicht von IKK $\alpha$  für die Aktivierung der Kinase-Aktivität des IKK-Komplexes essentiell ist [Delhase et al, 1999].

Auf mechanistischer Ebene spielt bei Prozessen, die nach Aktivierung der TLR/IL-1R- und TNFR1-Signalwege zur Phosphorylierung von IKK $\beta$  führen, die E3-Ubiquitin Ligaseaktivität der TRAF-Proteine eine entscheidende Rolle [Deng et al, 2000]. TRAF2 und TRAF6 weisen sogenannte RING („Really Interesting New Gene“-)Domänen auf. Diese katalysieren die Bildung von K63-vernetzten Polyubiquitin-Ketten auf Substratproteinen, welche im Gegensatz zu K48-verknüpften Polyubiquitinketten in der Regel nicht als Erkennungssignal für proteosomalen Proteinabbau fungieren, sondern vielmehr eine zusätzliche Interaktionsoberfläche für andere Proteine bilden und daher Protein-Protein-Wechselwirkungen und Enzymaktivitäten regulieren [Sun und Chen, 2004].



**Abbildung 1.5 Mechanismus der IL-1R/TNFR1-vermittelten IKK-Aktivierung.** Rezeptoraktivierung induziert die Oligomerisierung und nachfolgende K63-Autoubiquitinierung von TRAF E3-Ubiquitin-Ligasen. Der Proteinkomplex aus TAB1, TAB2 und TAK1 erkennt diese Polyubiquitinketten, worauf über einen noch unbekanntem Mechanismus die Kinase TAK1 aktiviert wird, die IKK $\beta$  in der Aktivierungsschleife phosphoryliert.

Im Fall des TLR/IL-1R-vermittelten Signalweges wurde gezeigt, dass Rezeptoraktivierung zur Oligomerisierung von TRAF6 und anschließender K63-Autoubiquitinierung führt (Abbildung 1.5). Über die Polyubiquitinkette bindet TRAF6 an einen Proteinkomplex bestehend aus den Adapterproteinen TAB1 („TAK1 Binding Protein 1“), TAB2 und der Kinase TAK1 („Transforming Growth Factor  $\beta$  Activated Kinase 1“), wodurch über einen noch unbekanntem Mechanismus die Aktivierung von TAK1 induziert wird. [Wang et al, 2001]. TAK1 wiederum kann die Aktivierungsschleife von IKK $\beta$  direkt phosphorylieren und auf diese Weise die Aktivierung des IKK-Komplexes ermöglichen. Für TRAF2 wird eine ähnliche Funktion bei der TNFR1-vermittelten IKK-Aktivierung vermutet [Shi und Kehrl, 2003].

### **1.3 Die Rolle von NF- $\kappa$ B bei der Steuerung der erworbenen Immunantwort**

Zur gezielten Eindämmung einer Infektion leitet der Organismus neben der eher unspezifischen angeborenen Immunantwort den Aufbau einer adaptiven (erworbenen) Immunantwort ein. Dadurch wird die selektive Erkennung körperfremder Antigene sowie deren nachhaltige und spezifische Bekämpfung ermöglicht. T- und B-Lymphozyten sind die zellulären Träger der adaptiven Immunantwort und besitzen die Fähigkeit, nach Antigen-gesteuerter Aktivierung infizierte Körperzellen abzutöten oder eine Abwehrreaktion auf der Basis Antigen-spezifischer Antikörper zu etablieren. Da T-Zellen für die Erkennung körperfremder Antigene zuständig sind, bilden diese eine zentrale Regulationseinheit beim Aufbau der adaptiven Immunabwehr. Auf molekularer Ebene wird die T-Zell Antwort durch Aktivierung eines T-Zell spezifischen Zielgen-Programms gesteuert. NF- $\kappa$ B, bereits als molekularer Koordinator der angeborenen Immunantwort erwähnt, spielt bei der Zielgen-Regulation in aktivierten T-Zellen eine zentrale Rolle und übernimmt daher auch eine essentielle Funktion beim Aufbau der Antigen-gesteuerten adaptiven Immunantwort [Janeway et al, 2002].

#### **1.3.1 Grundlagen der T-Zell Antwort**

##### **1.3.1.1 Aktivierung von T-Zellen**

Phagozyten, die am Ort der Infektion große Mengen an Gewebeflüssigkeit aufnehmen, zerlegen darin enthaltenen Pathogene in kleine Fragmente und präsentieren diese als Antigene

auf der Zelloberfläche („Antigen Presenting Cell“, APC) [Banchereau et al, 1998]. Angeregt durch die Einwirkung proinflammatorischer Zytokine wandern die APCs zu den peripheren Lymphorganen, wo sie auf reife, naive T-Zellen treffen, die Antigen-spezifische Oberflächenrezeptoren („T-Cell Receptors“, TCRs) exprimieren. Durch somatische Rekombination sind T-Zellen in der Lage, TCRs mit Affinität zu einer theoretisch unendlichen Anzahl von unterschiedlichen Antigenen zu synthetisieren, wobei jeder T-Zell Klon immer nur TCRs mit Affinität zu einem bestimmten Antigen exprimiert. Durch Selektionsverfahren während der T-Zell Entwicklung im Thymus wird die Expression funktionaler Rezeptoren, die nicht auf körpereigene Antigene reagieren, überwacht (Positiv- und Negativselektion). Trifft die T-Zelle auf eine APC, die ein zum TCR der T-Zelle passendes Antigen präsentiert, führt die erfolgreiche Interaktion (T-Zell Aktivierung) schließlich zur Proliferation und Expansion des aktivierten T-Zell Klons (klonale Expansion und Selektion) [Schlienger et al, 2000; They et al, 2001].

Während der Entwicklung im Thymus entstehen zytotoxische T-Zellen („Cytotoxic T-Cells“, Tc) oder T-Helfer Zellen („T-Helper Cells“, Th) aus gemeinsamen Vorläuferzellen [Reiner und Seder, 1995]. Tc-Zellen erkennen körpereigene Zellen, die eine Infektion durch Präsentation von Pathogenfragmenten anzeigen. Passen TCR der Tc-Zelle und das spezifische Antigenfragment auf der Oberfläche der Körperzelle zueinander, wird die Körperzelle von der Tc-Zelle abgetötet [Griffiths, 1995]. Zeitgleich interagieren Th-Zellen mit B-Zellen, die das passende Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren und in der Lage sind, Antigen-spezifische Antikörper herzustellen. Auf diese Weise aktivierte B-Zellen expandieren ebenfalls verstärkt und differenzieren in Plasmazellen, die die spezifischen Antikörper in großer Zahl herstellen und sezernieren [Kupfer et al, 1994].

Im Laufe einer Infektion werden von allen Zellsubtypen des Immunsystems besonders langlebige und temporär inaktive, sogenannte Gedächtniszellen angelegt. Die Reaktivierung dieser Zellen erlaubt es dem Organismus, im Falle einer Re-Infektionen mit dem gleichen Pathogen sehr viel schneller zu reagieren [Bradley et al, 2000; Stockinger et al, 2004; Rocha et al, 2004].

### **1.3.1.2 Der T-Zell/APC Kontakt**

Für die T-Zell/APC Interaktion sind die auf der Oberfläche von APCs befindlichen MHC („Major Histocompatibility Complex“-)Proteine der Klasse II von großer Bedeutung. Im Unterschied zu den nahezu ubiquitären MHC-Proteinen der Klasse I sind die MHC-Proteine

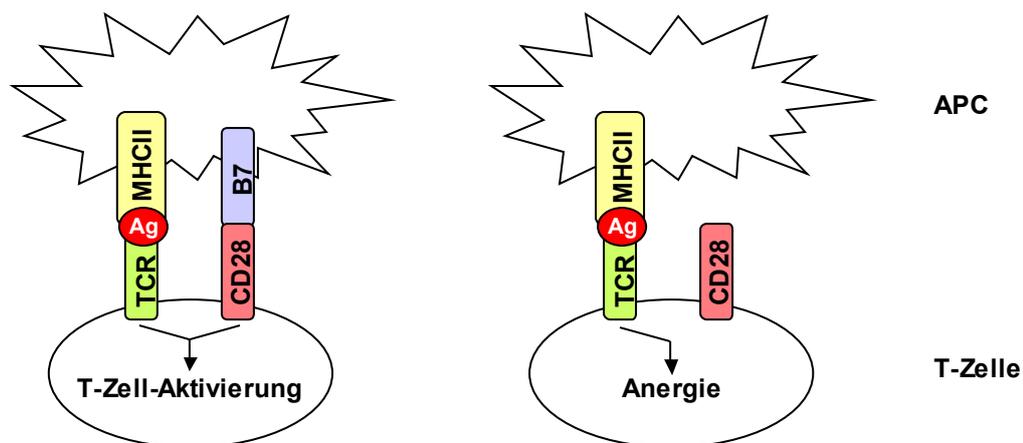
der Klasse II ausschließlich auf Zellen des Immunsystems zu finden. Alle MHC-Proteine gehören der Immunglobulin-Super-Familie an [Janeway et al, 2001]. Ihr gemeinsames Merkmal ist die Aufteilung in einen konstanten und einen variablen Proteinteil, wobei der variable Teil mit zuvor aufgenommenen Antigenen (Ag) beladen und extrazellulär präsentiert werden kann (Ag-MHC) [Stern und Wiley, 1994; Bryant und Ploegh, 2004].

Auf der Oberfläche von T-Zellen ist der TCR-Proteinkomplex für die extrazelluläre Erkennung des Ag-MHC-Komplexes verantwortlich [Davis et al, 1998]. Die direkte Bindung wird von den beiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des TCRs vermittelt, die jedoch keine funktionale zytoplasmatischen Domänen aufweisen [Garcia et al, 1996; Call und Wucherpfennig, 2005]. Für die Signalweiterleitung sind mehrere direkt TCR-assoziierte Untereinheiten  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  verantwortlich, zusammengefasst als CD3 bezeichnet. Vor allem die  $\epsilon$  und  $\zeta$  Untereinheiten besitzen einen ausgedehnten zytoplasmatischen Teil, der das vom TCR aufgenommene Signal ins Zellinnere transduziert [Pitcher und van Oers, 2003].

### **1.3.1.3 Kostimulation und Energie**

T-Zellen, die mit körpereigenen Antigenen reagieren, werden während der Reifung im Thymus aussortiert. Allerdings besteht die Gefahr, dass autoreaktive T-Zellen, die gegen Strukturen des eigenen Körpers gerichtet sind, dieser Selektion entkommen. Der Organismus muss aber zwingend vermeiden, dass Selbstantigen-präsentierende Körperzellen in der Lage sind, die produktive Aktivierung autoreaktiver T-Zellen auszulösen. Zum Schutz vor Autoimmunität reicht daher ein alleiniges Antigen-spezifisches MHC/TCR-vermitteltes Signal zur T-Zell Aktivierung nicht aus. Für produktive Aktivierung werden ergänzende, sogenannte Kostimulationssignale benötigt, die auf die Anwesenheit eines Infektionsherds zurückgehen. Daher induzieren proinflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  die Expression von B7-Molekülen, ebenfalls Mitglieder der Immunglobulin-Super-Familie, auf der APC-Oberfläche [Mellman und Steinman, 2001]. Ein Kostimulationssignal wird nur dann ausgelöst, wenn neben der TCR/Ag-MHC-Interaktion auch B7-Moleküle an den T-Zell spezifischen Oberflächenrezeptor CD28 binden [Green et al, 1994; Lenschow et al, 1996; Greenwald et al, 2005]. Da eine APC nach der Zytokin-Stimulation auf dem Weg zu den peripheren Lymphorganen nicht mehr in der Lage ist, weitere Antigene aufzunehmen und zu präsentieren, sind Antigen-spezifisches (TCR/Ag-MHC) und infektionsspezifisches (B7/CD28) Signal durch TCR/CD28-Kostimulation direkt miteinander gekoppelt.

T-Zell Anergie ist ein weiterer wichtiger Schutzmechanismus zur Erhaltung der Selbsttoleranz in einem Organismus [Schwartz, 2003]. Entfällt das Kostimulationssignal und wird nur der TCR von einer APC aktiviert, fehlt die Verknüpfung zu einem Infektionsherd. In diesem Fall verbleibt die Zelle nicht nur inaktiviert, sie verfällt in einen anergischen Zustand der Unempfindlichkeit und kann nun selbst durch kostimulative Signale nicht mehr reaktiviert werden (Abbildung 1.6) [Heissmeyer et al, 2004].



**Abbildung 1.6 Produktive T-Zell Aktivierung benötigt Kostimulation.** APCs präsentieren Antigene über MHC Klasse II Moleküle. Die Erkennung spezifischer Antigene durch den TCR führt nur dann zur klonalen Expansion der T-Zelle, wenn ein Kostimulationssignal durch die Interaktion von B7-Molekülen mit dem Kostimulationsrezeptor CD28 auftritt. Fehlt das Kostimulationssignal, verfällt die T-Zelle in Anergie.

#### 1.3.1.4 Beeinflussung des Schwellenwerts der T-Zell Aktivierung durch Kostimulation

APCs, die ein Pathogen aufgenommen und prozessiert haben, präsentieren eine vergleichsweise geringe Anzahl peptidgeladener MHC-Komplexe auf ihrer Oberfläche. Hinzu kommt, dass die Affinität des TCR zu seinem spezifischen Ag-MHC relativ schwach ist. Die Summe dieser Faktoren setzt voraus, dass die Antigenerkennung durch eine äußerst empfindlich gesteuerte Signalkette vermittelt wird. Schon die Bindung einer geringen Anzahl TCRs an Ag-MHCs kann Signale innerhalb der T-Zelle erzeugen, jedoch wird der Schwellenwert zur Aktivierung der T-Zelle dadurch nicht erreicht [Acuto et al, 2003; Irvine et al, 2002]. Durch zeitgleiche Aktivierung des CD28-Rezeptors wird die Intensität des TCR-Signals um ein Vielfaches verstärkt [Viola und Lanzavecchia, 1996; Iezzi et al, 1998].

Zusätzlich erscheint der Schwellenwert zur Auslösung der zellulären Antwort herabgesetzt, wodurch besonders bei sehr schwachen TCR-Signalen die unterstützende Natur der Kostimulation zum Tragen kommt. Da bei der Signalübertragung von TCR und CD28 auf molekularer Ebene vielfach die gleichen Signalproteine beteiligt sind, leistet der Kostimulationsrezeptor wahrscheinlich in der Hauptsache einen quantitativen Beitrag zur Gesamt-Signalintensität. Allerdings sind in T-Zellen auch Mechanismen bekannt, die auf spezifisch CD28-vermittelte Signale zurückgeführt werden können (qualitativer Beitrag) [Shapiro et al, 1997; Burr et al, 2001; Andres et al, 2004a].

### **1.3.1.5 Die Immunologische Synapse**

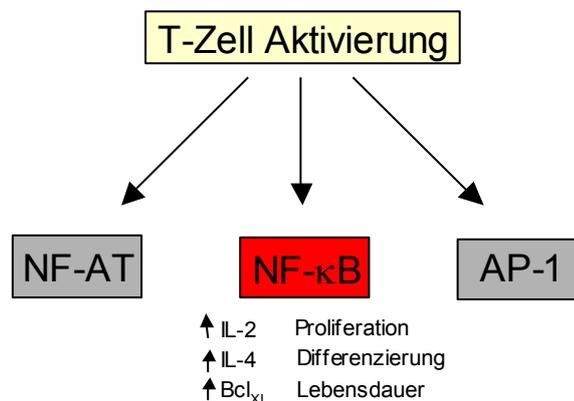
Die Wechselwirkung von TCR und Ag-MHC induziert die Ausrichtung des Golgi-Apparats und des MTOCs („Microtubule Organisation Center“) in Richtung der APC/T-Zell Kontaktstelle [Sancho et al, 2002]. Im Zuge einer umfangreichen Umordnung des Actin-Zytoskeletts werden eine große Anzahl spezieller Signalproteine im Kontaktbereich angereichert, es kommt zur Ausbildung der sogenannten immunologischen Synapse. Adhäsionsmoleküle wie das Integrin LFA-1 („Lymphocyte Function Associated Antigen 1“) und sein Ligand sammeln sich dabei in einer ringförmigen äußeren Region („Peripheral Supra Molecular Adhesion Complex“, p-SMAC). Im inneren Bereich der Kontaktstelle („Central“ (c) -SMAC) kommt es zur Ansammlung von Ligand-Rezeptor-Aggregaten wie den TCR/Ag-MHC oder CD28/B7 Komplexen [van der Merwe und Davis, 2002]. Allerdings scheint der vollständige Aufbau der Synapse für anfängliche TCR-Signaltransduktion nicht essentiell zu sein, da primäre Signale bereits vor Ausbildung der maturen Synapse detektiert werden können [Lee et al, 2002; Andres et al, 2004b]. Eine mögliche Funktion der Synapse könnte die Konzentrierung von Proteinen und Rezeptoren sein, die für sekundäre Abläufe wichtig sind. Die Ansammlung von CD28 in der c-SMAC erleichtert die Bindung an den B7-Liganden, damit Bildung eines Kostimulationssignals und volle T-Zellaktivierung [Lin et al, 2005].

Die c-SMAC ist ein Bereich hoher Dichte an Lipidflößen („Lipid Rafts“). Dabei handelt es sich um begrenzte Membranregionen (Mikrodomänen), die verstärkt mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind [He et al, 2005]. Einige Signalproteine, die bei der T-Zellaktivierung eine Rolle spielen, sind konstitutiv mit Lipidflößen assoziiert, andere werden erst nach der Aktivierung dorthin befördert. Ursprünglich wurde den Lipidflößen eine Funktion bei der Aggregation der Signalproteine untereinander zugeordnet. Neuere Daten

zeigen allerdings, dass weniger die Bildung der Lipidfloß-Mikrodomänen, als vielmehr spezifische Protein-Protein-Interaktionen für die Aggregation wichtig sind [Douglass and Vale, 2005].

### 1.3.2 PKC $\theta$ -vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in T-Zellen

Bei der Aktivierung von Lymphozyten übernehmen die Transkriptionsfaktoren NF-AT („Nuclear Factor Of Activated T-Cells“), AP-1 („Activator Protein 1“) und NF- $\kappa$ B eine Schlüsselfunktion (Abbildung 1.7). Das verschachtelte Genexpressionsmuster dieser Faktoren ermöglicht es der Zelle, Antigen-spezifisch auf unterschiedliche Signalmuster und Stimulusintensitäten zu reagieren. Rezeptor-proximal wird bei der Signalweiterleitung in erster Linie auf die gleichen Proteine zurückgegriffen, Rezeptor-distal fächern die Signalwege stark auf. Hieraus resultieren komplexe, aber auf mehreren Ebenen regulierbare Proteinnetzwerke, die sowohl für NF-AT als auch für AP-1 und NF- $\kappa$ B spezifische Regulatorproteine aufweisen [Lin und Weiss, 2001].



**Abbildung 1.7 Zentrale Funktion von NF- $\kappa$ B bei der T-Zell Aktivierung.** Zielgene, die unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B stehen, spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung von Proliferation, Differenzierung und Lebensdauer aktivierter T-Zellen.

Die Induktion NF- $\kappa$ B-abhängiger Zielgene, von denen eine Vielzahl Proliferation, Differenzierung und Lebensdauer steuert, stellt einen zentralen Schalter bei der Aktivierung von T-Zellen dar. Zu den Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Zielgenen gehören u.a. (I) IL-2 und CD25, deren Expression die klonale Expansion induziert, (II) IL-4, welches die T-Zell Differenzierung steuert, sowie (III) die anti-apoptotischen Proteine Bcl<sub>XL</sub> und Bfl1/A1

[Ullman et al, 1990; Jain et al, 1995; Shapiro et al, 1997; Li-Weber et al, 1998; Hehner et al, 2000; Koshnan et al, 2000a; Kucharczak et al, 2003]. Die Antigenerkennung durch den TCR allein führt nur zu einer schwachen NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Erst TCR/CD28-Kostimulation vermittelt maximale NF- $\kappa$ B-Aktivität und vermeidet Anergie durch die Expression T-Zell-aktivierender Zielgene [Schmitz et al, 2003].

Auf molekularer Ebene nehmen die Rezeptor-proximalen Prozesse der TCR/CD28-vermittelten Signaltransduktion Einfluss auf eine Vielzahl von Regulator- und Adapterproteinen. Diese münden u.a. in der Aktivierung PKC $\theta$  („Protein Kinase C  $\theta$ “), einem essentiellen Regulator der T-Zell Aktivierung.

### **1.3.2.1 Die Funktion von PKC $\theta$**

Die Proteinfamilie der PKCs beinhaltet neun bekannte Isoformen. Diese können in drei unterschiedliche Subfamilien, die konventionellen, atypischen und neuen PKCs eingeteilt werden. PKC $\theta$  gehört zur Gruppe der neuen PKCs und kann durch Diacylglycerol (DAG) Bindung an die C1-Domäne aktiviert werden (Abbildung 1.8). Die Proteinexpression von PKC $\theta$  ist auf Skelettmuskel und T-Zellen begrenzt [Baier, 2003].

T-Zellen PKC $\theta$ -defizienter Mäuse zeigen nach TCR/CD28-Stimulation reduzierte AP-1- und blockierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, während die NF-AT-Antwort unbeeinflusst bleibt. Diese Defekte resultieren in stark eingeschränkter Zytokinproduktion und Proliferationsfähigkeit der T-Zellen [Sun et al, 2000]. Bei PKC $\theta$ -defizienten T-Zellen einer weiteren, unabhängig hergestellten „Knock Out“-Mauslinie ist im Gegensatz dazu die NF-AT Antwort vollständig blockiert, jedoch wurden bei diesen Tieren nur leichte Defekte bei der AP-1- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung festgestellt [Pfeifhofer et al, 2003]. Auch wenn die phänotypische Diskrepanz der beiden Mauslinien nicht restlos aufgeklärt ist, könnten variierende Stimulationsbedingungen oder mögliche Redundanz aufgrund hoher Homologie innerhalb der PKC-Proteinfamilie die Beobachtungen erklären.

Die Ergebnisse biochemischer Analysen allerdings unterstützen eine prominente Rolle von PKC $\theta$  bei der Antigenrezeptor-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Überexpression einer konstitutiv aktiven PKC $\theta$ -Isoform führt zur Aktivierung eines NF- $\kappa$ B-Reporters und des CD28REs („CD28 Response Element“) des IL-2 Gens. Im Einklang mit diesen Daten blockiert die Überexpression einer dominant-negativen Isoform von PKC $\theta$  oder Inaktivierung durch RNA-Interferenz die TCR/CD28-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung [Lin et al, 2000].

Zusätzlich verhindert der spezifische PKC $\theta$ -Inhibitor Rottlerin selektiv den Kernimport von NF- $\kappa$ B [Courdonniere et al, 2000].



**Abbildung 1.8 Domänenstruktur von PKC $\theta$ .** Die „C2-like“-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen zwischen PKC $\theta$  und Bestandteilen des Zytoskeletts. Die C1-Domäne bindet an DAG und trägt im Allgemeinen zur Aktivierung von PKCs bei. Im C-terminalen Bereich des Proteins liegt die Kinase-Domäne (KD).

### 1.3.2.2 Der Mechanismus der Aktivierung von PKC $\theta$

Die Aktivierung des TCRs und des CD28-Rezeptors leiten eine Welle zytoplasmatischer Tyrosin-Phosphorylierungen ein. Diese Signalkaskaden werden von Tyrosinkinase wie Lck („Lymphocyte Protein Tyrosine Kinase“) und ZAP70 („ $\zeta$ -Chain Associated Protein“) koordiniert, die größtenteils den Familien der Src- oder Syk-Kinasen angehören (Abbildung 1.10) [Iwashima et al, 1994; Pitcher und van Oers, 2003]. ZAP70 phosphoryliert das Adapterprotein LAT („Linker Of Activation In T-Cells“), welches über einen Palmitoylrest permanent in den Lipidflößen gebunden und ein wichtiger Baustein im Aufbau der c-SMAC ist [Zhang et al, 1998a; Zhang et al, 1998b]. Phosphoryliertes LAT bildet die Bindungsstelle für eine Reihe von essentiellen Regulatoren der TCR-Signalkaskade wie dem Gerüstprotein SLP76 („SH2 Domain Containing Leukocyte Protein Of 76 kD“), dem Guanin-Nukleotid Austausch-Faktor Vav und PLC $\gamma$ 1 (Phospholipase C $\gamma$ 1) [Liu et al, 1999; Yablonski et al, 2001, Reynolds et al, 2002].

PLC $\gamma$ 1 spaltet in der Membran verankertes PIP2 (Phosphatidyl Inositol Bisphosphat) zu IP $_3$  (Inositol Trisphosphat) und DAG. DAG verbleibt an der Membran und dient dort im Allgemeinen als Aktivator für PKCs. [Monks et al, 1997; Monks et al, 1998; Bi et al, 2001]. Allerdings bestimmt die Verfügbarkeit von DAG allein die Aktivität von PKC $\theta$  nur in geringem Maße [Villalba et al, 2002]. Vielmehr scheint die Lokalisierung von PKC $\theta$  im c-SMAC entscheidend zur Aktivierung der Kinase beizutragen, wofür ein SLP76/Vav1-abhängiger Mechanismus vorgeschlagen wurde [Bi et al, 2001].

TCR- und CD28-vermittelte Signale führen auch zur Aktivierung von PI3K („Phosphoinositide-3 Kinase“) [Okkenhaug et al, 2004]. PDK1 („3-Phosphoinositide Dependent Kinase 1“), ein PI3K-reguliertes und zumindest teilweise membranassoziertes

Enzym, bindet direkt an verschiedene PKC-Isoformen. Die Interaktion zwischen PDK1 und PKC $\theta$  wird neben SLP76 und Vav für die Rekrutierung von PKC $\theta$  zur immunologischen Synapse benötigt [Le Good et al, 1998; Lee et al, 2005]. Da wiederum PKC $\theta$  direkt an den IKK-Komplex bindet, wird dieser über die PDK1/PKC $\theta$  Interaktion in die Lipidfloßdomänen der Zellmembran transportiert [Khoshnan et al, 2000 b].

### **1.3.3 Carma1, Bcl10 und Malt1, essentielle Regulatoren der Antigenrezeptor-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

PDK1 rekrutiert neben PKC $\theta$  auch den permanent Membran-assoziierten Adapter Carma1 („CARD Containing MAGUK Protein 1“) in den c-SMAC [Zhou et al, 2004]. Carma1 wiederum bildet die molekulare Brücke zu zwei weiteren Proteinen, Bcl10 („B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia/Lymphoma Associated 10“) und Malt1 („Mucosa Associated Lymphoid Tissue 1“), die wie Carma1 durch genetische Inaktivierung mit dem Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg in Verbindung gebracht wurden [Ruland et al, 2001; Ruland et al, 2003; Ruefli-Brasse et al, 2003; Egawa et al, 2003; Hara et al, 2003]. Anhand von Interaktionsstudien wurde postuliert, dass die Bildung des Carma1/Bcl10/Malt1 (CBM)-Komplexes eine zentrale Rolle bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Lymphozyten spielt [Gaide et al, 2002; Che et al, 2004].

#### **1.3.3.1 Carma1**

Carma1 gehört zur Familie der MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase)-Proteine. Die Mitglieder dieser Gruppe fungieren als Membran-assoziierte Gerüstproteine ohne bekannte enzymatische Funktion, besitzen aber eine Reihe von Protein-Protein Interaktionsdomänen [Dimitratos et al, 1999; Fanning und Anderson, 1999]. Alle MAGUKs sind durch eine stereotype Abfolge der PDZ („PSD95/Dlg/ZO-1 Homologous“) Domäne, SH3 („Src Homology 3“-)Domäne und GUK („Guanylate Kinase Like“-)Domäne charakterisiert. Carma1, Carma2 und Carma3 bilden eine Subfamilie, die zusätzlich eine CC („Coiled-Coil“-)Region und eine N-terminale CARD („Caspase Recruitment Domain“) besitzen (Abbildung 1.9). Die CARD vermittelt homotypisch Proteinwechselwirkungen und wurde ursprünglich mit Prozessen bei der Einleitung von Apoptose in Verbindung gebracht [Bouchier-Hayes und Martin, 2002]. Inzwischen häufen sich Berichte über CARD-Proteine, die für die Bildung von Proteinkomplexen bei der Vermittlung angeborener sowie erworbener

Immunität verantwortlich sind und vor allem in NF- $\kappa$ B-assoziierten Signalwegen eine Rolle spielen. Die Carma1-Gewebeverteilung beschränkt sich im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen auf die Milz, den Thymus und periphere Leukozyten [Bertin et al, 2001; Gaide et al, 2001].

Die Analyse eines Mausstamms, der ein in der CC-Domäne punktmutiertes Carma1-Protein exprimiert, zeigt selektive Defekte bei der Antigenrezeptor-vermittelten Signaltransduktion von B- und T-Zellen [Jun et al, 2003]. Die Lymphozyten zeigen intakte Rezeptor-proximale Tyrosinphosphorylierung, NF-AT- und MAP („Mitogen Activated Protein“) Kinasen-Aktivierung, aber defekte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Die T-Zellen homozygoter Tiere sind nicht mehr in der Lage, Stimulus-induziert zu proliferieren oder CD25 zu synthetisieren. Einen vergleichbaren Phänotyp ergab die Analyse einer Carma1 „Knock Out“-Mauslinie. Zusätzlich zu den Störungen bei der erworbenen Immunantwort gibt es Defekte bei Prozessen der angeborenen Immunantwort. Die B-Zellen aus der Milz sind nicht mehr in der Lage, auf LPS zu reagieren und zu proliferieren, was Probleme bei der TLR4-vermittelten Signaltransduktion andeutet [Hara et al, 2003].

### **1.3.3.2 Bcl10**

Bcl10 kann aufgrund von Sequenzhomologien keiner bekannten Proteinfamilie zugeordnet werden, besitzt aber wie Carma1 eine N-terminale CARD, über die beide Proteine miteinander interagieren (Abbildung 1.9) [Gaide et al, 2002]. Im Gegensatz zum N-Terminus zeigt der Bcl10 C-Terminus mit einer überdurchschnittlichen Anzahl an Serinen und Threoninen keine Homologie zu einer bereits beschriebenen Proteindomäne. Anfänglich wurde Bcl10 aufgrund der CARD mit Regulationsmechanismen, die zu Apoptose führen in Verbindung gebracht. Biochemische Analysen ergaben, dass Bcl10-Überexpression in unterschiedlichen Zellsystemen nicht nur die Apoptoserate, sondern auch die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B Aktivität steigert [Koseki et al, 1999; Willis et al, 1999].

Weiterhin scheint das Protein eine Rolle bei der Entwicklung aggressiver Formen von MALT-Lymphomen zu spielen. Diese B-Zell Lymphome sind die bekannteste Subgruppe extranodaler non-Hodgkin-Lymphome und zeigen in vielen Fällen chromosomale Translokationen [Zhang et al, 1999]. Eine seltene, aber immer wiederkehrende Translokation, t(1;14)(q22;q32), führt zur Verschiebung des Bcl10-Gens in die Nähe der Immunglobulin (Ig) *loci* und damit zu verstärkter Bcl10-Expression aufgrund potenter transkriptioneller Ig-„Enhancer“. Zusätzlich unterliegen die Zielbereiche somatischer, B-Zell spezifischer

Hypermutation. Eine Sequenzanalyse der chromosomalen Bruchstellen zeigt, dass nach der Translokation eine Vielzahl an Mutationen auftritt, die zur Expression von C-terminal deletiertem Bcl10 führen. Die Expression der Mutanten wurde daraufhin als Grundlage für den Wachstumsvorteil der entarteten B-Zellen vorgeschlagen [Willis et al, 1999].

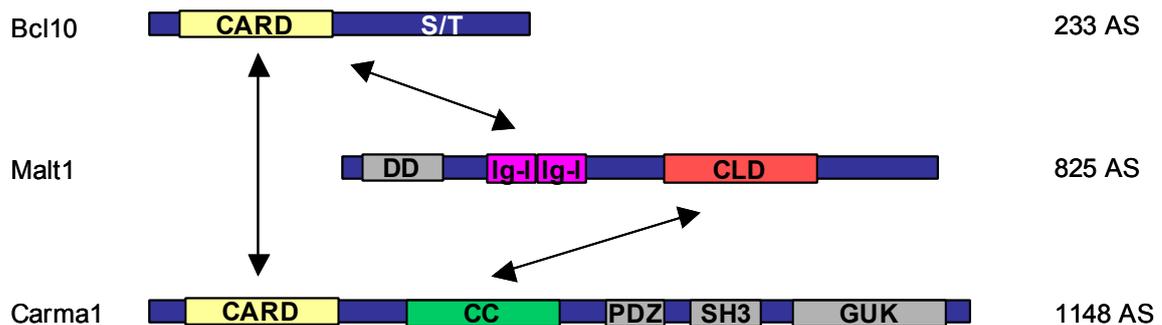
In anderen Studien wiederum wurde Bcl10 als zelluläres Homolog eines Genprodukts des „Equine Herpesvirus 2“ (EHV2), dem viralen Protein vE10, identifiziert [Thome et al, 1999; Srinivasula et al, 1999]. EHV2 ist ein lymphotroper  $\gamma$ -Herpesvirus, dessen Rolle als Pathogen weitgehend unverstanden ist. Allerdings stehen andere Mitglieder dieser Virenfamilie wie das Epstein-Barr-Virus oder das „Kaposi Sarcoma Associated Herpesvirus 8“ in direkter Verbindung mit unkontrollierter Zellproliferation und Neoplasie [Thome et al, 2001].

Die Analyse eines Bcl10 „Knock Out“-Mausstamms zeigt 30% embryonale Lethalität aufgrund eines Defekts bei der Schließung des Neuralrohres [Ruland et al, 2001]. Die restlichen 70% der homozygoten Nachkommen überleben und sind anatomisch mit WT-Tieren vergleichbar. Überraschenderweise zeigen aber weder embryonale Stammzellen, Lymphozyten noch Fibroblasten der „Knock Out“-Tiere Unterschiede bei Stimulus-induzierter Apoptose. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die physiologische Funktion von Bcl10 keine Rolle bei der Einleitung von Apoptose spielt. Stattdessen sind die Bcl10-defizienten Mäuse, trotz weitgehend normaler Lymphozytenentwicklung, sehr empfänglich für Infektionen. Untersuchungen der Antigenrezeptor-vermittelten Signalwege zeigen, dass die Defekte bei der adaptiven Immunantwort auf Fehlfunktionen bei der B- und T-Zell Aktivierung zurück zu führen sind. In T-Zellen homozygoter Tiere ist die TCR/CD28-abhängige NF- $\kappa$ B-Induktion neben intakter IL-1- und TNF $\alpha$ -Antwort selektiv blockiert. Da rezeptorproximale Tyrosinphosphorylierung, AP-1- und NF-AT-Aktivierung in den Bcl10-defizienten Lymphozyten nicht defekt sind, scheint Bcl10 ein spezifischer Rezeptor-distaler Regulator des Antigenrezeptor-vermittelten NF- $\kappa$ B Signalweges zu sein.

### **1.3.3.3 Malt1**

Malt1 gehört zur Proteinfamilie der Paracaspasen. Diese umfasst eine Reihe Caspase-ähnlicher Proteine, deren gemeinsames Merkmal die CLD („Caspase Like Domain“) ist [Uren et al, 2000]. Neben der CLD besitzt Malt1 noch mehrere Proteininteraktionsdomänen wie die N-terminale „Death“-Domäne (DD) und zwei Ig-I („Ig like“-)Domänen. Über die Ig-I-Domänen bindet Malt1 an Bcl10 (Abbildung 1.9). Diese Wechselwirkung induziert die Oligomerisierung von Malt1 [Lucas et al, 2001]. Zusätzlich interagiert die Malt1-CLD mit der

CC-Region von Carma1 [Che et al, 2004]. Obwohl die Überexpression von Malt1 allein keine NF- $\kappa$ B-Reporteraktivierung verursacht, wird die auf Bcl10-Überexpression basierende NF- $\kappa$ B-Reporteraktivität durch Koexpression von Malt1 synergistisch verstärkt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass beide Proteine gemeinsam im gleichen Signalweg eine Rolle spielen. Der Synergismus bei der Aktivierung geht verloren, wenn die CLD von Malt1 inaktiviert oder die Malt1-Oligomerisierung via Bcl10 verhindert wird [Lucas et al, 2001].



**Abbildung 1.9 Schematische Darstellung der CBM-Komplexkomponenten.** Die Interaktion zwischen Bcl10 und Carma1 wird durch CARD-CARD Wechselwirkung vermittelt. Malt1 bindet über die Ig-I Domänen an Bcl10 und über die CLD an Carma1.

Neben den angesprochenen, das Bcl10-Gen betreffende Mutationen werden zwei weitere DNA-Translokationen, t(14;18)(p32;p21) und t(11;18)(p21;q21), mit der Entwicklung von MALT-Lymphomen in Verbindung gebracht. Diese betreffen das Malt1-Gen und treten anteilig häufiger auf als die Bcl10-assoziierten Translokationen [Ho et al, 2005]. Bei t(14;18)(p32;p21) kommt es, ähnlich wie bei Bcl10, zur Überexpression von Malt1 durch Verschiebung des Malt1-Gens in die Nähe der *Ig-loci* [Streubel et al, 2003]. Im Gegensatz dazu wird bei t(11;18)(p21;q21) der C-terminale Teil des Malt1-Gens inklusive der CLD-kodierenden Region mit dem N-terminalen Teil des *cIAP2*-Gens („Inhibitor Of Apoptosis 2“), einem Caspase Inhibitor, zusammengebracht [Uren et al, 2000]. Dies führt zur Expression eines *cIAP2*-Malt1-Fusionsproteins, welches ein potenter NF- $\kappa$ B-Aktivator ist und wahrscheinlich zur malignen Transformation der B-Zellen beiträgt [Dierlamm et al, 1999]. Es wird angenommen, dass die ursprünglich Bcl10-abhängige Oligomerisierung von Malt1 nun durch homotypische Interaktion der *cIAP2* BIR („Baculovirus IAP Repeat“)-Domänen ausgeführt wird und dadurch die Aktivierung der Malt1 CLD von extrazellulären Stimuli entkoppelt ist [Lucas et al, 2001].

Die Analyse Malt1-defizienter Mäuse deckt einen ähnlichen, auf Lymphozyten beschränkten Phänotyp wie bei Bcl10-defizienten Mäusen auf. Die Tiere zeigen eine vergleichbar hohe Anfälligkeit für Infektionen, da die Aktivierung und Proliferation reifer T-Zellen aufgrund einer selektiven Blockade der Antigenrezeptor-Signalwege unterbunden ist [Ruefli-Brasse et al, 2003]. Es zeigt sich, dass diese Defekte auf eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-aktivierenden Signalkette zurückzuführen sind. In T-Zellen einer unabhängig generierten Malt1-defizienten Mauslinie wurden zusätzlich zu den Defekten bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B auch Defekte bei der Aktivierung von MAP-Kinasen, die u.a. Einfluss auf die Regulation der AP-1 Aktivität nehmen, aufgezeigt [Ruland et al, 2003]. Die mechanistische Basis dieses Effekts ist jedoch derzeit noch nicht geklärt.

Die Antigenrezeptor-vermittelte Aktivierung von B-Zellen Malt1-defizienter Tiere ist ebenfalls gestört, obwohl bei direktem Vergleich beider Studien die Schwere des Phänotyps in Bezug auf die Inhibition der Stimulus-abhängigen NF- $\kappa$ B Induktion variiert. Es ist allerdings unbestritten, dass Malt1 in T-Zellen ein zentraler Regulator der Antigenrezeptor-aktivierten IKK/NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ist.

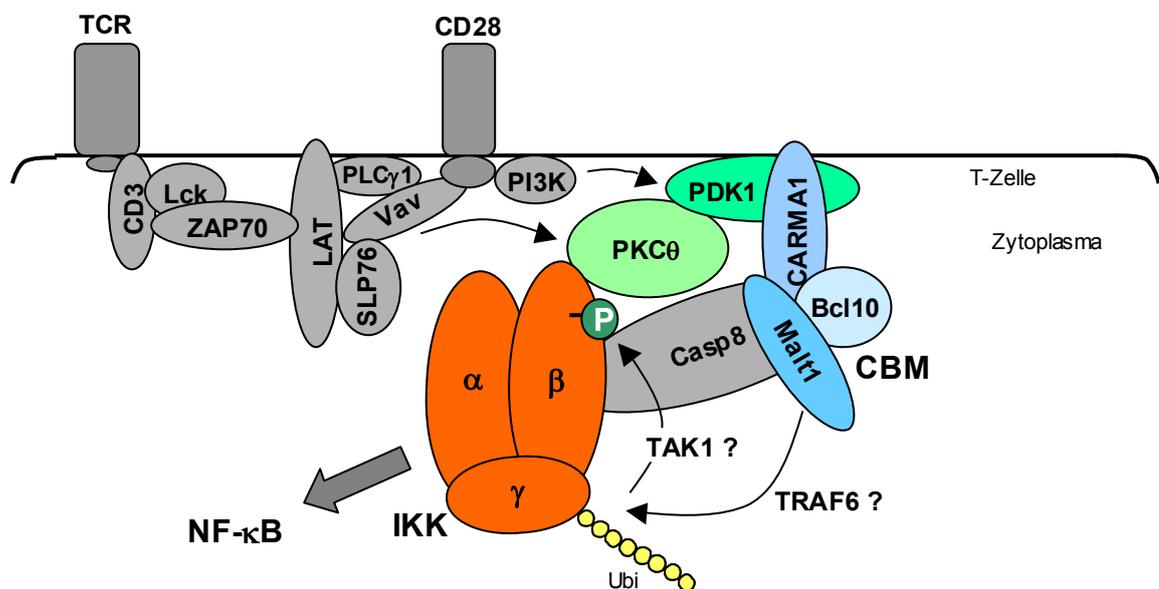
#### **1.3.3.4 Die Funktion von Carma1, Bcl10 und Malt1 bei der Aktivierung des IKK-Komplexes**

Über die mechanistischen Details, die zur TCR/CD28-induzierten Aktivierung des IKK-Komplexes führen, liegen widersprüchliche Berichte vor. In einer der publizierten Studien wird ein Mechanismus basierend auf der Oligomerisierung beteiligter Signalproteine vorgeschlagen [Sun et al, 2004]. Die Autoren beobachten, dass Malt1 an TRAF6 bindet, eine E3-Ubiquitin-Ligase, die bereits im Zusammenhang mit IL-1-vermittelter NF- $\kappa$ B-Aktivierung erwähnt wurde. Die Bcl10-abhängige Oligomerisierung von Malt1 führt daher ebenfalls zur Oligomerisierung von Malt1-gebundenem TRAF6. Dies löst K63-Autoubiquitinierung von TRAF6 aus und zieht, wie im IL-1-vermittelten Signalweg, die Aktivierung von TAK1 und Phosphorylierung von IKK $\beta$  nach sich (Abbildung 1.10). Allerdings scheint die Voraussetzung für effiziente Aktivierung des IKK-Komplexes zu sein, dass TRAF6 nicht nur sich selbst, sondern parallel auch IKK $\gamma$ , die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, K63-polyubiquitiniert. Die Autoren schlagen vor, dass die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  wiederum die Phosphorylierung von IKK $\beta$  durch TAK1 erleichtert. Da TRAF6-defiziente Mäuse keinen signifikanten Defekt bei der Aktivierung von T-Zellen zeigen, steht der tatsächliche Nachweis der physiologischen Relevanz dieser Beobachtungen noch aus.

Möglicherweise erschweren die strukturelle und funktionelle Redundanz der TRAF-Proteine derartige Analysen.

In einer unabhängigen Studie werden Daten präsentiert, die ebenfalls Antigenrezeptor-vermittelte K63-Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  als Voraussetzung für IKK-Aktivierung in T-Zellen identifizieren. Allerdings werden hier nicht TRAF-Proteine als Ubiquitin-Ligasen für IKK $\gamma$  vorgeschlagen. Vielmehr legen die Daten nahe, dass die CLD von Malt1 Ubiquitin-Ligaseaktivität besitzt und IKK $\gamma$  direkt von Malt1 ubiquitiniert wird [Zhou et al, 2004].

Kürzlich wurde der Apoptose-Regulator Caspase 8 (Casp8) als ein weiterer essentieller Mediator der T-Zell Aktivierung beschrieben, obwohl die exakte mechanistische Funktion des Proteins noch nicht aufgeklärt werden konnte. Allerdings bindet Casp8 Signal-induziert sowohl an den CBM- als auch an den IKK-Komplex und übt dadurch möglicherweise eine Brückenfunktion als Komplexstabilisator aus. In Caspase8-defizienten Zellen ist die Wechselwirkung der beiden Komplexe gestört, wodurch eine selektive Blockade der TCR/CD28-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung auftritt [Su et al, 2005]. Obwohl Inaktivierung von Casp8 die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  nicht unterbindet, tritt weder IKK $\beta$ - noch IKK $\alpha$ -Phosphorylierung auf. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  allein nicht zur Aktivierung des IKK-Komplexes ausreicht.



**Abbildung 1.10** Schematische Darstellung der Prozesse, die nach Kostimulation von T-Zellen zur Aktivierung des IKK-Komplexes führen. PDK1 rekrutiert über PKC $\theta$  den IKK-Komplex und über Carma1 den CBM-Komplex an die Membran. Der genaue Mechanismus zur Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  und zur Phosphorylierung von IKK $\beta$  ist nicht bekannt, könnte aber in Anlehnung an die TNFR1/IL-1R-aktivierten Signalketten TRAF6 und TAK1 involvieren.

## 1.4 Zielsetzung

Die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie sind zentrale Regulatoren der angeborenen und adaptiven Immunantwort, da sie die Expression einer Vielzahl von Genen steuern, die proinflammatorische Wirkung haben oder die Aktivierung von Lymphozyten regulieren. Die kostimulative Aktivierung von T-Zellen, die zytotoxische oder Antikörper-vermittelte Mechanismen der adaptiven Immunabwehr einleiten, ist hierbei von besonderem Interesse. Durch genetische Inaktivierung in Mäusen sind unlängst eine Reihe von Proteinen identifiziert worden, die in essentieller Weise Einfluss auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in T-Zellen ausüben und daher wesentliche Funktionen bei der produktiven T-Zellantwort übernehmen. Im Besonderen sind dabei drei Proteine zu nennen, Carma1, Bcl10 und Malt1, die funktionell in die Aktivierung des IKK-Komplexes, einer der wichtigsten Schaltstellen der NF- $\kappa$ B aktivierenden Signalkette, involviert sind.

Aufgrund von Interaktionsstudien mittels Protein-Überexpression in nicht-lymphoiden Zellen wurde postuliert, dass die Bildung eines Komplexes aus Carma1, Bcl10 und Malt1 Voraussetzung für die Aktivierung von IKK/NF- $\kappa$ B ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bildung des CBM-Komplexes in T-Zellen unter physiologischen Bedingungen nachzuweisen. Weiterhin sollten molekulare Mechanismen identifiziert werden, die im Zusammenhang mit Carma1, Bcl10 und Malt1 die Aktivität der Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade modulieren. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen sollte hierbei die Analyse möglicher posttranslationaler Modifikationen der CBM-Komplexkomponenten und deren funktionelle Charakterisierung in Zellkultur- und Tiermodellen sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Zubehör

Agarosegelkammern	BioRad
Brutschränke	Memmert
CO <sub>2</sub> Inkubator	Nuaire US Autoflow
	Binder
Drehrad	Herolab
Durchflusszytometer	FACScalibur BD
Elektroporationsküvetten	Biorad
Elektrotransfer	PHASE
FACS-Calibur	BD Biosciences
Feinwaagen	Sartorius BP 310S
	Sartorius AC 210P
	Scaltec SP061
Gefriergefäße	Nalgene
Geldokumentation	Herolab
Geltrockner	Savant Stacked Gel Dryer SGD 300
	Hofer Slab Gel Dryer GD2000
Heizblöcke	Techne DB3
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5417R
	Eppendorf 5402
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Magnetic Particle Concentrator 6	Dynal
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss
Mikroskop Zellkultur	Zeiss TELAVAL 31
Mikrotiterplatten	TPP
Streptavidin-Mikrotiterplatten	Biotez
Mikrowelle	Privileg 9029GD
N <sub>2</sub> -Behälter	CRONOS
Petrischalen	Peske Medizintechnik
pH-Meter	Knick
Photometer	Pharmacia Biotech GeneQuant II
	Pharmacia Biotech Novaspec II
Präzisionsküvetten	Hellma
Proteingelkammern	Biorad Mini Protean II Cell
PVDF-Membran	Millipore
Sequenzierautomat	Applied Biosystems 310

Spannungsquellen	Biorad Model 200/2.0 Power Supply ST305 Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS3500
Sterilbank	BDK
Szintillationszähler	Beckmann LS 6000LL
Thermocycler	Biometra T3
Thermomixer	Eppendorf 5436
Tiefkühlshränke	Forma Scientific
Tischzentrifugen	Eppendorf 5416 IEC MicroMax
Überkopffrotator	Neolab
UV-Tisch	Biometra TI 2
Vortex	Heidolph Reax 2000
Warmluftschüttler	Infors HT
Wasserbäder	Haake F3 Julabo MP
Zellkulturschalen	TPP
Zentrifugen	Beckmann Avanti J-25 Beckmann J6-HC

## 2.2 Chemikalien

[32P]-dATP	NEN (Perkin Elmer)
[32P]- $\gamma$ -ATP	Amersham Biosciences
ALLN	Calbiochem
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Roche
Bay 11-7085	Calbiochem
Bacto-Agar	Roth
Bacto-Hefeextrakt	Roth
Bacto-Tryptone	Roth
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Bradford Reagenz	Biorad
Bromphenolblau	Biorad
mCD4 (L3T4)-beads	Dynal
Celltag	BD Pharmingen
Cycloheximide	Calbiochem

Detachabeads mCD4	Dynal
diverse Chemikalien	Roth, Sigma
DMEM	PAA
DMSO	Sigma
DNA-Längenstandard	Invitrogen
dNTPs	Amersham Biosciences
DTT	Sigma
Ethidiumbromid	Roche
Ficoll Paque Plus	Pharmacia Biotech
Fix-und-Perm	Caltag
Fötale Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, PAA
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences
mIL-2	Roche
Isopropyl- $\beta$ -D-galactosid (IPTG)	Biomol
Kanamycin	PAA
$\lambda$ -Phosphatase	New England Biolabs
Leupeptin	Calbiochem
L-Glutamin	PAA
Lipofectamine 2000	Invitrogen
diverse Lösungsmittel	Roth
MG-132	Calbiochem
NEM	Roth
Na-Pyruvat	PAA
NP-40	Fluka
PMA	Calbiochem
Pefabloc	Roche
Penicillin/Streptomycin	PAA
PepstatinA	Calbiochem
poly dIdC	Roche
Protease-Inhibitoren	Roche
Proteinmolekulargewichtsmarker	Biorad, MBI Fermentas
Protein-A-Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences
Protein-G-Sepharose	Amersham Biosciences
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Röntgenfilmentwickler	Sigma
Röntgenfilmfixierer	Sigma
RPMI 1640	PAA
SAP	New England Biolabs
sc-514	Calbiochem
TEMED	Biorad
TNF $\alpha$	Biomol

Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA
Tween 20	Sigma

## 2.3 Enzyme und Kits

AmpliTaq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems
BigDye Terminator Cycle Sequencing	Applied Biosystems
human CD4 <sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech
DeepVent-DNA-Polymerase	New England Biolabs
Dual luciferase Reporter Assay System	Promega
Klenow-Polymerase	usb
Pfu-Polymerase	Stratagene
Phototype-HPR Western Detection System	New England Biolabs
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen
QiaPrep Spin Mini Kit	Qiagen
random prime DNA labelling system	Amersham Biosciences
Restriktionsendonukleasen	GibcoBRL
	Amersham Biosciences
	New England Biolabs
Sequencer Kit v2.0/ v1.1	Applied Biosystems
Shrimp Alkaline Phosphatase	usb
T4-DNA Ligase	usb

## 2.4 Bakterien

### *E. coli* DH5 $\alpha$

*supE44,  $\Delta$ lacU169 ( $\pi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1* Gibco

### *E. coli* BL21(DE3)pLysS

F<sup>-</sup>, *hsdS, gal, ompT, r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>* Novagen

### LB-Kulturmedium

10 g/l Bacto tryptone, 5 g/l Bacto yeast extract, 5 g/l NaCl

### LB/Agar

LB mit 15 g/l Agar

### SOB-Kulturmedium

20 g/l Bacto-tryptone, 5 g/l Bacto-yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 6,7 – 7

### TB-Puffer

10mM PIPES pH 6,7, 55mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl

## **2.5 Eukaryontische Zelllinien**

HEK293	Humane Nierenepithel-Zelllinie
Jurkat	Humane T-Zell Lymphoblasten-ähnliche Zelllinie (Akute T-Zell Leukämie)
Phoenix	Verpackungs-Zelllinie zur Herstellung amphotroper Viren, HEK293-Derivat

## **2.6 Vektoren und Oligonukleotide**

### pEF4 flag

Stufenweise HindIII/KpnI-Klonierung von drei aufeinander folgenden flag-Sequenzen in pEF4HIS-C (Stratagene, D. Krappmann).

### pEF4 flagBcl10 WT

Humane cDNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. Vito), N-terminales Epitop, BamHI/XbaI-Klonierung des Restriktionsfragments in pEF4 flag .

### pEF4 flagBcl10 1-116, flagBcl10 1-140

N-terminales Epitop, BamHI/XbaI-Klonierung von Restriktions-Fragmenten aus pEF4HIS-C Bcl10 1-116 und pEF4 HIS-C Bcl10 1-140 (D. Krappmann) in pEF4 flag.

pEF4 flagBcl10 1-149, flagBcl10 1-159, flag Bcl10 1-180, flagBcl10 1-200, flagBcl10 1-220

N-terminales Epitop, BamHI/NotI-Klonierung von PCR-Fragmenten in pEF4 flag.

sense-Primer für alle folgenden Bcl10-Deletionsmutanten

5'-ataggatccgtggagcccaccgcaccgtccct

antisense-Primer flagBcl10 1-149

5'-tatgcgccgctgccctcagtttttcagagaaattac

antisense-Primer flagBcl10 1-159

5'-tatgcgccgcttctccttctggatggtacatgac

antisense-Primer flagBcl10 1-180

5'-tatgcgccgctacttctagaacaggcaaattcagag

antisense-Primer flagBcl10 1-200

5'-tatgcgccgagcccctgggtccccaggtctg

antisense-Primer flagBcl10 1-200

5'-tatgcgccgctcactagagtttgcacaagttcc

pEF4 flagBcl10 L41Q

BamHI/XbaI-Klonierung des Restriktions-Fragments aus pEF4HIS-C Bcl10 L41Q (D. Krappmann) in pEF4 flag.

pEF4 flagBcl10 2xA, flagBcl10 3xA, flagBcl10 5xA

Herstellung der DNA-Fragmente mittels PCR-basierter Mutagenese, BamHI/XhoI-Subklonierung der PCR-Fragmente in pcDNA3 flag, daraufhin partielle BamHI/XbaI-Restriktionsspaltung und Klonierung in pEF4 flag.

interner Primer flagBcl10 2xA

5'-caaattcagatgaggctaatttcgctgaaaaactgagggc

interner Primer flag Bcl10 3xA

5'-cgaacaacctcgccagagcaaatgcagatgagagtaatttc

interner Primer flagBcl10 5xA (template pEF4 flagBcl10 3xA)

5'-caaatgcagatgaggctaatttcgctgaaaaactgagggc

pEF4 Bcl10 Lysin-Mutanten

Stufenweise Einführung einzelner Mutationen mittels PCR-basierter Mutagenese, Subklonierung wie pEF4 flagBcl10 2xA (S. Jungmann).

pEF4 flagBcl10 WT, flagBcl10 5xA mit stillen Mutationen zur Unterbindung der shBcl10-Hybridisierung

Herstellung der DNA-Fragments mittels PCR-basierter Mutagenese, Subklonierung wie pEF4 flagBcl10 2xA

interner Primer flagBcl10 WT

5'-ggagccacgaacaatttaagtcgtagtaattcagatgagag

interner Primer flagBcl10 5xA

5'-ggagccacgaacaatttagcacgtgccaatgcagatgag

pGEX GSTBcl10 WT und GSTBcl10 1-140

N-terminales Epitop, BamHI/XhoI-Klonierung von Restriktions-Fragmenten aus pEF4HIS-C Bcl10 WT und pEF4 HIS-C Bcl10 1-140 (D. Krappmann) in pGEX 6P-1 (Amersham).

pGEX GSTBcl10 5xA

N-terminales Epitop, BamHI/XhoI-Klonierung des Restriktions-Fragments aus pEF4 flagBcl10 5xA in pGEX 6P-1 (L. Lavitas).

pGEX GSTIkB $\alpha$  1-53, GST IkB $\alpha$  1-53 S32/36A

Humane cDNA, N-terminales Epitop, Serine 32 und 36 bilden IKK $\alpha$ / $\beta$  Phosphoakzeptorpositionen.

pMSCV Thy1.1/flagBcl10 WT, Thy1.1/flagBcl10 5xA, Thy1.1/flagBcl10 L41Q

Die IRES-Sequenz des pMSCV-Vektors ermöglicht simultane Expression von Thy1.1 (CD90.1) und Bcl10; HindIII/NotI-Klonierung der Restriktionsfragmente aus pcDNA3flagBcl10 WT, pcDNA3flagBcl10 5xA und pcDNA3flagBcl10 L41Q über pENTR11+HindIII in pMSCV (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von V. Heissmeyer) unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen).

pRK5 mycIKK $\alpha$  WT, mycIKK $\beta$  WT, mycIKK $\alpha$  K/A, mycIKK $\beta$  K/A

humane cDNA (Tularik Inc.), N-terminales Epitop.

pRK5 mycNedd4 und mycNedd4 C/A

Humane cDNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Huibregste), N-terminales Epitop, Deletion der Aminosäuren 1-20.

pRK5 mycItch

Humane cDNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Birnbaum), N-terminales Epitop.

pHACbl-b

Humane cDNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Lipkowitz), N-terminales Epitop.

pRK5 mycMalt1

Humane cDNA, N-terminales Epitop, Sall/NotI-Klonierung des PCR-Fragments aus RZPD-Klon BM016367.

pcDNA4 tapMalt1

N-terminales Epitop, HindIII/XhoI-Klonierung des PCR-Fragments in pcDNA4tap (A. Oeckinghaus).

pcDNA4 tapCarma1

Humane cDNA, N-terminales Epitop, HindIII/NotI-Klonierung des PCR-Fragments in pcDNA4tap (A. Oeckinghaus).

pEF4 flagEGFP

N-terminales Epitop, BamHI/EcoRI-Klonierung des PCR-Fragments in pEF4 flag.

pPKC $\theta$  und pPKC $\theta$  A/E

Humane cDNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Baier)

pmU6 (Vektor-basierte RNA-Interferenz)

BbsI/XbaI-Klonierung hybridisierter sense- und antisense-Oligonukleotide in pmU6 (muriner U6 Promotor) .

shBcl10

s 5'-tttgcaacctctccagatcaaatttcaagagaatttgatctggagaggttggtttt

as 5'-ctagaaaaacaacctctccagatcaaatttctcttgaaatttgatctggagaggttg

shCarma1

s 5'-tttgcacatctaccccatcgtgctcttcaagagagagcacgatggggtagatgttttt

as 5'-ctagaaaaacatctaccccatcgtgctctctcttgaagagcacgatggggtagatg

shMalt1

s 5'-tttgtcactgtggttactggatgattcaagagatcatccagtaaacacagtgttttt

as 5'-ctagaaaaatcactgtggttactggatgatctcttgaatcatccagtaaacacagtga

shIKK $\beta$ -1

s 5'-tttgtggtgagcttaaatgaatgattcaagagatcattcattaagctcaccattttt

as 5'-ctagaaaaatggtgagcttaaatgaatgatctcttgaatcattcattaagctcacca

shIKK $\beta$ -2

s 5'-tttgggtggaagaggtggtgagcttcaagagagctcaccacctcttccacctttt

as 5'-ctagaaaaaggtggaagaggtggtgagctctcttgaagctcaccacctcttccacc

shIKK $\gamma$

s 5'-tttgtgcacctgccttcagaacagttcaagagactgttctgaaggcaggtgcatttt

as 5'-ctagaaaaatgcacctgccttcagaacagttcttgaactgttctgaaggcaggtgc

shNedd4

s 5'-tttgtccaagattggagagaccattcaagagatgggtctctccaatcttggattttt

as 5'-ctagaaaaatccaagattggagagaccatctcttgaatgggtctctccaatcttgg

shItch

s 5'-tttggacaacatgggatagaccttcaagagaggtctatcccatggtgttcttttt

as 5'-ctagaaaaagaacaacatgggatagacctctcttgaaggtctatcccatggtgttc

### Sequenzierungprimer

Sp6-Primer	5'-atttaggtgacactatag
T7-Primer	5'-taatacgactcactataggg
pGEX-5'GST	5'-ggcgaccatcctccaaaatcgg
BGH reverse	5'-tagaaggcacagtgcaggctg
M13 reverse	5'-cacaggaaacagctatgacat

### EMSA-Sonde (MHC Klasse I Promotor)

5'-gatccagggctggggattccccatctccacagg

gtccccgaccctaaggggtagaggtgtccctag-5'

## **2.7 Antikörper**

### primäre Antikörper

Bcl10 (H197)	Santa Cruz Biotech
Bcl10 (331.3)	Santa Cruz Biotech
Bcl10 (C17)	Santa Cruz Biotech
hCD3 (HIT3a)	BD Pharmingen
mCD3 $\epsilon$ (145-2C11)	BD Pharmingen

mCD3 $\epsilon$ (145-2C11)–Biotin	BD Pharmingen
mCD4 (L3T4)-PE	Southern Biotech
hCD28 (CD28.2)	BD Pharmingen
mCD28 (37.51)	BD Pharmingen
mCD28 (37.51)-Biotin	BD Pharmingen
c-myc (9E10)	Santa Cruz Biotech
c-myc (A14)	Santa Cruz Biotech
HA (Y-11)	Santa Cruz Biotech
I $\kappa$ B $\alpha$ (C-21)	Santa Cruz Biotech
IKK $\beta$	Cell Signaling
IKK $\gamma$ (FL-419)	Santa Cruz Biotech
mIL-2-APC	BD Biosciences
Itch	BD Biosciences
flagM2	Sigma
Malt1	Genentech
Malt1 (C-16)	Santa Cruz Biotech
p65	Biomol
PKC $\theta$	BD Pharmingen
Thy1.1-PerCP	BD Pharmingen
mTNF $\alpha$ -PE	BD Biosciences
Ubiquitin	Babco

#### sekundäre Antikörper

anti-Hamster	MP
anti-Kaninchen	JacksonImmunoResearch
anti-Maus	JacksonImmunoResearch
anti-Maus-APC	BD Pharmingen
anti-Maus IgG1	BD Pharmingen
anti-Maus IgG2a	BD Pharmingen
anti-Ziege	JacksonImmunoResearch

## **2.8 Rekombinante Proteine**

IKK $\beta$	affinitätsgereinigt aus SF6-Zellen (R. Dettmer)
-------------	---

## 2.9 Puffer und Lösungen

### Blotting-Puffer

48mM TRIS (pH8,3), 39mM Glycin, 20% Methanol, 0,037% SDS (w/v)

### Coomassie-Färbelösung

50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v), 0,025% Coomassie Brillant Blue

### Coomassie-Entfärbelösung

10% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)

### DNA-Probenpuffer (6x)

1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, 40%Glycerin (v/v), H<sub>2</sub>O

### EMSA-Puffer (2x)

40 mM HEPES (pH 7,9), 120 mM KCl, 8% Ficoll (v/v)

### PBS (Phosphate Buffered Saline)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### HBS (2x, HEPES Buffered Saline)

25 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### Hochsalz-Puffer

20mM HEPES (pH 7,9), 350 mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1% NP40, 10% Glycerol (v/v)

### Kinase-Reaktions-Puffer

20mM HEPES (pH 7,5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20µM ATP; Inhibitorzusätze: 20mM β-Glycerophosphat, 200µM NaVanadat, 1mM DTT

### Klenow-Puffer

10mM TRIS (pH 7,5), 1mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

### NP40-Lyse Puffer für Koimmunpräzipitationen

50mM HEPES (pH7,5), 150mM NaCl, 1mM Glycerol, 0,2% NP40; Inhibitorzusätze: 10 mM NaF, 8 mM β-Glycerophosphat, 1 mM DTT, 300µM NaVanadat, 1 Tablette/50ml Complete (Böhringer)

### OligoHybrid-Puffer

10mM TRIS (pH 7,4), 100mM NaCl

### Sammelgel

125mM TRIS (pH6,8), 5% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED

### SDS-PAGE Laufpuffer

25mM TRIS, 192mM Glycin, 0,1% SDS, pH 7,3

### SDS-Probenpuffer (4x)

125mM TRIS (pH6,8), 50% Glycerin, 6% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol

### Standard-Lyse-Puffer

20 mM TRIS (pH 8,0), 150mM NaCl, 1mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM EDTA, 0,5% NP40 ; Inhibitorzusätze : 10 mM NaF, 8 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 1 mM DTT, 200 $\mu$ M NaVanadat, 1 Tablette/50ml Complete (Böhringer)

### Sonifizierungs-Puffer

50mM TRIS (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,4 $\mu$ M Pefabloc

### Stripping-Puffer

0,2M Glycin, 0,1% SDS, 1% Tween20, pH2,2

### TAC (TRIS Ammonium Chlorid)-Lyse Puffer

20mM TRIS, 0,83%  $NH_4Cl$ , pH 7,2

### TBE (TRIS-Buffered-EDTA)

50mM TRIS, 50 mM Borsäure, 1mM EDTA

### Trenngel

375 mM TRIS (pH 8,8), 6-12% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,075% APS, 0,05% TEMED

### Triton-Lyse-Puffer für Ubiquitinierungsexperimente

50 mM TRIS (pH 7,5), 150mM NaCl, 0,5% Triton X100; Inhibitorzusätze: 10 mM NaF, 8 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 1 mM DTT, 100 $\mu$ M NaVanadat, 1 Tablette/50ml Complete (Böhringer), 30 mM NEM

## **2.10 Zellbiologische Methoden**

Zur Kultivierung der Zellen wurde ein Brutschrank verwendet, der konstante Umgebungsbedingungen (37°C, mindestens 90% Luftfeuchtigkeit und 5%  $CO_2$  (v/v)) gewährleistet und optimales Wachstum der Zellen ermöglicht. Um Kontaminationen durch Bakterien, Hefen oder Pilze zu vermeiden, wurden zellbiologische Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt.

### **2.10.1 Kultur adhärenter Zellen**

HEK293 Zellen wurden auf 60mm oder 100mm Zellkulturschalen unter Verwendung von Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, komplementiert mit 10% fötalem Kälber-

Serum („Fetal Calf Serum“, FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin) 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 3-minütige Inkubation in 1ml Trypsin/EDTA (0,5% Trypsin/0,5% EDTA in PBS) von der Platte abgelöst und in 10ml frischem Kulturmedium aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Nach adäquater Verdünnung mit Kulturmedium wurde die Zellsuspension erneut ausplattiert.

Phoenix-Verpackungszellen wurden auf 150mm Zellkulturschalen unter Verwendung von DMEM (komplementiert mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 50µM β-Mercaptoethanol) kultiviert. Die Passagierung erfolgte wie bei HEK293-Zellen unter Verwendung von 2ml Trypsin/EDTA je Platte.

### **2.10.2 Suspensionskultur von Jurkat T-Zellen**

Jurkat T-Zellen wurden in Zellkulturflaschen unter Verwendung von RPMI-Medium (komplementiert mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2% 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.

### **2.10.3 Aufreinigung und Kultur primärer Suspensionszellen**

Primäre Suspensionszellen wurden in Zellkulturflaschen unter Verwendung von RPMI Medium (komplementiert mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 50µM β-Mercaptoethanol) kultiviert.

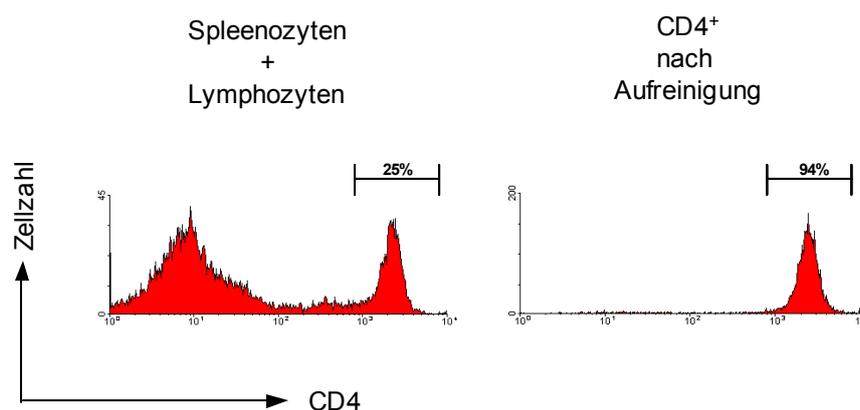
Humane PBMCs („Peripheral Blood Mononuclear Cells“) wurden aus frisch entnommenen Blut mittels Ficoll-Gradient Zentrifugation aufgereinigt. Hierzu wurde das Blut in einem 50ml Falcongefäß über vorgelegtes Ficoll-Paque geschichtet (Verhältnis 2:1) und danach 30 Minuten mit 2000 rpm („Rounds Per Minute“; ohne Bremse) bei 18°C zentrifugiert. Hierbei sammeln sich die PBMCs in der Interphase zwischen Ficoll und Medium. Die angereicherten Zellen wurden mit einer Pipette abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Medium resuspendiert. Humane PBMCs wurden maximal 24 Stunden in Kultur genommen.

Murine CD4<sup>+</sup> Zellen wurden durch Dyna-Beads-basierte Positivselektion aus der Milz sowie inguinalen, cervicalen und mesenterialen Lymphknoten isoliert. Bei über 95% dieser Zellen

handelt es sich um CD4<sup>+</sup> T-Zellen die mittels anschließender IL-2-induzierter Proliferation weiter angereichert wurden.

Das Dyna-Beads-Protokoll beruht auf der spezifischen Interaktion CD4-exprimierender Zellen mit mCD4-Antikörper beschichteten Partikeln (mCD4-Dyna-Beads). Da diese Partikel zusätzlich magnetisch sind, können gebundene Zellen im Magnetfeld aus einer Zellsuspension abgetrennt werden. Zur Herstellung der Zellsuspension wurden die Milz und Lymphknoten separat in gekühltem Medium zerkleinert, zwischen gläsernen Objektträgern homogenisiert und durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, 4°C) von Geweberesten befreit. Um rote Blutkörperchen abzutrennen, wurden die Milzzellen einer partiellen Zelllyse unterworfen. Hierfür wurde das Zellpellet in ungekühltem TAC-Lyse Puffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Unter diesen Bedingungen platzen die Erythrozyten aufgrund verminderter Fähigkeit zur Osmoseregulation. Die verbleibenden Spleenozyten wurden in PBS gewaschen und für die weitere Aufreinigung mit den Lymphozyten vereinigt.

Um die Bindung der Antikörperpartikel an die CD4<sup>+</sup> Zellen zu ermöglichen wurde die Zellsuspension je eingesetzter Maus für 30 Minuten mit 50µl CD4-Dyna-Beads inkubiert. Unter Verwendung eines „Magnetic Particle Concentrators“ wurden die gebundenen CD4<sup>+</sup>-Zellen anschließend im Magnetfeld von den restlichen Spleenozyten und Lymphozyten abgetrennt. Zur Elution der Zellen von den Beads wurden 20 µl CD4-Detachabeads pro Maus eingesetzt (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1** Dokumentation der Aufreinigung von murinen CD4<sup>+</sup>-Zellen. FACS-Analyse zur Bestimmung des Anteils von CD4<sup>+</sup>-Zellen vor und nach der Aufreinigung durch mCD4-Dyna-Beads aus einer Spleenozyten/Lymphozyten-Zellsuspension.

Die gereinigten CD4<sup>+</sup> Zellen wurden in Medium resuspendiert und für weiterführende Analysen in mCD3- und mCD28-Antikörper-beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Innerhalb von 30 Minuten setzen sich die Zellen auf dem beschichteten Plastik ab, wonach morphologische Veränderungen auftreten, die die Aktivierung der Zellen widerspiegeln. Nach 48 Stunden wurden die haftenden Zellen vom Flaschenboden abgeschabt und in frischem Medium mit IL-2 Zusatz (20 U/ml) resuspendiert. Durch verstärkt einsetzende Proliferation der T-Zellen stieg die Zellzahl, durch Zugabe von frischem Medium zwischen  $1 \times 10^6$  und  $3 \times 10^6$  gehalten, innerhalb der nächsten fünf Tage auf das 10- bis 30-fache an.

#### 2.10.4 Lagerung des Zellvorrats

Zur Bevorratung über längere Zeiträume wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden entweder HEK293-Zellen einer 75%ig konfluenten 100 mm Schale oder  $1 \times 10^7$  Suspensionszellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert, in 1ml Lagerungsmedium aufgenommen (DMEM/RPMI, 20% FCS, 15% DMSO) und in ein Gefriergefäß abgefüllt. In einem Gefriercontainer wurden die Proben über Nacht langsam auf  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

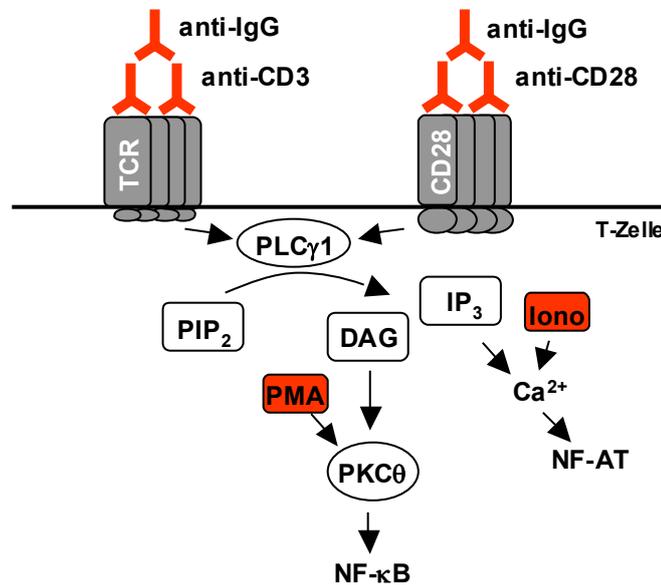
Bei Bedarf wurden die Zellen in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, zur Entfernung des DMSOs mit PBS gewaschen und in Kultur genommen.

#### 2.10.5 Zellstimulation

Stimulierende Reagenzien und Inhibitoren wurden dem Medium direkt zugesetzt. Stimulationszeiten oder Inhibitorvorlauf sind aus den Abbildungen der einzelnen Experimente ersichtlich. Zur Aktivierung von T-Zellen wurde auf zwei unterschiedliche Methoden zurückgegriffen (Abbildung 2.2).

1. Vernetzung des TCRs (CD3-Untereinheit) und des CD28-Kostimulationsrezeptors unter Verwendung spezifischer Antikörper. Auf diese Weise wird die *in vivo* durch den T-Zell/APC-Kontakt ausgelöste Rezeptoraggregation simuliert, was zur Aktivierung intrazellulärer Antigenrezeptor-spezifischer Signalkaskaden führt.
2. Stimulation durch PMA („Phorbol 12-Myristate 13-Acetate“) oder PMA/Iono (Ionomycin). PMA, ein Phorbolster mit struktureller Ähnlichkeit zu DAG, fungiert in T-Zellen als ein potenter Aktivator von PKC $\theta$  und damit auch von NF- $\kappa$ B. Iono hingegen

induziert wie  $IP_3$  den  $Ca^{2+}$ -Influx aus intrazellulären Speicherkompartimenten und nimmt hauptsächlich Einfluss auf die Aktivierung von NF-AT [Isakov und Altman, 1985; Kaibuchi et al, 1985; Truneh et al, 1985].



**Abbildung 2.2** Unterschiedliche Stimuli zur Aktivierung Antigenrezeptor-abhängiger Signalwege. 1. Rezeptor-Vernetzung durch spezifische Antikörper (anti-CD3/anti-CD28 und anti-IgG). 2. Direkte Aktivierung PKCθ-abhängiger Signaltransduktion durch PMA-Stimulation oder direkte Aktivierung PKCθ/ $Ca^{2+}$ -abhängiger Signaltransduktion durch PMA/Iono-Stimulation.

Falls nicht anders vermerkt, wurden folgende Konzentrationen der Substanzen eingesetzt:

ALLN	50 µg/ml
Bay 11-7085	20 µM
Ionomycin	300 ng/ml
Leupeptin	100 µM
MG132	25 µM
Pepstatin	100 µM
PMA	200 ng/ml
Rottlerin	30 µM
sc-514	100 µM
sp-600125	50 µM

Die Stimulation von Jurkat T-Zellen mit CD3/CD28-Antikörpern wurde in Lösung durchgeführt. CD3/CD28-Vernetzung wurde durch die Zugabe von IgG<sub>1</sub>-und IgG<sub>2a</sub>-Antikörpern ausgelöst. Folgende Antikörper-Konzentrationen wurden verwendet:

hCD3 (IgG <sub>2a</sub> )	1 µg/ml
hCD28 (IgG <sub>1</sub> )	5 µg/ml
anti-IgG <sub>1</sub>	2,5 µg/ml
anti-IgG <sub>2a</sub>	2,5 µg/ml

Die Stimulation von murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte unter Verwendung immobilisierter Antikörper entweder auf zuvor mit anti-Hamster-Antikörper beschichteten Zellkulturplatten nach Zugabe von mCD3/mCD28 Antikörpern (aus Armenischem/Syrischem Hamster) oder auf Streptavidin-beschichteten Zellkulturplatten (Firma Biotex) nach Zugabe von biotinylierten mCD3/mCD28-Antikörpern. Folgende Antikörper-Konzentrationen wurden verwendet:

mCD3	0,5 µg/ml
mCD28	1 µg/ml
mCD3 biotinyliert	5 µg/ml
mCD28 biotinyliert	2,5 µg/ml

Die Antikörper-Beschichtung erfolgte durch Inkubation der Platten über Nacht bei 4°C mit in PBS gelösten anti-Hamster-Antikörpern (0,3 mg/ml).

## 2.10.6 Transiente Transfektion

### CaPO<sub>4</sub>-Methode (HEK293, Phoenix)

CaPO<sub>4</sub>-Kristalle können während des Kristallwachstums in der Lösung enthaltene Plasmid-DNA einschließen. Zellen wiederum sind in der Lage, diese Kristalle aufzunehmen und exprimieren daraufhin die Plasmid-kodierten Proteine (ektopische Expression). Für die Transfektion einer 100mm Kulturschale mit HEK293 wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung 1      10µg Gesamt-DNA  
                 37µl 2M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (RT)  
                 mit H<sub>2</sub>O (RT) auf 300µl auffüllen

Lösung 2      300µl 2xHBS (pH 7,2; RT)

Für die Transfektion einer 100mm Kulturschale mit Phoenix-Zellen wurden folgende Lösungen verwendet:

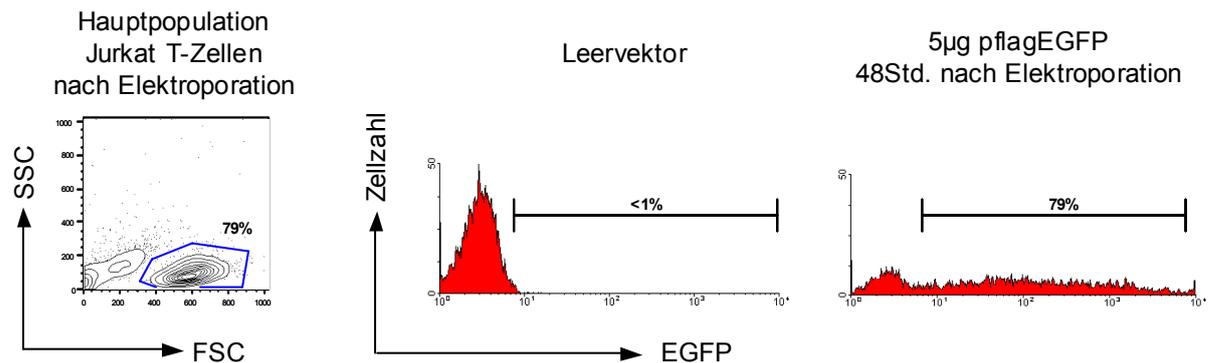
Lösung 1      20µg Gesamt-DNA  
                 50µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung (-20°C)  
                 mit H<sub>2</sub>O (RT) auf 500µl auffüllen

Lösung 2      500µl 2xHBS (pH 7,0; 4°C)

HEK293- und Phoenix-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion durch Passagieren so verdünnt, dass zum Zeitpunkt der Zugabe der Transfektionslösung eine maximale Konfluenz von 40% erreicht war. Zur Herstellung der Transfektionslösung wurde Lösung 2 in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter kontinuierlichem Mischen wurde Lösung 1 tröpfchenweise zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die Mischung gleichmäßig ins Medium der zu transfizierenden Zellen gegeben. Innerhalb von 30 Minuten sind unter dem Lichtmikroskop kleine Kristalle erkennbar. Für weiterführende Analysen wurden die Zellen mindestens 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

#### Elektroporation (Jurkat)

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  $1 \times 10^8$  Zellen in einer Elektroporations-Küvette (4 mm Spalt) mit 30 µg Gesamt-DNA gemischt und unter Verwendung eines Gene-Pulsers elektroporiert (200 V, 950 µF). Die Zellen wurden nach dem Puls in 10 ml Medium aufgenommen und mindestens 48 Stunden vor der Analyse im Brutschrank kultiviert (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3 Bestimmung der Transfektionsrate elektroporierter Jurkat T-Zellen.** Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl grün-fluoreszierender Zellen 48 Std. nach Elektroporation mit 5 µg EGFP-kodierendem Vektor gemessen. Zur Auswertung wurde die Hauptpopulation herangezogenen, als Referenz wurden Leervektor-transfizierte Zellen verwendet. Die Transfektionsrate lag konstant über 70%.

### 2.10.7 Präparation von Zellextrakten

Um zelluläre Proteine immunbiochemischen Analyseverfahren zugänglich zu machen, wurden die Zellen unter Verwendung spezieller Lyse-Puffer lysiert. Je nach Anwendung wurde NP40-Puffer für Immunpräzipitationen, Triton-Puffer für Ubiquitinierungsexperimente und Standard-Lyse-Puffer für allgemeine proteinbiochemische Analysen verwendet (siehe Material und Methoden 2.9). Adhärenente Zellen wurden mit bis zu 1ml Lysis-Puffer je 100mm Schale, Suspensionszellen mit bis zu 1ml je  $1,5 \times 10^7$  Zellen lysiert. Adhärenente Zellen wurden auf der Platte mit PBS gewaschen, in Lyse-Puffer abgeschabt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Suspensionszellen wurden pelletiert, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit PBS gewaschen und in Lyse-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen zur vollständigen Lyse 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C zur Abtrennung von Zellbruchstücken wurde das Lysat für weiterführende Analysen verwendet.

## 2.11 Nukleinsäuretechniken

### 2.11.1 PCR

Die PCR („Polymerase Chain Reaction“) ermöglicht eine Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte in einem Thermocycler, ohne auf Klonierungstechniken zurückzugreifen. Durch

geeignete Primerwahl lassen sich an den Enden des zu amplifizierenden Bereichs für weiterführende Subklonierung Restriktionschnittstellen einführen. Die verwendete Polymerase DEEP VENT gewährleistet durch zusätzliche Exonucleaseaktivität eine geringe Fehlerfrequenz bei der Produktsynthese. Für eine Standardreaktion wurden folgende Komponenten gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 50µl aufgefüllt:

Template-DNA	50 ng
sense- und antisense-Primer	je 50 pmol
dNTPs	je 400 µM
5x DEEP VENT Reaktionpuffer	5 µl
DEEP VENT Polymerase	1 U

Folgendes Thermocycler-Standardprogramm wurde für die Reaktionen verwendet:

1. 96°C, 5 Min.
2. 96°C, 30 Sek.
3. 55°C, 30 Sek.
4. 72°C, 60 Sek. je 1000 Basen zu amplifizierter DNA, zurück zu 2. (35 x)
5. 72°C, 3 Min.
6. 4°C, Pause

### **2.11.2 PCR-basierte Mutagenese**

Zur Einführung von Mutationen in Plasmid-kodierte cDNA wurden zwei gestaffelte Mutagenese-PCR-Reaktionen kombiniert. Die erste PCR-Reaktion wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei in der Regel ein 3' cDNA-flankierender Standard-Primer und ein cDNA-interner Mutagenese-Primer zum Einsatz kamen. Je Mutagenese-Primer wurden maximal sechs Basen ausgetauscht, wobei der mutierte Bereich von mindestens zehn nicht-mutierten Basen flankiert war. In der zweiten Mutagenese-PCR wurde das aufgereinigte Produkt der ersten PCR wiederum als Primer mit einem 5'-cDNA-flankierenden Standard-Primer eingesetzt. Für die zweite Mutagenese-PCR wurden folgende Komponenten gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 50µl aufgefüllt:

---

Template-DNA	1 ng
Standard-Primer	50 pmol
Produkt der ersten Mutagenese-PCR	750-facher molarer Überschuss zum Template
dNTPs	je 400 $\mu$ M
5x DEEP VENT Reaktionpuffer	5 $\mu$ l
DEEP VENT Polymerase	1 U

Das Produkt der zweiten Mutagenese-PCR, welches die vollständige cDNA inklusive eingeführter Mutationen enthält, wurde aufgereinigt und zur weiteren Verwendung subkloniert.

### **2.11.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarose-Gelelektrophoresen (1% Agarose in TBE) bei 90 V in TBE durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in DNA-Probenpuffer aufgenommen und zur Abschätzung der Fragmentgrößen gemeinsam mit einem DNA-Längenstandard aufgetragen.

### **2.11.4 Restriktionspaltung**

Die Fähigkeit von Restriktionsnukleasen, DNA Sequenz-spezifisch zu schneiden (Restriktionsspaltung), bildet die Grundlage molekularbiologischer Klonierungsarbeiten. In der Regel erkennen Restriktionsnukleasen spezifische palindromische DNA-Sequenzen und erzeugen 5'- oder 3'-Überhänge („Sticky Ends“) bzw. glatte Enden („Blunt Ends“) durch Hydrolisierung von Phosphodiesterbindungen. Für Restriktionsspaltungen wurden variable Mengen an zu linearisierendem Vektor oder gereinigtem PCR-Fragment und 5 bis 20 ng an Restriktionsenzym eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben wurden sowohl Einzel- als auch Doppelrestriktionsspaltungen innerhalb einer Stunde durchgeführt. Die Reaktion wurde entweder durch Hitzeinaktivierung der Enzyme oder durch Gelaufreinigung der DNA beendet.

### 2.11.5 Ligation und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Fusionierung von linearisierten Vektoren mit kürzeren DNA-Fragmenten wurde T4 DNA-Ligase verwendet. Dabei wurden 100ng an linearisiertem Vektor und ein drei- bis vierfacher molarer Überschuss an Fragment-DNA eingesetzt. In der Regel wurde eine einstündige Inkubation bei RT oder bei 16°C über Nacht durchgeführt, um ausreichende Mengen an ligiertem Produkt zu erhalten.

Bei einfach linearisierten Vektoren wurde vor der Ligation eine Dephosphorylierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase („Shrimp Alkaline Phosphatase“, SAP) durchgeführt, um die Religation des Vektors zu unterbinden. Falls nötig, wurde die Funktion von Restriktionsenzymen zuvor durch Hitzeinaktivierung (10-minütige Inkubation bei 70°C) zerstört. Die Zugabe der Phosphatase erfolgte direkt in den Restriktionsansatz, wobei 1 U SAP für die Dephosphorylierung von maximal 5 µg DNA eingesetzt wurde. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach zur Abtrennung der enthaltenen Enzyme über Affinitätssäulen oder Agarosegele aufgereinigt.

### 2.11.6 Bakterien-Übernachtskultur

Transformierte Bakterien wurden entsprechend der Plasmid-kodierten Resistenz in Antibiotikum-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C in einem Warmluftschüttler kultiviert. Die folgenden Antibiotika wurden zur Selektion resistenter Klone in der angegebenen Konzentration verwendet:

Ampicillin 100 µg/ml

Kanamycin 25 µg/ml

Zur Vereinzelung resistenter Klone wurden transformierte Bakterien entsprechend der Plasmid-kodierten Resistenz auf Antibiotikum-haltigem LB/Agar ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### 2.11.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien wurde die CaCl<sub>2</sub>-Methode verwendet. Hierzu wurden 250ml SOB-Medium mit 10ml einer *E.coli*-Übernachtskultur (LB/10 µg Tetracyclin) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 18°C im Schüttler inkubiert. Nach 10-minütiger Kühlung im Eisbad wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 2500xg für 10 Minuten bei

4°C pelletiert. Das Bateria pellet wurde darauf in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, weitere 10 Minuten auf Eis gekühlt, erneut zentrifugiert und in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Vor der Aliquotierung wurde die Suspension mit 1,9 ml DMSO (7% Endkonzentration) versetzt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Auf diese Weise hergestellte Bakterien zeigten eine Transformationsrate von  $1,5 \times 10^7$  Kolonien je  $\mu\text{g}$  transformierter DNA.

### **2.11.8 Transformation kompetenter Bakterien**

Kompetente Bakterien wurden durch Hitzeschock-abhängige DNA-Aufnahme transformiert. Hierfür wurden 100  $\mu\text{l}$  eiskalte Bakteriensuspension mit 50 ng Plasmid-DNA gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 1-minütigen Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C und anschließender kurzer Eiskühlung wurden 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium zum Transformationsansatz gegeben. Es folgte eine Inkubation im Schüttler für eine Stunde. Die Bakteriensuspension wurde danach entweder zur Selektion transformierter Klone auf Antibiotikum-enthaltendem LB-Agar ausgestrichen oder zur Vermehrung direkt in Antibiotikum-enthaltendes LB-Medium gegeben und über Nacht im Warmluftschüttler inkubiert.

### **2.11.9 DNA-Aufreinigung**

#### DNA-Aufreinigungs-Kits

Für die Aufreinigung kleiner Mengen DNA wurden Affinitätssäulen der Firma Qiagen je nach Anwendung und Vorschrift des Herstellers verwendet.

PCR-Fragmente, DNA-Sonden	QIAquick PCR Purification Kit
Gel Extraktion	QIAquick Gel Extraction Kit

Für die Aufreinigung größerer Mengen DNA wurde das Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit verwendet. Hierfür wurden 200 ml bakterielle Übernachtskultur zur Plasmid-DNA Reinigung über tip500 Säulen nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Die gereinigte DNA wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  zu einer Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  aufgenommen.

Zum Screenen von Bakterienkolonien wurden Plasmid Mini-Präparationen wahlweise unter Verwendung des QiaPrep Spin Mini Kits oder mittels Ethanol-Fällung bakterieller Plasmid-DNA durchgeführt.

#### DNA Mini Präparationen mittels Plasmidfällung durch Ethanol

Bakterien einer Übernachtskultur (2ml) wurden durch Zentrifugation für eine Minute bei 14000 rpm pelletiert und nach Vorschrift des QiaPrep Spin Mini Kits aufgenommen und lysiert. Dem neutralisierten Lysat wurde dann die doppelte Menge an gekühltem Ethanol (-20°C) zugesetzt. Die präzipitierte DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm abgetrennt, einmalig ohne Resuspendierung mit 70%igem Ethanol (RT) gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.11.10 Hybridisierung von Oligonukleotiden**

Oligonukleotide wurden in OligoHybrid-Puffer unter Mischung äquimolarer Mengen hybridisiert. Nach 5-minütigem Aufkochen in einem Heizblock wurde die Reaktionsmischung durch Unterbrechung der Stromzufuhr langsam auf RT abgekühlt.

#### **2.11.11 Radioaktive Markierung von DNA-Enden**

Zur Auffüllung 5'-überhängender Enden doppelsträngiger DNA-Oligonukleotide wurde das Klenow-Fragment der *E.coli* Polymerase I verwendet. In einem Standardansatz wurden folgende Komponenten in 25 µl Klenow-Puffer gemischt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert:

DNA	200 ng
dCTP, dGTP, dTTP	je 250 µM
α[ <sup>32</sup> P]dATP	40 µCi
Klenow-Enzym	1 U

Vor Messung der Strahlungsintensität im Szintillationszähler wurde der Reaktionsansatz unter Verwendung des Qiaquick Nucleotide Removal Kits von freien Nukleotiden befreit.

### 2.11.12 DNA-Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren weisen ein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-Bereich mit einem Maximum bei 260 nm Wellenlänge ( $OD_{260}$ ) auf. Verunreinigungen durch Proteine, die ein Absorptionsmaximum bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) besitzen, können durch Bestimmung des OD-Quotienten abgeschätzt werden. Hierbei gilt:

1. 1  $OD_{260}$  entspricht 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  doppelsträngiger DNA, bzw. 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  einzelsträngiger DNA oder RNA, bzw. 20-25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Oligonukleotid
2. der OD-Quotient nicht kontaminierter doppelsträngiger DNA liegt zwischen 1,5 und 2

### 2.11.13 Kapillar-Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wurde ein Kapillar-Sequenzierungsautomat der Firma Applied Biosystems eingesetzt. DNA-Produkte für die Kapillar-Auftrennung wurden mittels PCR des zu sequenzierenden Templates unter Verwendung der Kettenabbruch-Methode fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide hergestellt. Für eine Standard-PCR wurden folgende Komponenten gemischt und auf 10  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt:

DNA	300 ng
Primer	5 pmol
5x Sequencing Puffer	2 $\mu\text{l}$
ABI PRISM BigDye Terminator v1.1	0,5 $\mu\text{l}$

Folgendes PCR-Standardprogramm wurde für Sequenzier-Reaktionen verwendet:

1. 95°C, 3 Min.
2. 95°C, 35 Sek.
3. 50°C, 12 Sek., zurück zu 2. (35 x)
4. 60°C, 4 Min.
5. 4°C, Pause

Die PCR-Produkte wurden per Ethanol-fällung aufgereinigt, in Template Suppression Reagent aufgenommen und 2 Minuten zur Denaturierung bei 90°C inkubiert. Die Bedienung des Sequenzier-Automaten erfolgte nach Vorschriften des Herstellers.

## **2.12 Proteinchemische und immunologische Methoden**

### **2.12.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Kolorimetrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden mit Protein Dye Reagent Concentrate der Firma Biorad durchgeführt. Das Protokoll beruht auf Extinktions-Messung bei 595 nm der nach Herstellerangaben behandelten Proben. Die erhaltenen Werte wurden anschließend zur Abschätzung der effektiven Proteinkonzentration mit BSA-Standardwerten verglichen.

### **2.12.2 SDS-PAGE**

Proteine einer Probe wurden unter Anwendung der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Der Vernetzungsgrad der verwendeten Gele wurde durch Variation der Acrylamid-Prozentigkeit den individuellen Erfordernissen angepasst. Durch Überschichten des Trenngels im nicht polymerisierten Zustand mit Isobutanol wurde ein gleichmäßiger Übergang zwischen Sammel- und Trenngel gewährleistet. In das Sammelgel wurden Käbme mit bis zu 15 Taschen eingepasst. Die Proteinproben wurden in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und zur Denaturierung vor dem Auftragen 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden vorgefärbte Molekulargewichts-Standards aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in SDS-PAGE Laufpuffer bei maximal 150 V durchgeführt und nach Gelaustritt der Bromphenolblau-gefärbten Lauffront beendet.

### **2.12.3 Coomassie-Färbung**

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können durch direkte Färbung im Gel sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die Gele 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung inkubiert und darauf partiell durch mehrmalige Behandlung mit Coomassie-Entfärbelösung

entfärbt. Anschließend wurden die Gele in Zellophan auf einem Vakuumtrockner bei 80°C getrocknet.

#### **2.12.4 Western Blot**

Zum immunologischen Nachweis wurden per SDS-PAGE aufgetrennte Proteinen 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 Blotting-Puffer-getränkten Filterpapieren zwischen den Elektroden plaziert und 60 bis 90 Minuten bei RT einer Stromstärke von 60 mA je Gel ausgesetzt.

#### **2.12.5 Immunologischer Proteinnachweis**

Der immunologische Nachweis bestimmter Membran-fixierter Proteine erfolgte über Protein-spezifische Erst- und Erstantikörper-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 entweder eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit PBST gewaschen und dann eine Stunde bei RT mit Erstantikörper-spezifischem Zweitantikörper in 1,5%BSA/PBST inkubiert. Die verwendeten Zweitantikörper sind an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Während der Peroxidase-Reaktion mit Substrat wird elektromagnetische Strahlung freigesetzt, die durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert wurde. Als Phosphatase-Substratlösung wurde PhototypeR-HRP System unter Berücksichtigung der Herstellerangaben eingesetzt. Die Membran kann nach Ablösen der gebundenen Antikörper durch Inkubation in Stripping-Puffer über Nacht bei 4°C erneut verwendet werden.

#### **2.12.6 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine**

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden 100 µl kompetente BL21-Bakterien mit pGEX-Expressionsvektor transformiert und Ampicillin-resistente Klone über Platten-Selektion identifiziert. Anschließend wurden ausgehend von einer Einzelkolonie 40 ml Übernachtkultur angelegt, die am nächsten Tag mit 360 ml LB-Medium verdünnt wurde. Bei

Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (0,4 mM Endkonzentration) induziert. Für maximale Ausbeute an GST-Fusionsprotein wurde die Kultur anschließend weitere drei Stunden bei 37°C im Warmluftschüttler inkubiert.

### **2.12.7 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

Die Aufreinigung bakteriell-exprimierter GST-Fusionsproteine erfolgte über Glutathion-Sepharose. GST-Fusionsprotein exprimierende Bakterien wurden pelletiert und in Sonifizierungs-Puffer resuspendiert. Auf Eis wurde die Bakteriensuspension zweimal 5 Minuten bei einer Amplitude von 70% in 15-sekündigen Intervallen sonifiziert. Durch anschließende 30-minütige Zentrifugation wurden Zellbruchstücke abzentrifugiert und die im Überstand befindlichen GST-Fusionsproteine durch Inkubation mit Glutathion-Sepharose für zwei Stunden bei 4°C gebunden. Nach Pelletierung der Sepharose wurden die gebundenen Proteine dreimal mit kaltem Sonifizierungs-Puffer gewaschen und schrittweise mit reduziertem Glutathion (20 mM in Sonifizierungspuffer) von der Sepharose-Matrix eluiert.

### **2.12.8 Immunopräzipitationen**

Immunopräzipitationen werden zur Untersuchung von Protein-Modifikationen 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 Zelllysat unter Verwendung von Immunglobulin-bindender Sepharose per Fällung erlaubt. Bei weiterführender Analyse des Präzipitats mittels SDS-PAGE und Western Blot besteht die Möglichkeit u.a. Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungstatus des gefällten Proteins zu untersuchen, aber auch Protein-Protein-Interaktionen mit assoziierten Bindungspartnern nachzuweisen.

Zelllysate wurden wie beschrieben unter Verwendung von NP40- oder Triton-Lyse-Puffer angefertigt. Zur Abtrennung unspezifisch bindender Komponenten wurde das Lysat ohne Zugabe des Antikörpers 30 Minuten bei 4°C mit 20 µl Protein G-Sepharose Suspension (1:1 in PBS) inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend durch Zentrifugation (1 Min., 1000rpm, 4°C) pelletiert und verworfen. Die eigentliche Immunopräzipitation wurde nach Zugabe von bis zu 2 µg Antikörper zum gereinigten Lysat über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zur Isolation des Antikörper/Protein-Komplexes wurden am nächsten Tag 30 µl Protein G-Sepharose Suspension addiert. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation unter Kühlung wurde die

Sepharose durch Zentrifugation pelletiert und dreimal mit eiskaltem Lyse-Puffer gewaschen. Um konstante und möglichst kleine Auftragsvolumina zu erhalten, wurde die Sepharose anschließend unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe trockengesaugt, in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Die erhaltenen Proben wurden weiterführend per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

### **2.12.9 Nachweis Ubiquitin-konjugierter Proteine**

Zur Analyse der Ubiquitinierung endogener und ektopisch-exprimierter Proteine wurden mindestens  $5 \times 10^6$  Jurkat T-Zellen oder eine 100mm Schale HEK293-Zellen je Ansatz pelletiert und wie beschrieben in Triton Lyse-Puffer lysiert. Das erhaltene Lysat wurde in Anwesenheit von NEM (N-Ethylmaleimide, 20 mM) einer Immunopräzipitation unterzogen. Da NEM die Aktivität von deubiquitinierenden Enzymen hemmt, ermöglicht es die Detektion von ubiquitinierten Proteinen mit spezifischen Ubiquitin-Antikörpern nach SDS-PAGE und Westen-Blot.

### **2.12.10 *In vitro* Kinasereaktionen**

In *in vitro* Kinasereaktionen wurde die Fähigkeit von Kinasen analysiert, bakteriell exprimierte und gereinigte Substrate zu phosphorylieren. Hierbei kamen in erster Linie IKK-Immunopräzipitate aus ruhenden und aktivierten Jurkat T-Zellen zum Einsatz, deren Herstellung in NP40 Lyse-Puffer bereits beschrieben wurde. Für *in vitro* Kinasereaktionen wurden die Präzipitate durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem Kinase-Reaktions-Puffer umgepuffert und schließlich in 15µl Kinase-Reaktions-Puffer aufgenommen. Die Kinasereaktion wurde nach Zugabe von 1 µg rekombinantem Substratprotein und 3 µCi [ $^{32}$ P]γATP für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Durch Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer und 5-minütigem Erhitzen auf 95°C wurde die Reaktion gestoppt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und radioaktiv-markierte Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht, wobei der Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard die Zuordnung der Signale ermöglicht.

### 2.12.11 Gelretardationsexperiment

DNA-Fragmente wandern in einem nativen Polyacrylamidgel nach dem Anlegen einer Spannung zur Anode. Bei Anwesenheit DNA-bindender Proteine verlangsamt sich die Laufgeschwindigkeit, es kommt zur Retardierung. Unter Verwendung radioaktiv-markierter DNA-Oligonukleotide lassen sich auf diese Weise geringe Mengen an DNA/Protein-Komplexen sichtbar machen („Electrophoretic Mobility Shift Assay“, EMSA).

Zur Präparation von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen in Hochsalz-Puffer lysiert. Für einen Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt und auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt:

Gesamtprotein	2 bis 4 µg
radioaktiv-markiertes Oligonukleotid	10000 bis 20000 cpm
BSA (10 mg/ml)	0,2 µl (2 µg)
DTT (100 mM)	0,4 µl
Poly(dI-dC) (2µg/µl)	1 µl
2x EMSA-Puffer	10 µl

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei RT inkubiert und auf ein natives Polyacrylamidgel (5% Polyacrylamid in TBE) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 25 mA in TBE als Laufpuffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier vakuumgetrocknet und eine Autoradiographie angefertigt.

### 2.12.12 Färbung von Oberflächenproteinen

Die Expressionsanalyse von Zelloberflächen-Proteinen wurde unter Verwendung Protein-spezifischer Erst- und Fluorophor-markierter Zweitantikörper mittels FACS („Fluorescence Activated Cell Sorting“)-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden mindestens  $0,2 \times 10^6$  Zellen pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und 15 Minuten auf Eis in Erstantikörperlösung (2 µg/ml in PBS/5%FCS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/5%FCS wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis in Zweitantikörperlösung (2 µg/ml in PBS/5%FCS) inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Unter Verwendung eines BD FACS-Caliburs wurde die Anzahl spezifisch gefärbter Zellen ausgezählt.

### **2.12.13 Intrazelluläre Proteinfärbung**

Die Untersuchung intrazellulärer Proteine mittels FACS-Analyse wurde unter Verwendung fixierter und permeabilisierter Zellen nach Behandlung mit Protein-spezifischem Erst- und Fluorophor-markiertem Zweitantikörper durchgeführt. Für die Analyse wurden mindestens  $1 \times 10^6$  Jurkat T-Zellen pelletiert und einmal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l Fix-und-Perm Lösung A aufgenommen und 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS/5%FCS wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Fix-und-Perm Lösung B resuspendiert, Erstantikörper in einer Konzentration von 8  $\mu$ g/ml zugegeben und 20 Minuten bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut mit PBS/5%FCS gewaschen, in 100  $\mu$ l PBS/5%FCS mit 2  $\mu$ g/ml anti-Maus-APC Zweitantikörper aufgenommen und anschließend 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die intrazelluläre Proteinfärbung unter Verwendung eines BD FACS-Caliburs analysiert.

### **2.12.14 Konfokal-Mikroskopie**

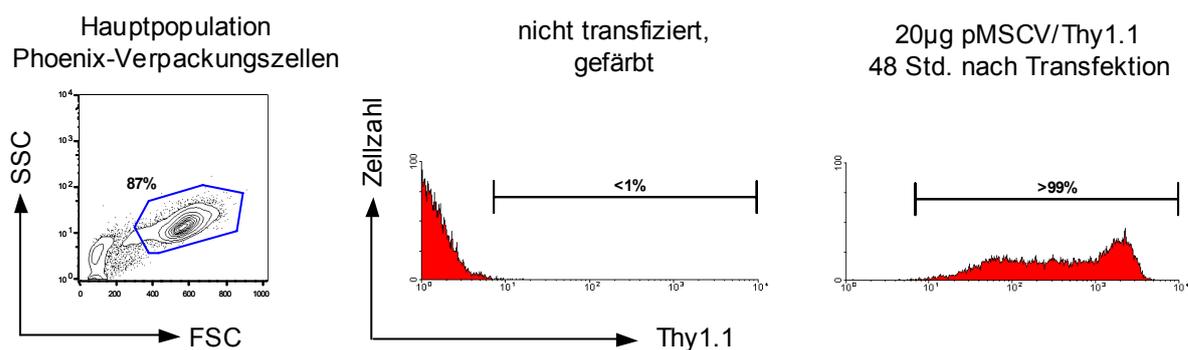
Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Jurkat T-Zellen auf zuvor mit BD-Celltag behandelten Objektträgern ausgesät und nach dem Anhaften am Träger stimuliert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 15 Minuten in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und zur Permeabilisierung 5 Minuten in 0,1%iger Triton X100-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zuerst 30 Minuten mit anti-Bcl10 Erstantikörperlösung (333.1, 1:100) und nach zweimaligem Waschen in PBS 30 Minuten mit anti-Maus Zweitantikörperlösung (Indocarbocyanin (Cy3)-markiert, 1:100) behandelt. Nach erneutem Waschen in PBS wurde die intrazelluläre Proteinverteilung von Bcl10 mit einem Axioplan 2 Mikroskop nach Vorschrift des Herstellers analysiert.

### **2.12.15 Retrovirale Infektion Bcl10-defizienter CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Zur Anreicherung von amphotropen Retroviren in Zellkultur-Überständen wurden Phoenix-Verpackungszellen verwendet. Die zu infizierenden Bcl10-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie beschrieben unter Verwendung von mCD4-Dyna-Beads aus Bcl10 „Knock Out“-Mäusen aufgereinigt. Zur besseren Übersicht ist die zeitliche Abfolge der einzelnen, zur erfolgreichen Infektion erforderlichen Schritte in Abbildung 2.6 wiedergegeben.

Die Phoenix-Zellen wurden wie beschrieben auf 100mm Schalen transfiziert. Hierfür wurden pMSCV-Vektoren verwendet, die aufgrund einer IRES-Sequenz die simultane Expression von zwei unterschiedlichen Vektor-kodierten Proteinen ermöglichen. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren vermitteln neben der Expression verschiedener Bcl10-Proteinvarianten die Expression des Oberflächenmarkers Thy1.1 zur Bestimmung der Transfektionseffizienz der Phoenix-Zellen und der Infektionseffizienz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Transfektion der Phoenix-Zellen wurde wie beschrieben unter Einsatz der CaPO<sub>4</sub>-Methode über 16 bis 24 Stunden im Brutschrank durchgeführt. Zu Beginn der Virusernte wurde die Transfektionslösung abgesaugt und durch 4,5 ml frisches Medium je Schale ersetzt. Anschließend wurden die Zellen weitere 24 bis 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur effizienten Infektion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde ausschließlich Überstand von Phoenix-Zellen verwendet, die 48 Stunden nach Transfektionsbeginn zu mindestens 75% Thy1.1 positiv waren (Abbildung 2.4).

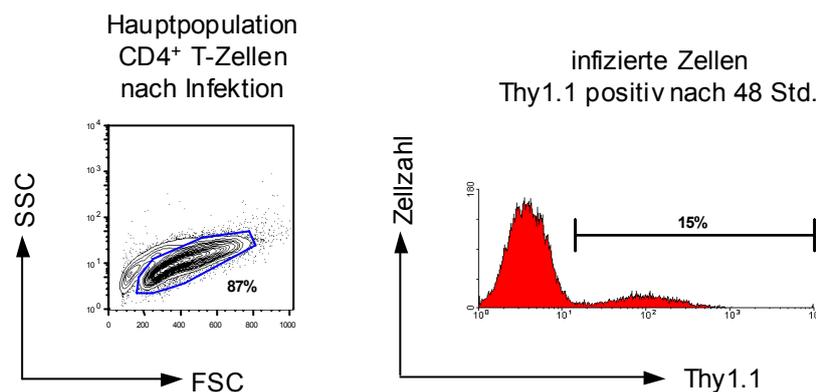


**Abbildung 2.4 Bestimmung der Transfektionsrate pMSCV/Thy1.1-transfizierter Phoenix-Zellen.** Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl Thy1.1-exprimierender Zellen gemessen, die unter Einsatz der CaPO<sub>4</sub>-Methode 48 Std. zuvor mit pMSCV/Thy1.1 transfiziert worden waren. Für die Analyse wurden nur Zellen der Hauptpopulation herangezogen. Als Referenz dienten Zellen, die nicht transfiziert, aber der Thy1.1-Färbung unterzogen wurden. Die Transfektionsrate der Phoenix-Zellen, deren Überstand für die Infektion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen weiterverwendet wurden, lag bei mindestens 75%.

Um die Infektionsrate der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zusätzlich zu optimieren, wurden zwei Chargen Phoenix-Zellen zur Virusproduktion herangezogen, die an aufeinander folgenden Tagen (Charge 1 an Tag 1 und Charge 2 an Tag 2) transfiziert wurden. Der frische Virusüberstand der beiden Chargen wurde an Tag 4 vereint und direkt für die Infektion der Zielzellen verwendet. Der erstmalig an Tag 3 anfallende Virusüberstand der Charge 1 wurde nicht

verworfen, sondern einer 24-stündigen Zentrifugation (6000xg, 4°C) zur Pelletierung der enthaltenen Viruspartikel unterzogen. Das Viruspellet wurde mit den frischen Überständen beider Phoenix-Chargen an Tag 4 unmittelbar vor Beginn der Infektion vereint.

Die zu infizierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen Bcl10-defizienter Mäuse wurden an Tag 2 aufgereinigt, zu einer Dichte von 2 bis 4x10<sup>6</sup> Zellen je ml und CD3/CD28-Antikörper-beschichteter Kavität einer 6-well Platte ausgesät und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Am Tag 4 wurden die Zellen mit 10 ml vereinigtem Virusüberstand überschichtet. Nach Zugabe von Polybrene (8 µg/ml Endkonzentration) wurde die 6-well Platte bei 2000 rpm und RT eine Stunde zentrifugiert und anschließend weitere 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen vom Plattenboden abgeschabt, zu einer Konzentration von 1x10<sup>6</sup> Zellen je ml in IL-2-haltigem Medium (20U/ml) aufgenommen und weitere 3 Tage im Brutschrank kultiviert (Abbildung 2.5).

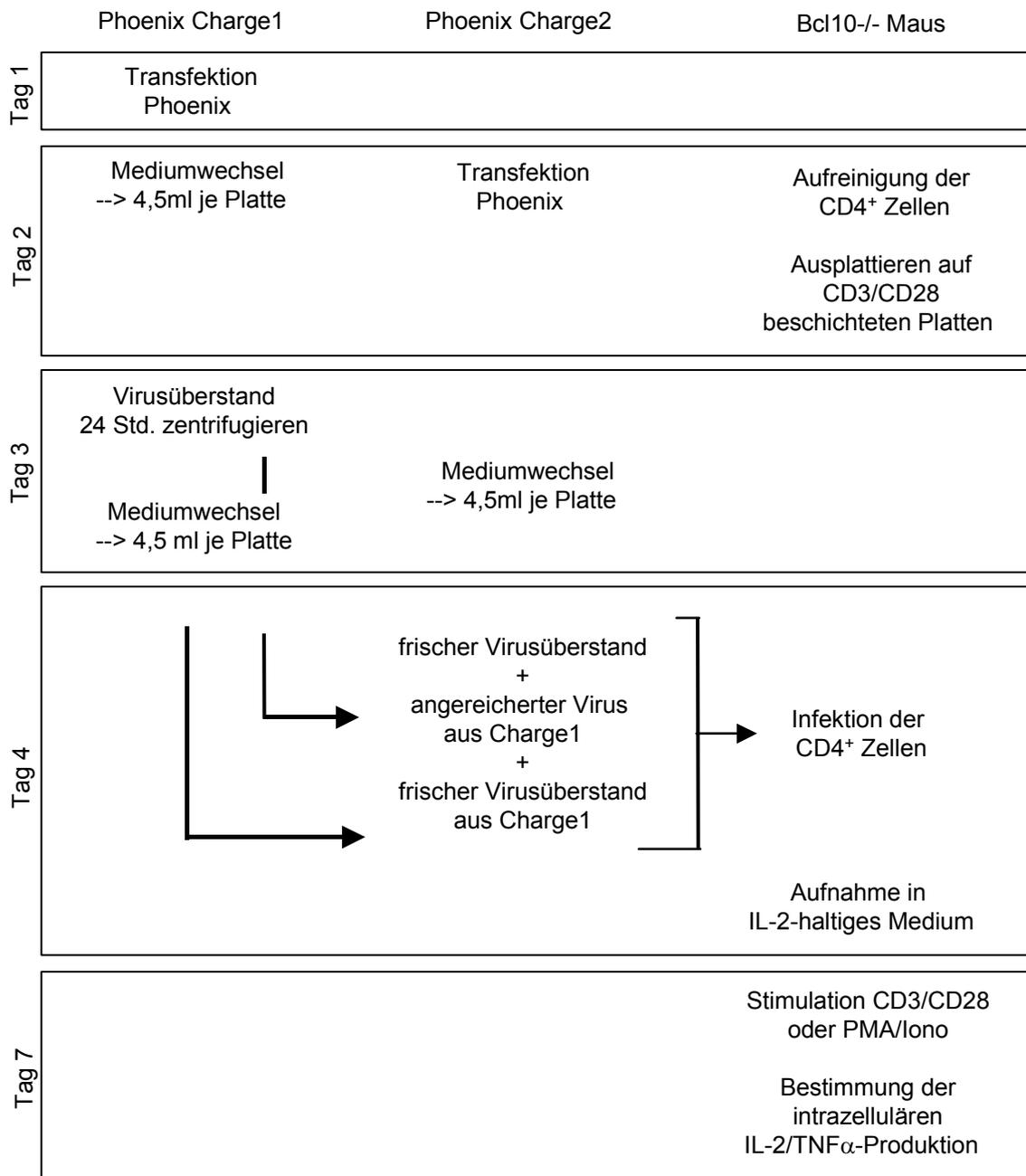


**Abbildung 2.5 Bestimmung der Infektionsrate Bcl10-defizienter CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit Phoenix-Virusüberstand.** Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl Thy1.1 positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen 48 Std. nach Inkubation mit Phoenix-Virusüberstand gemessen. Die Verpackungszellen wurden zuvor mit pMSCV/Thy1.1 transfiziert und der Überstand wie im Text beschrieben zur Infektion der aufgereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt. Die Infektionsrate betrug bis zu 15%. Für die Analyse wurde die Hauptpopulation der Zellen herangezogen.

### 2.12.16 Messung intrazellulärer Zytokin-Produktion Bcl10-defizienter CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Fähigkeit retroviral rekonstituierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur CD3/CD28- oder PMA/Iono-induzierten Produktion der Cytokine IL-2 und TNFα wurde an Tag 3 nach der Infektion gemessen. Die Zytokin-Produktion wurde nach intrazellulärer Färbung von IL-2 und TNFα

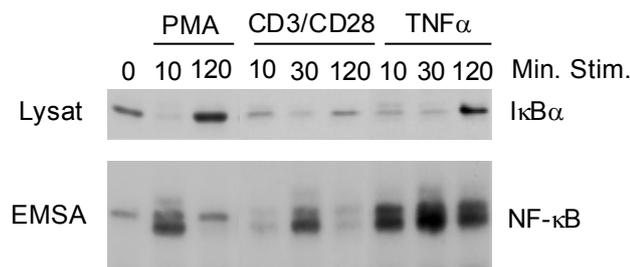
mittels FACS-Analyse bestimmt. Hierzu wurden die Zellen pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen, um exogenes IL-2 zu entfernen. Anschließend wurde die Aktivierung der Zellen durch Ausplattieren in CD3/CD28 Antikörper-beschichteten 6-well-Platten ( $2 \times 10^6$  Zellen je Kavität) oder durch Zugabe von PMA/Ionomycin eingeleitet. Nach dreistündiger Inkubation wurde Brefeldin A ( $10 \mu\text{g/ml}$  Endkonzentration), ein Inhibitor des intrazellulären Proteintransports, zugefügt, um die Akkumulation der produzierten Zytokine im endoplasmatischen Reticulum hervorzurufen. Nach weiterer dreistündiger Inkubation wurden die Zellen pelletiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und 20 Minuten auf Eis mit anti-Thy1.1-PerCP Antikörper ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend durch 10-minütige Inkubation bei RT in 4% Paraformaldehyd fixiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Erst die Permeabilisierung der Zellmembranen ermöglicht die intrazelluläre Färbung von Proteinen durch Antikörper. Daher wurden die pelletierten Zellen durch einmaliges Waschen in 0,5% Saponin enthaltenem PBS/1%BSA umgepuffert und in PBS/1%BSA/0,5%Saponin aufgenommen. Nach Zugabe von mFcBlock ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) sowie anti IL-2-APC ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ) und anti TNF $\alpha$ -PE ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ) Antikörpern wurden die Zellen 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit eiskaltem PBS/1%BSA/0,5%Saponin und 2-maligem Waschen mit eiskaltem PBS wurde die intrazelluläre Färbung der Zellen mit einem BD FACS-Calibur analysiert.



**Abbildung 2.6 Schematischer Überblick zur zeitliche Abfolge einzelner Schritte bei der Infektion primärer Bcl10-defizienter CD4<sup>+</sup> T-Zellen.** Zur Infektion der Zellen wurde ein gestaffeltes System mit zwei Chargen transfizierter Phoenix-Verpackungszellen verwendet (nähere Angaben dazu im Text).

### 3 Ergebnisse

Stimulation von Jurkat T-Zellen durch CD3/CD28-Antikörper oder durch direkte Aktivierung von PKC $\theta$  durch PMA führt innerhalb weniger Minuten zur Induktion von NF- $\kappa$ B DNA-Bindungsaktivität (Wirkweise CD3/CD28-Antikörper und PMA, s. 2.10.5). Allerdings fällt hierbei auf, dass die NF- $\kappa$ B DNA-Bindung trotz persistenter Stimulation von transientser Natur ist, ganz im Gegensatz zur NF- $\kappa$ B DNA-Bindung nach Stimulation der Zellen durch proinflammatorische Substanzen wie TNF $\alpha$ .



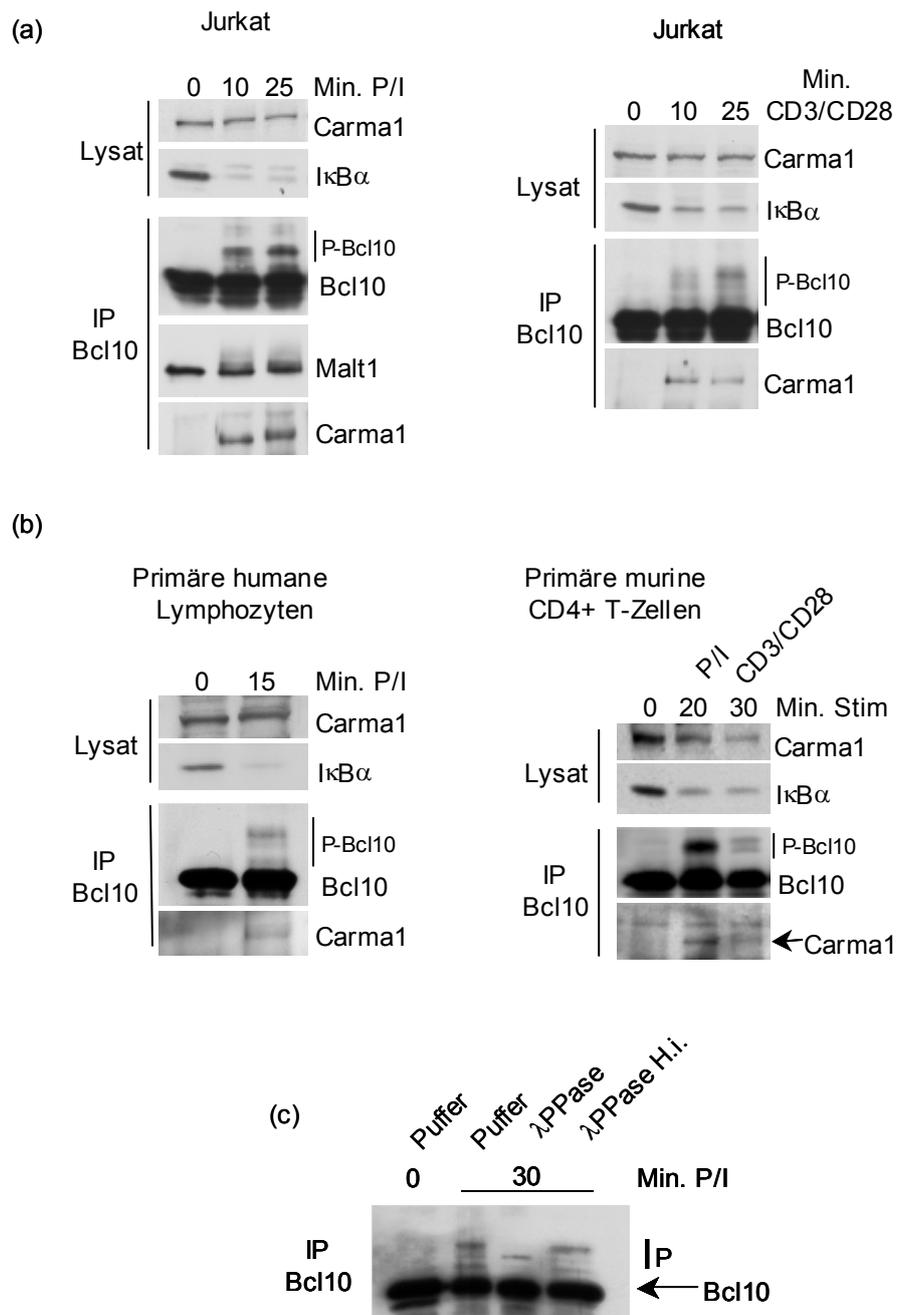
**Abbildung 3.1** **Transiente Natur der NF- $\kappa$ B DNA-Bindung nach T-Zell Aktivierung.** EMSA-Analyse der NF- $\kappa$ B DNA-Bindungsaktivität nach Stimulation (Stim.) von Jurkat T-Zellen mit PMA, CD3/CD28-Antikörpern und TNF $\alpha$ . T-Zell-aktivierende Agenzien führen zu einer transienten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, wobei die beobachtete Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  allein für die effiziente Repression nicht verantwortlich sein kann.

Die Proteine Carma1, Bcl10 und Malt1 sind durch genetische Studien in Mäusen funktionell mit der IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung in T-Zellen verknüpft worden. Daher wurde der analytische Fokus in dieser Arbeit auf T-Zell spezifische Mechanismen gerichtet, die mit den essentiellen Regulatoren Carma1, Bcl10 und Malt1 in Verbindung stehen und möglicherweise Einfluss sowohl auf die Aktivierung als auch auf die Deaktivierung der Antigenrezeptor-induzierten IKK/NF- $\kappa$ B-Signalkette nehmen.

### 3.1 Regulierung der CBM-Komplexaktivität durch IKK $\beta$ und Phosphorylierung von Bcl10

#### 3.1.1 CBM-Komplexbildung nach T-Zell Aktivierung

Die Bildung eines Carma/Bcl10/Malt1 (CBM)-Proteinkomplexes gilt als eine der Grundvoraussetzungen für die IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung in T-Zellen, obwohl ein Nachweis der



**Abbildung 3.2 Bildung des endogenen CBM-Komplexes nach T-Zell Aktivierung.** (a) CBM-Komplex in PMA/Iono (P/I)- oder CD3/CD28-stimulierten Jurkat T-Zellen: die Analyse von Bcl10-Immunopräzipitat zeigt, dass Bcl10 und Carma1 Stimulus-induziert interagieren. Nach Aktivierung treten langsamer migrierende Bcl10-Modifikationen in Erscheinung. Malt1 bindet konstitutiv an Bcl10. (b) CBM-Komplex in primären Lymphozyten: Die Analysen von Bcl10-Immunopräzipitat aus PMA/Iono-stimulierten humanen Lymphozyten und aus PMA/Iono- oder CD3/CD28-stimulierten murinen CD4+ T-Zellen bestätigen die Ergebnisse aus Jurkat T-Zellen. (c) Bei der Bcl10-Modifikation handelt es sich um Phosphorylierung. Die langsamer migrierenden Bcl10-Banden sind  $\lambda$ -Phosphatase sensitiv. Behandlung mit Hitze-inaktivierter (H.i.) Phosphatase hat keinen Effekt.

Existenz des Komplexes unter physiologischen Bedingungen noch aussteht. Um zu zeigen, dass der CBM-Komplex in aktivierten T-Zellen vorliegt, wurden Immunopräzipitationsstudien mit endogenen Proteinen durchgeführt (Abbildung 3.2 a und b). Sowohl in der T-Zelllinie Jurkat wie auch in primären humanen Lymphozyten und primären murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen bindet Bcl10 im Ruhezustand nicht an Carma1. Erst nach Stimulation der Zellen durch CD3/CD28-Antikörper oder PMA/Ionomycin (Iono), wobei Iono die T-Zell-aktivierende Wirkung von PMA durch Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speicherkompartimenten unterstützt, wird Carma1 von Bcl10 kopräzipitiert (Wirkweise Iono, s. 2.10.5). Im Gegensatz dazu binden Bcl10 und Malt1 bereits in unstimulierten Zellen aneinander. Diese Ergebnisse decken auf, dass unter physiologischen Bedingungen die Bildung des CBM-Komplexes zwischen Carma1 und konstitutiv gebundenem Bcl10/Malt1 erst nach T-Zell Aktivierung stattfindet.

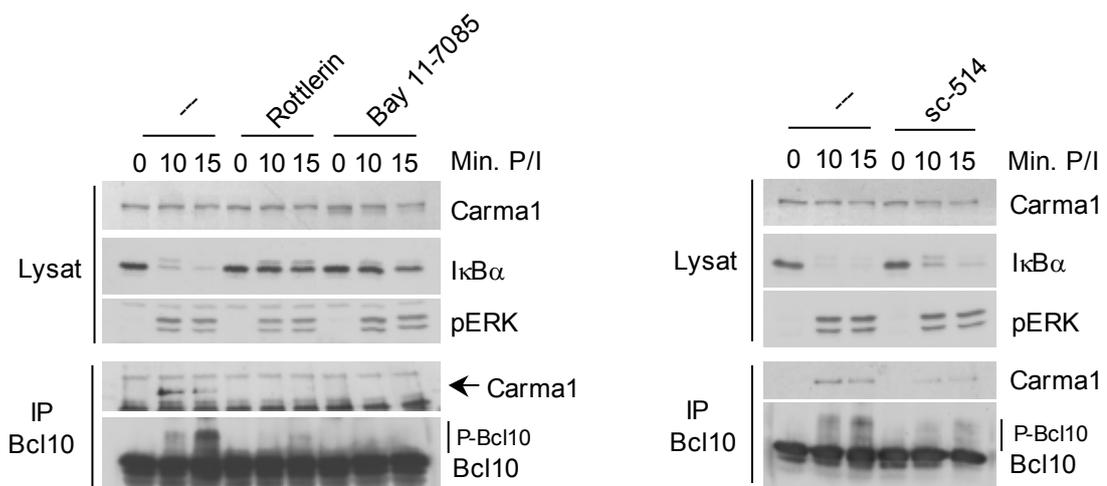
Interessanterweise treten nach T-Zell-aktivierender Stimulation auch langsamer migrierende Proteinbanden von Bcl10 in Erscheinung, die eine posttranslationale Modifizierung des Proteins wie z.B. Phosphorylierung andeuten. Durch Behandlung mit  $\lambda$ -Phosphatase wird die PMA/Iono-induzierte Modifikation von Bcl10 größtenteils rückgängig gemacht, während die Verwendung von Hitze-inaktivierter  $\lambda$ -Phosphatase unter gleichen experimentellen Bedingungen keinen Effekt hat (Abbildung 3.2 c). Dies bestätigt, dass es sich bei der Stimulus-induzierten Bcl10-Modifikation um eine Phosphorylierung handelt.

Bereits an dieser Stelle soll auf die gegenläufige Kinetik der Bcl10-Phosphorylierung und der CBM-Komplex Bildung besonders unter Verwendung von CD3/CD28-Antikörpern als Stimulationsagens hingewiesen werden. Während die Menge an phosphoryliertem Bcl10 mit zunehmender Stimulationszeit ansteigt, ist eine maximale Assoziation zwischen Carma1 und Bcl10 bereits nach sehr kurzen Stimulationszeitpunkten zu beobachten, was gegen eine initiale Funktion der Bcl10-Phosphorylierung bei der CBM-Komplexbildung spricht.

### **3.1.2 Die Bildung des CBM-Komplexes ist abhängig von IKK $\beta$ -Kinaseaktivität**

Um zu ermitteln, welche Kinasen für die Phosphorylierung von Bcl10 verantwortlich sind und inwieweit deren Funktion bei der CBM-Komplex Regulation eine Rolle spielt, wurden Jurkat T-Zellen vor der Aktivierung mit spezifischen Kinase-Inhibitoren behandelt. Genetische Analysen ordnen PKC $\theta$  eine dem CBM-Komplex vorgelagerte Funktion bei der

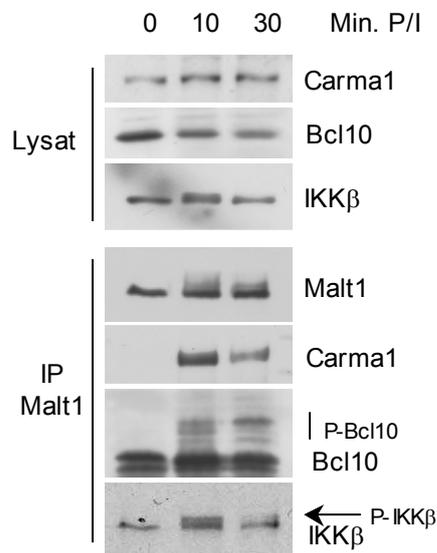
Aktivierung von NF- $\kappa$ B in T-Lymphozyten zu. Erwartungsgemäß unterbindet die Inhibierung der PKC $\theta$ -Kinaseaktivität durch Rottlerin die Bildung des CBM-Komplexes und auch die Phosphorylierung von Bcl10 (Abbildung 3.3). Überraschenderweise wurde der gleiche Effekt durch Vorbehandlung der Zellen mit zwei verschiedenen IKK $\beta$  Inhibitoren, Bay11-7085 und sc-514, erhalten. Dies bedeutet, dass die Kinaseaktivität von IKK $\beta$  nicht nur zur nachgelagerten Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  benötigt wird. Vielmehr scheint IKK $\beta$  auch eine vorgelagerte Funktion zu haben, die für die Bildung des CBM-Komplexes essentiell ist. Zur Beurteilung der inhibitorischen Wirkung von Bay11-7085 und sc-514 wurde das Maß der I $\kappa$ B $\alpha$ -Stabilisierung analysiert. Alle Inhibitoren verzögern die Stimulus-abhängige Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ . Da kein Effekt auf die MAP-Kinasen-vermittelte Phosphorylierung von ERK („Extracellular Signal Regulated Kinase“) 1/2 festgestellt wurde, ist TCR-proximale Signaltransduktion von der Inhibitorbehandlung unbeeinflusst, was die Spezifität der Beobachtungen für den NF- $\kappa$ B Signalweg belegt.



**Abbildung 3.3 Die Kinaseaktivität von IKK $\beta$  wird zur CBM-Komplexbildung benötigt.** Pharmakologische Inhibierung der Kinaseaktivität von PKC $\theta$  durch Rottlerin und von IKK $\beta$  durch Bay11-7085 oder sc-514 verhindert PMA/Iono-induzierte Bcl10-Carma1-Interaktion und Bcl10-Phosphorylierung. Die inhibitorische Wirkung der Substanzen wurde am Maß der Stabilisierung von I $\kappa$ B $\alpha$  abgeschätzt, die Phosphorylierung von ERK1/2 ist nicht beeinflusst.

Zur genaueren Definition der Rolle von IKK $\beta$  beim Prozess der CBM-Komplex Bildung wurde untersucht, ob IKK $\beta$  an Komponenten des CBM-Komplexes bindet. Die Analyse von Malt1-Immunopräzipitat aus Jurkat T-Zellen zeigt, dass IKK $\beta$  konstitutiv mit Malt1

interagiert (Abbildung 3.4). Nach T-Zell Aktivierung mit PMA/Iono binden sowohl aktiviertes phospho-IKK $\beta$  als auch Bcl10/Malt1 und Carma1 aneinander und bilden einen IKK $\beta$ -assoziierten CBM-Komplex.

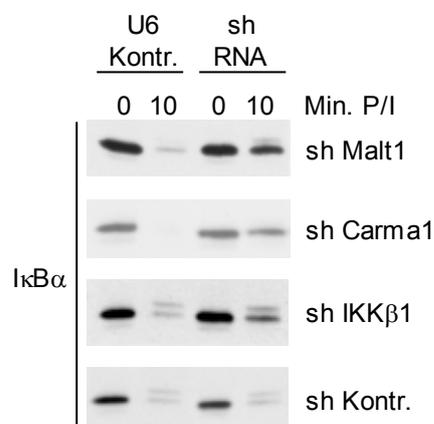


**Abbildung 3.4 IKK $\beta$ -Assoziation mit dem CBM-Komplex.** Analyse der CBM-Komplexinteraktionen in Jurkat T-Zellen durch Immunopräzipitation von Malt1. IKK $\beta$  und Malt1 binden konstitutiv aneinander. Nach PMA/Iono-Stimulation bindet verstärkt aktiviertes (phosphoryliertes) IKK $\beta$  an den CBM-Komplex .

### 3.1.3 IKK $\beta$ -Inaktivierung durch RNAi blockiert die Bildung des CBM-Komplexes

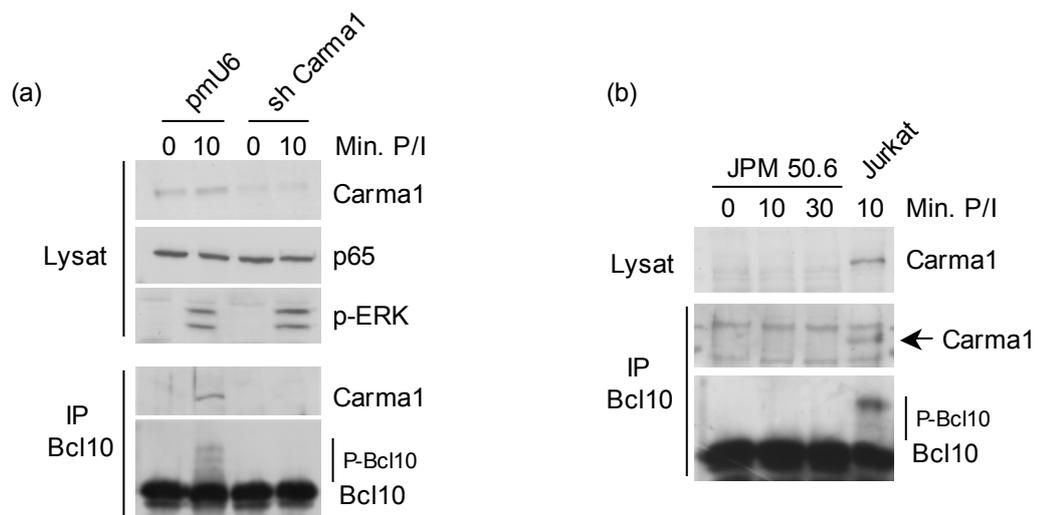
Zur weiterführenden Analyse der Faktoren, die für die signalinduzierte Bcl10-Carma1-Interaktion und Bcl10-Phosphorylierung verantwortlich sind, wurden RNA-Interferenz (RNAi) Experimente mit Malt1, Carma1 und IKK $\beta$  durchgeführt, die alle durch „Knock Out“-Studien in Mäusen als essentielle Regulatoren des Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweges identifiziert werden konnten. Die Effizienz der verwendeten shRNA-Konstrukte wurde vorab über ihre Fähigkeit, PMA/Iono-induzierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation zu blockieren, beurteilt. Jurkat T-Zellen, die 72 Stunden vor Aktivierung durch PMA/Iono mit den entsprechenden shRNAs gegen Malt1, Carma1 und IKK $\beta$  transfiziert wurden, zeigen wie erwartet signifikant reduzierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation im Vergleich mit Referenzzellen, die mit pmU6-Leervektor transfiziert wurden (Abbildung 3.5). Um die Spezifität der Beobachtungen zu beurteilen, wurde in Jurkat T-Zellen eine shRNA gegen die E3-Ubiquitin-Ligase Itch

(shKontrolle) exprimiert. Zellen, die zuvor mit shKontr-RNA behandelt wurden, zeigen wie pmU6-transfizierte Zellen keine Verzögerung der stimulusinduzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation. Dies bestätigt, dass die shCarma1-, shMalt1- und shIKK $\beta$ -abhängige Blockade des NF- $\kappa$ B Signalwegs nicht auf unspezifische Effekte der shRNA Expression an sich zurück zu führen ist, sondern in spezifischer Weise von der Inaktivierung der entsprechenden Zielproteine abhängt. Im direkten Vergleich ist der stabilisierende Effekt von shIKK $\beta$  auf den I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinlevel geringer als der von shCarma1 oder shMalt1. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus anderen Zellsystemen (M. Hinz, nicht veröffentlichte Daten) und ist möglicherweise auf die kompensatorische Funktion von IKK $\alpha$  zurückzuführen (Schmidt-Supprian et al, 2003).



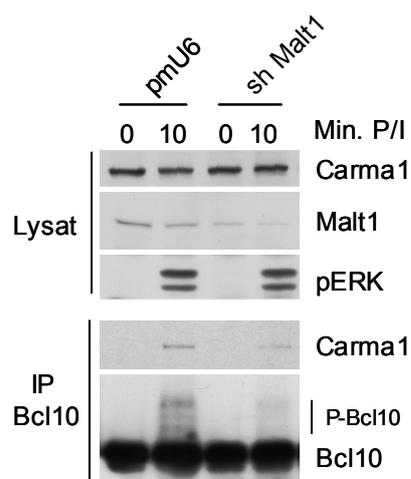
**Abbildung 3.5 Malt1, Carma1 und IKK $\beta$  sind wichtige Regulatoren der NF- $\kappa$ B Signalkaskade in aktivierten T-Zellen.** In shMalt1-, shCarma1- und shIKK $\beta$ -behandelten Jurkat T-Zellen ist die PMA/Iono-induzierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation verzögert, was die Inhibierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Inaktivierung der Proteine belegt. shKontr-Behandlung zeigt Effekt.

Um zu klären, ob Carma1 für die Phosphorylierung von Bcl10 benötigt wird, wurden Jurkat T-Zellen nach Carma1-Inaktivierung untersucht (Abbildung 3.6). Die Analyse von Bcl10-Immunopräzipitat aus shCarma1-behandelten Jurkat T-Zellen ergibt, dass Bcl10 bei Abwesenheit von Carma1 nicht mehr Stimulus-induziert phosphoryliert wird. Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung von ERK1/2 nicht beeinflusst, was bestätigt, dass andere Signalwege von der Inaktivierung nicht betroffen sind. Diese Ergebnisse wurde durch die Analyse Carma1-defizienter Jurkat T-Zellen (JPM 50.6) bestätigt, in denen ebenfalls keine PMA/Iono-induzierte Bcl10-Phosphorylierung mehr auftritt.



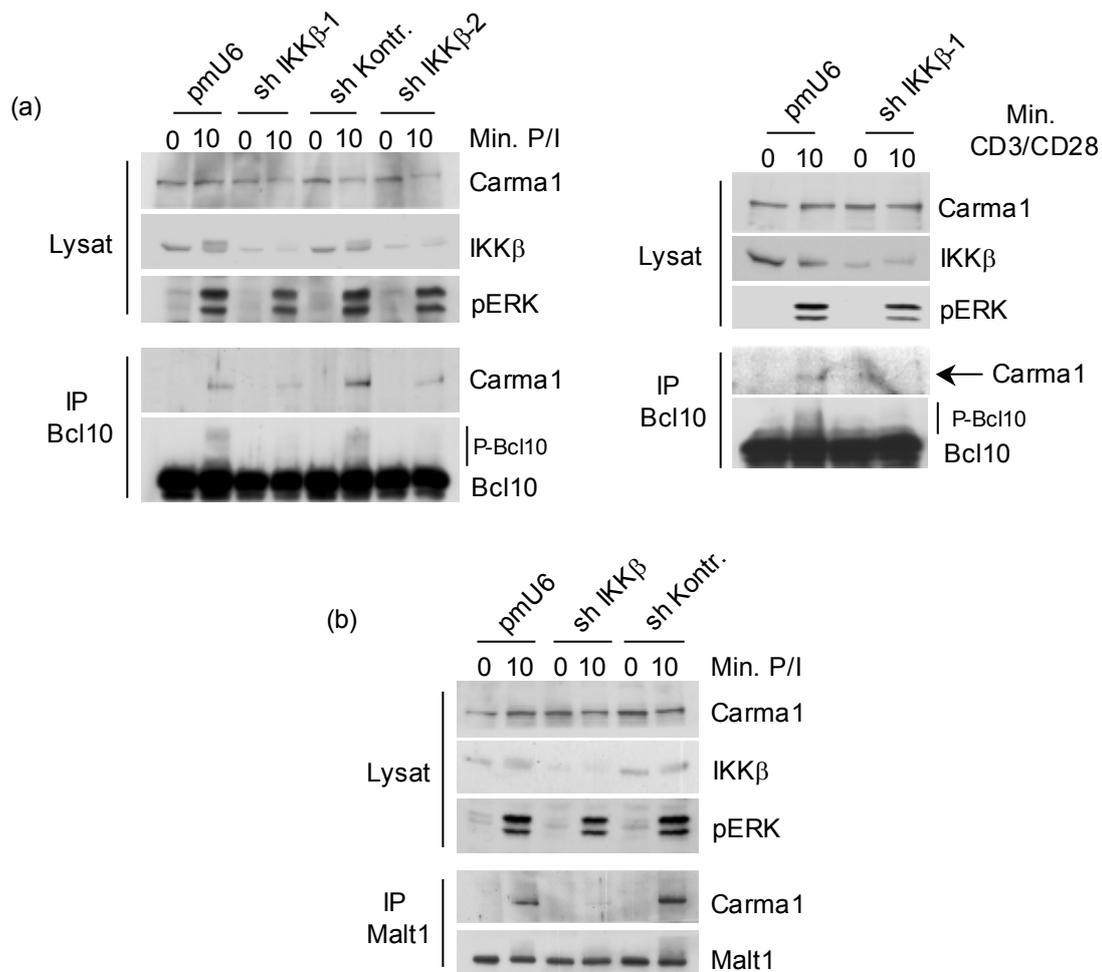
**Abbildung 3.6 Die Carma1-Funktion wird für die Phosphorylierung von Bcl10 benötigt.** Sowohl in shCarma1-behandelten Jurkat T-Zellen (a) wie auch in Carma1-defizienten Jurkat T-Zellen (b, JPM50.6) wird Bcl10 nach T-Zell Aktivierung durch PMA/Iono-Stimulation nicht mehr phosphoryliert.

Auch die Expression einer shRNA gegen die CBM-Komplex Komponente Malt1 unterbindet in Jurkat T-Zellen die Stimulus-induzierbare Phosphorylierung von Bcl10 (Abbildung 3.7). Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass Malt1 die Interaktionsschnittstelle zwischen CBM-Komplex und IKK $\beta$  bildet. Zusätzlich interagiert Bcl10 nach Inaktivierung von Malt1 deutlich schwächer mit Carma1. Die Daten deuten an, dass für die Phosphorylierung von Bcl10 die Bildung eines funktionsfähigen CBM-Komplexes Voraussetzung ist.



**Abbildung 3.7 Die Malt1 Funktion wird für die Phosphorylierung von Bcl10 benötigt.** Die Inaktivierung von Malt1 mittels shRNA in Jurkat T-Zellen schwächt die Bcl10 Phosphorylierung und unterbindet die Bildung des CBM-Komplexes.

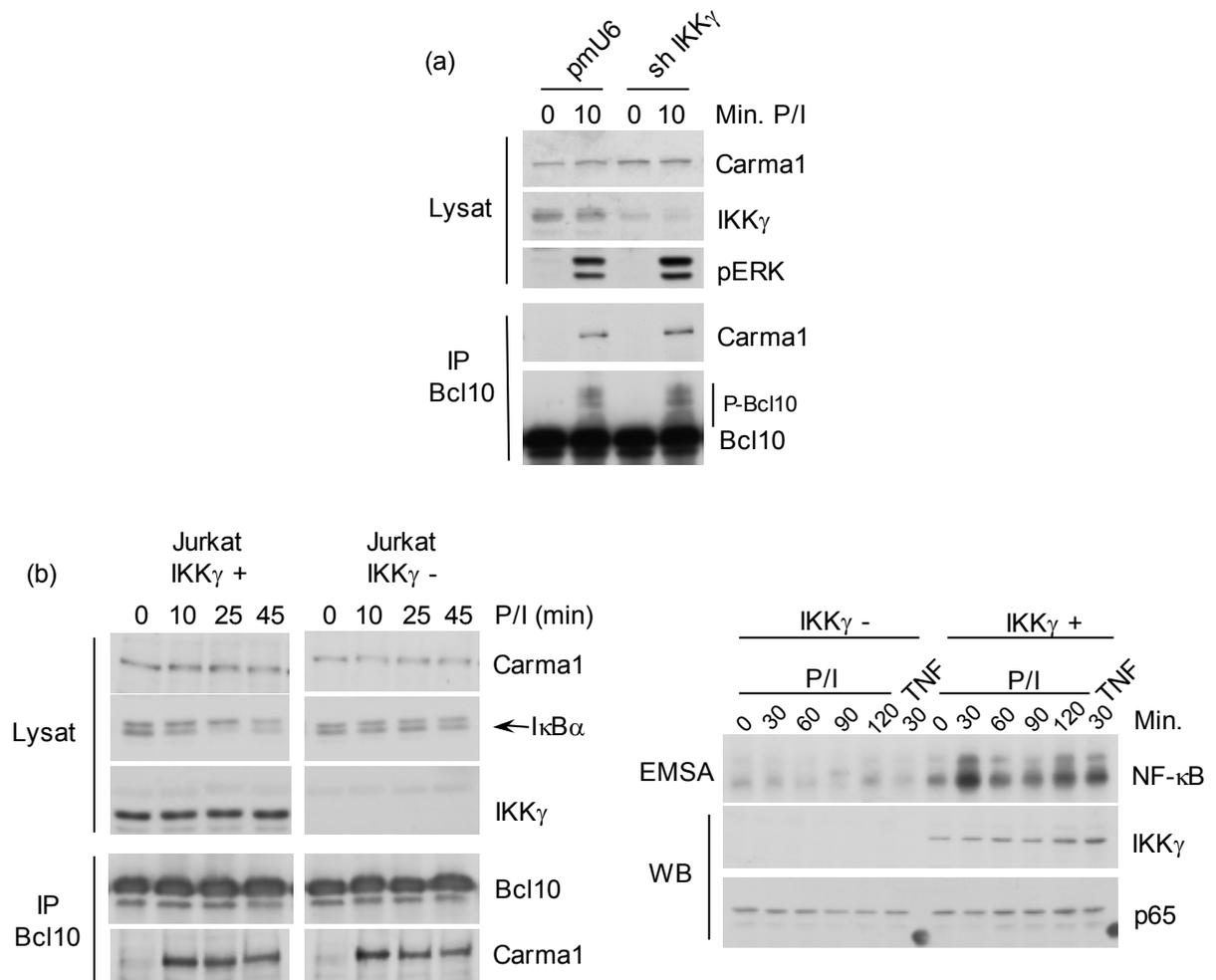
Unter Abschnitt 1.1.2 wurde gezeigt, dass pharmakologische Inhibierung der Kinaseaktivität von IKK $\beta$  die Bildung des CBM-Komplexes verhindert. Im Einklang mit diesem Ergebnis führt die Inaktivierung von IKK $\beta$  durch RNAi ebenfalls zur Unterdrückung der PMA/Iono- oder CD3/CD28-induzierten Bcl10-Carma1-Interaktion und Bcl10 Phosphorylierung in Jurkat T-Zellen (Abbildung 3.8 a).



**Abbildung 3.8 Inaktivierung von IKK $\beta$  mittels RNAi verhindert Bildung des CBM-Komplexes.** (a) Die Analyse von Bcl10-Immunopräzipitat aus Jurkat T-Zellen zeigt, dass die Inaktivierung von IKK $\beta$  mittels zweier unterschiedlicher shRNA-kodierender Vektoren in beiden Fällen zu abgeschwächter Bcl10-Carma1-Interaktion und Bcl10-Phosphorylierung nach PMA/Iono Stimulation führt. Auch die CD3/CD28-induzierte CBM-Komplexbildung ist durch IKK $\beta$ -Inaktivierung unterbunden. (b) Die Analyse von Malt1-Immunopräzipitat zeigt, dass die Rekrutierung von Malt1 zu Carma1 in shIKK $\beta$ -vorbehandelten Jurkat T-Zellen defekt ist. In allen Experimenten ist die ERK1/2-Phosphorylierung durch shRNA-Behandlung unbeeinflusst.

Für die Inaktivierung von IKK $\beta$  wurden zwei unterschiedliche shRNA Sequenzen verwendet (shIKK $\beta$ -1 und shIKK $\beta$ -2), die beide in gleichem Maße mit der Bildung des CBM-Komplexes interferieren. Zur Bestätigung dieser Daten wurde zusätzlich untersucht, ob nach Inaktivierung von IKK $\beta$  auch die Malt1-Carml Interaktion gestört ist (Abbildung 3.8 b). Wie erwartet wird Carml nach shIKK $\beta$ -Behandlung der Zellen nicht mehr von Malt1 präzipitiert. Diese Ergebnisse belegen, dass die Bildung des CBM-Komplexes nach Inaktivierung von IKK $\beta$  sowohl durch pharmakologische Inhibition als auch durch RNAi unterbunden ist. Als Kontrolle wurden Jurkat T-Zellen mit pmU6-Leervektor oder shKontrollierendem Vektor transfiziert. Im Gegensatz zu shIKK $\beta$ -behandelten Zellen zeigen diese normale CBM-Komplex Bildung und Bcl10-Phosphorylierung.

IKK $\gamma$  ist die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes und wie IKK $\beta$  für die Funktion des Komplexes in Lymphozyten essentiell. Um die Frage zu beantworten, ob IKK $\beta$  allein oder ob ein funktionsfähiger IKK-HoloKomplex für die Bildung des CBM-Komplexes und für die Phosphorylierung von Bcl10 benötigt wird, wurden Jurkat T-Zellen mit inaktiviertem IKK $\gamma$  untersucht. Trotz signifikanter Reduktion des IKK $\gamma$ -Proteinlevels durch shRNA-Behandlung zeigt die Analyse von Bcl10-Immunopräzipitat normale CBM-Komplexbildung und Bcl10-Phosphorylierung nach Aktivierung von Jurkat T-Zellen (Abbildung 3.9 a). Die Analyse einer IKK $\gamma$ -defizienten Jurkat T-Zelllinie (JM 4.5.2) deckt auf, dass auch genetische Inaktivierung von IKK $\gamma$  keinen Einfluss auf die PMA/Iono-induzierte Bcl10-Carml-Interaktion hat (Abbildung 3.9 b). Interessanterweise ist die Stimulus-abhängige Bcl10-Phosphorylierung in JM 4.5.2 Zellen um ein Vielfaches schwächer als in der bisher verwendeten Jurkat T-Zelllinie. Da trotz IKK $\gamma$ -Defizienz und schwacher Bcl10-Phosphorylierung die CBM-Komplex Bildung in JM 4.5.2 Zellen nicht beeinträchtigt ist, scheinen IKK $\gamma$  und die Bcl10-Phosphorylierung keine Rolle bei der primären Komplex Bildung zu spielen. Zur Kontrolle wurde die Stimulus-induzierte NF- $\kappa$ B DNA-Bindung in JM 4.5.2 Zellen analysiert. Während bei IKK $\gamma$ -defizienten Zellen keine NF- $\kappa$ B-Aktivierung detektierbar ist, zeigen IKK $\gamma$ -rekonstituierte JM 4.5.2 Zellen die erwartete PMA/Iono-abhängige, transiente NF- $\kappa$ B DNA-Bindung.

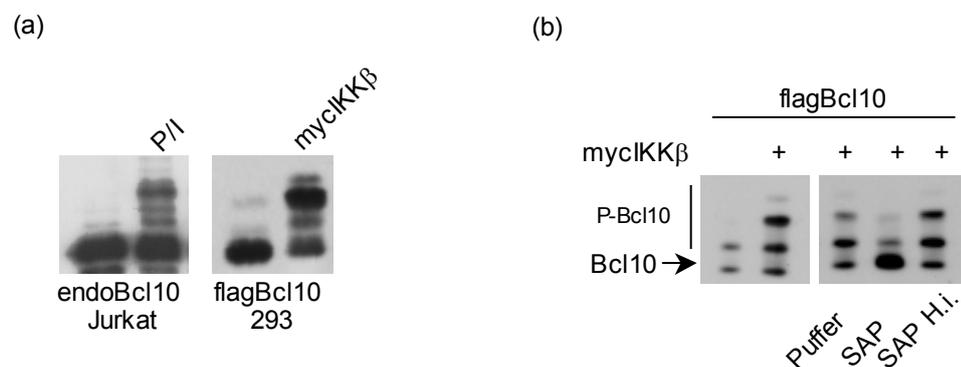


**Abbildung 3.9** IKK $\gamma$  ist nicht an der Regulation der CBM-Komplexbildung beteiligt. (a) IKK $\gamma$  Inaktivierung in Jurkat T-Zellen durch RNAi hat keinen Effekt auf PMA/Iono-induzierte Bcl10-Carma1 Interaktion und Bcl10-Phosphorylierung. (b) Vergleichende Analyse von JM 4.5.2 Zellen, die kein IKK $\gamma$  exprimieren und JM 4.5.2, die mit Epitop-markiertem IKK $\gamma$  rekonstituiert wurden, zeigt, dass auch genetische Inaktivierung von IKK $\gamma$  die PMA/Iono-induzierbare Bcl10-Carma1 Interaktion nicht beeinflusst.

### 3.1.4 IKK $\beta$ phosphoryliert Bcl10 im C-Terminus

In den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Inaktivierung von IKK $\beta$  die Bildung des CBM-Komplexes und die Phosphorylierung von Bcl10 verhindert. Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Phosphorylierung von Bcl10 führen, wurde daher untersucht, ob Bcl10 ein direktes Substrat von IKK $\beta$  ist. Hierzu wurden Studien in HEK293-Zellen unter Verwendung ektopisch exprimierter und Epitop-markierter

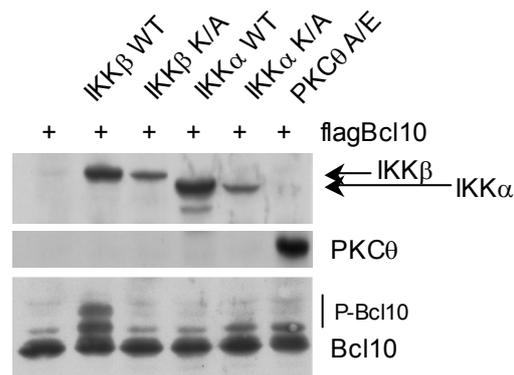
Proteine durchgeführt. Die Analyse von flagBcl10-Immunopräzipitat zeigt, dass der größte Teil des Proteins in einer unmodifizierten Form vorliegt. Bei Koexpression von IKK $\beta$  und Bcl10 verändert sich das Laufverhalten von Bcl10 allerdings deutlich. Es treten mehrere langsamer migrierende Banden auf (Abbildung 3.10 a). Im Vergleich mit dem Bcl10 Phosphorylierungsmuster aus aktivierten Jurkat T-Zellen fällt auf, dass sich das Laufverhalten von Bcl10 nach PMA/Iono-Stimulation und bei IKK $\beta$ -Koexpression stark ähnelt. Um zu untersuchen, ob die Koexpression von IKK $\beta$  die Phosphorylierung von Bcl10 induziert, wurde flagBcl10-Immunopräzipitat mit Phosphatase behandelt (Abbildung 3.10 b). Die Analyse zeigt, dass die nach Kotransfektion von IKK $\beta$  in Erscheinung tretenden, langsamer migrierenden Banden von Bcl10 Phosphatase sensitiv sind. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass IKK $\beta$ - und Bcl10-Koexpression in HEK293-Zellen die Phosphorylierung von Bcl10 induziert.



**Abbildung 3.10 Bcl10-Phosphorylierung durch IKK $\beta$ .** (a) Bcl10-Migrationsverhalten aus PMA/Iono-aktivierten Jurkat T-Zellen sowie HEK293-Zellen, die Epitop-markiertes Bcl10 und IKK $\beta$  koexpressieren. Das Muster der langsamer migrierenden Banden ähnelt sich stark. (b) Langsamer migrierende Bcl10-Banden, die nach Koexpression von IKK $\beta$  in HEK293-Zellen auftreten, sind Phosphatase sensitiv. Behandlung mit Hitze-inaktivierter (H.i.) Phosphatase hat keinen Effekt.

Zur Beurteilung der Spezifität IKK $\beta$ -vermittelter Bcl10-Phosphorylierung, wurden HEK293-Zellen mit Epitop-markiertem Bcl10 und weiteren Kinasen, die mit NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Verbindung stehen, kotransfiziert (Abbildung 3.11). Neben IKK $\beta$  wurden IKK $\alpha$ , die zweite katalytische und zu IKK $\beta$  homologe Untereinheit des IKK-Komplexes sowie konstitutiv aktive PKC $\theta$  (PKC $\theta$  A/E) eingesetzt. Zusätzlich wurde ermittelt, ob IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  Mutanten, die durch Punktmutation in der Aktivierungsschleife eine inaktive Kinase-Domäne besitzen (IKK $\alpha$  K/A, IKK $\beta$  K/A), die Fähigkeit verlieren, Bcl10 zu phosphorylieren. Die

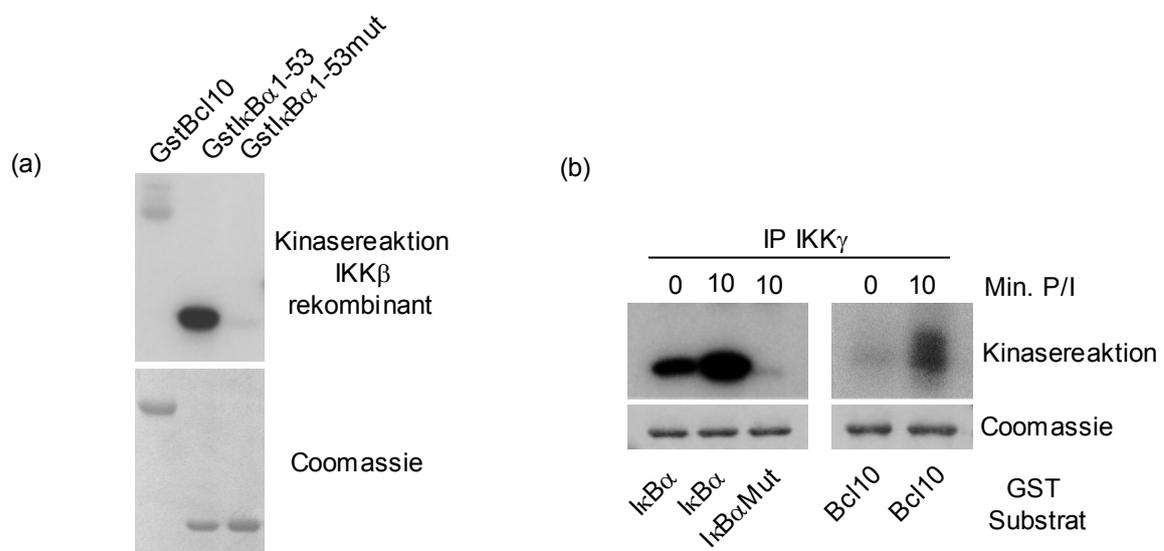
Analysen ergaben, dass weder koexprimiertes IKK $\alpha$  noch PKC $\theta$  in vergleichbarer Weise wie IKK $\beta$  die Phosphorylierung von Bcl10 auslösen. Auch die Kinase-inaktive Mutante von IKK $\beta$  induziert nicht die Phosphorylierung von Bcl10. Diese Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Koexpression einer Kinase nicht zur Phosphorylierung von Bcl10 ausreicht und die Beobachtungen in spezifischer Weise von der Funktionalität der IKK $\beta$ -Kinase-Domäne abhängig sind.



**Abbildung 3.11 Spezifität der Bcl10 Phosphorylierung durch IKK $\beta$ .** Koexpression der entsprechenden Epitop-markierten Proteine in HEK293-Zellen zeigt, dass neben IKK $\beta$  weder IKK $\alpha$  noch PKC $\theta$  die Phosphorylierung von Bcl10 induzieren. Die Bcl10-Phosphorylierung durch IKK $\beta$  ist abhängig von der Funktionalität der IKK $\beta$ -Kinase-Domäne.

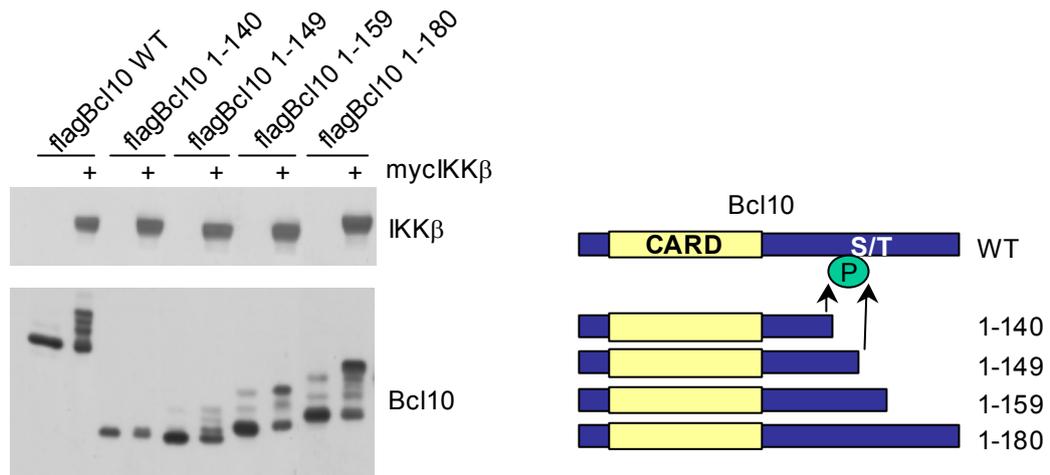
Um zu analysieren, ob IKK $\beta$  Bcl10 direkt phosphoryliert, wurden *in vitro* Kinasereaktionen mit rekombinantem IKK $\beta$ -Protein durchgeführt. Dabei wurde die Phosphoakzeptor-Fähigkeit von GSTIkB $\alpha$ , welches ein gut charakterisiertes Substrat von IKK $\beta$  ist, mit der von GSTBcl10 verglichen. Bakteriell exprimiertes und gereinigtes GSTIkB $\alpha$  1-53, welches die N-terminalen IKK $\beta$ -Phosphorylierungsstellen (Serin 32 und Serin 36) beinhaltet, lässt sich *in vitro* direkt von rekombinantem IKK $\beta$  phosphorylieren (Abbildung 3.12 a). Im Vergleich mit GSTIkB $\alpha$  ist bakteriell exprimiertes GSTBcl10 ein sehr viel schlechteres Substrat von rekombinantem IKK $\beta$  und zeigt in der Kinasereaktion mit gereinigten Proteinen keine signifikante Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu wird GSTBcl10 unter Verwendung von IKK-Präzipitat aus aktivierten Jurkat T-Zellen effizient phosphoryliert (Abbildung 3.12 b). Die Intensität des Bcl10-Phosphorylierungssignals ist zwar vergleichsweise schwächer als bei GSTIkB $\alpha$ , aber spezifisch abhängig von der Aktivierung der Zellen durch PMA/Iono. Dies deutet an, dass für die IKK $\beta$ -vermittelte Bcl10-Phosphorylierung ein weiterer, noch

unbekannter Kofaktor benötigt wird, der unter Verwendung gereinigter Proteine in der Kinasereaktion fehlt, aber bei der Immunpräzipitation von endogenem IKK kopräzipitiert wird. Bei Durchführung der Kinasereaktion in Gegenwart eines IKK $\beta$ -Inhibitors tritt eine starke Reduktion der Phosphorylierung von Bcl10 auf, was wiederum IKK $\beta$  als direkte Bcl10-Kinase nahe legt (A. Oeckinghaus, unveröffentlichte Beobachtungen)



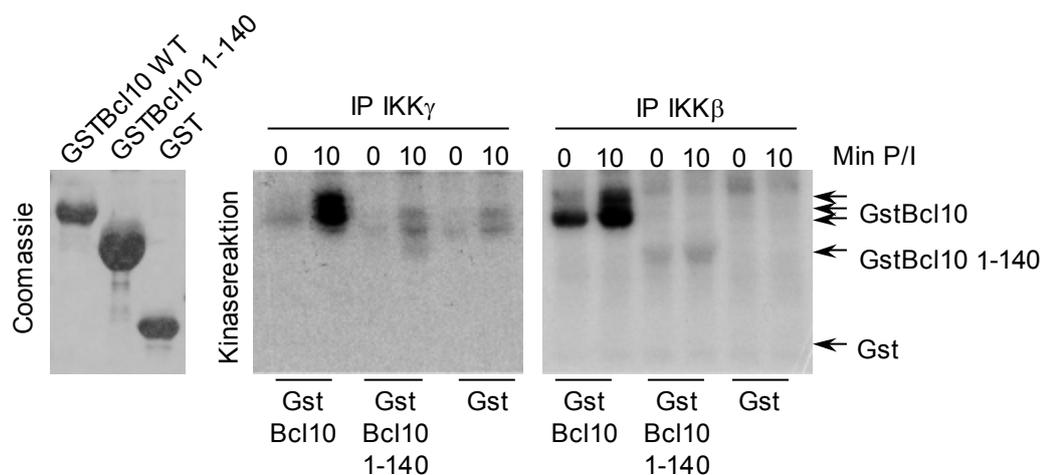
**Abbildung 3.12 Phosphorylierung von Bcl10 durch den aktivierten IKK-Komplex.** (a) *In vitro* Kinasereaktion mit gereinigten Proteinen: GSTBcl10 ist im Vergleich mit GSTIkB $\alpha$  1-53 ein schlechtes Substrat von rekombinantem IKK $\beta$ . (b) *In vitro* Kinasereaktion mit IKK-Präzipitat aus PMA/Iono-aktivierten Jurkat T-Zellen: GSTBcl10 wird zwar schwächer als GSTIkB $\alpha$ , aber spezifisch in Abhängigkeit vom Stimulus phosphoryliert. Die Coomassie-Färbungen bestätigen ausgeglichene eingesetzte Proteinmengen.

Im Folgenden wurde die Bestimmung der Phosphoakzeptor-Region von Bcl10 durch Koexpressionsstudien in HEK293-Zellen unter Verwendung von IKK $\beta$  und verschiedener Epitop-markierter, C-terminal trunktierter Bcl10-Mutanten durchgeführt (Abbildung 3.13). Während flagBcl10 1-140 nach Koexpression von IKK $\beta$  nicht phosphoryliert wird, zeigen die Mutanten flagBcl10 1-149 und flagBcl10 1-159 zwar eine schwächere, aber deutlich erkennbare IKK $\beta$ -abhängige Phosphorylierung im Vergleich mit flagBcl10 WT. Diese Beobachtungen grenzen den IKK $\beta$ -abhängigen Phosphoakzeptorbereich auf die C-terminale Region von Bcl10 ein.



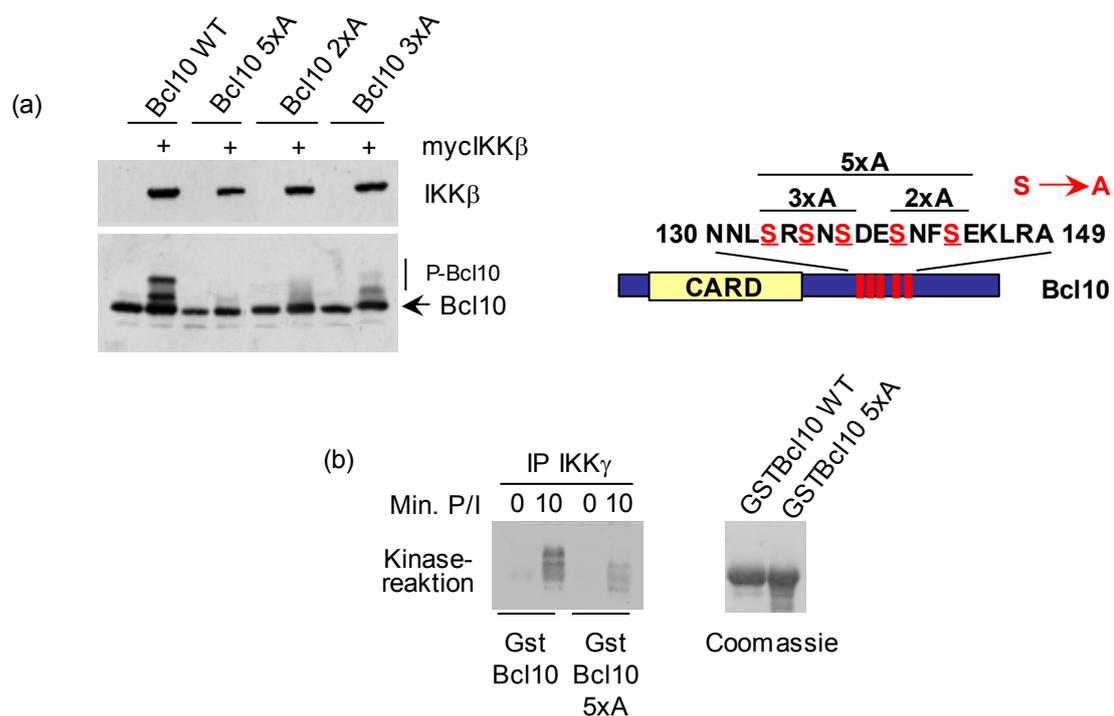
**Abbildung 3.13 Eingrenzung der Phosphoakzeptor-Region von Bcl10.** Koexpressionsstudien in HEK293-Zellen mit C-terminal deletierten Bcl10-Mutanten ergeben, dass die IKK $\beta$ -abhängige Phosphorylierung von Bcl10 im C-terminalen Bereich stattfindet, da Bcl10 1-140 nicht, Bcl10 1-149 und Bcl10 1-159 aber wieder phosphoryliert werden. Zur Verdeutlichung dient die schematische Angabe der verwendeten Bcl10-Deletionsmutanten.

*In vitro* Kinasereaktionen bestätigen die Ergebnisse der HEK293-Koexpressionsstudien, da sich die C-terminale GSTBcl10 Deletionsmutante 1-140 im Gegensatz zu GSTBcl10 WT unter Verwendung von IKK-Präzipitat aus aktivierten Jurkat T-Zellen nicht phosphorylieren lässt. (Abbildung 3.14). GSTBcl10 WT wird wie erwartet nicht nur von aktiviertem IKK $\gamma$ -, sondern auch von aktiviertem IKK $\beta$ -Präzipitat phosphoryliert.



**Abbildung 3.14 IKK-Präzipitat phosphoryliert Bcl10 im C-Terminus.** In *in vitro* Kinasereaktionen mit IKK $\gamma$ - und IKK $\beta$ -Präzipitat aus aktivierten Jurkat T-Zellen wird GSTBcl10 WT, aber nicht die C-terminale Deletionsmutante GSTBcl10 1-140 phosphoryliert. Die Coomassie-Färbung dokumentiert die Mengenverhältnisse der eingesetzten Proteine.

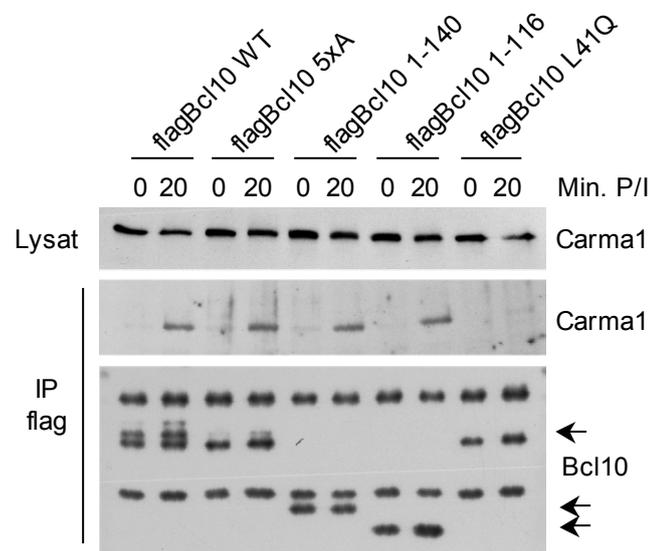
Um die exakte IKK $\beta$ -abhängige Phosphoakzeptor-Position von Bcl10 zu erhalten, wurden C-terminale Bcl10-Punktmutanten mit IKK $\beta$  in HEK293 koexprimiert. In der relevanten Region von Bcl10 zwischen Aminosäure 140 und 149 liegen zwei potentielle Phosphoakzeptor-Serine auf Position 141 und 144. Die Mutation dieser Serine zu Alanin (Bcl10 2xA) führt zu einer starken Reduktion der IKK $\beta$ -vermittelten Phosphorylierung, allerdings ist noch restliche Phosphorylierung zu erkennen. Erst zusätzlicher Austausch der Serine an den Positionen 134, 136 und 138 (Bcl10 5xA) unterdrückt die IKK $\beta$ -vermittelte Bcl10-Phosphorylierung (Abbildung 3.15 a). Da alleinige Mutation der Serine 134, 136 und 138 (Bcl10 3xA) ebenfalls nur zu einer moderaten Reduktion der Bcl10-Phosphorylierung führt, sind Phosphoakzeptor-Serine in beiden Abschnitten Ziel IKK $\beta$ -abhängiger Phosphorylierung. Im Einklang mit diesem Ergebnis zeigt gereinigtes GSTBcl10 5xA in einer Kinasereaktion mit IKK $\gamma$ -Präzipitat aus PMA/Iono-aktivierten Jurkat T-Zellen stark reduzierte Phosphorylierung im Vergleich zu GSTBcl10 WT (Abbildung 3.15 b).



**Abbildung 3.15 IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von Bcl10 findet an mehreren C-terminalen Serinen statt.** (a) Bcl10 5xA wird bei Koexpression von IKK $\beta$  nicht mehr phosphoryliert, wobei Bcl10 2xA und Bcl10 3xA jeweils noch restliche Phosphorylierung zeigen. Zur besseren Übersicht dient die schematische Angabe der verschiedenen Bcl10-Punktmutationen. (b) In einer Kinasereaktion unter Verwendung von IKK $\gamma$ -Präzipitat wird GSTBcl10 5xA signifikant schwächer phosphoryliert als GSTBcl10 WT. Die Coomassie-Färbung bestätigt den Einsatz äquivalenter Proteinmengen in der Kinasereaktion.

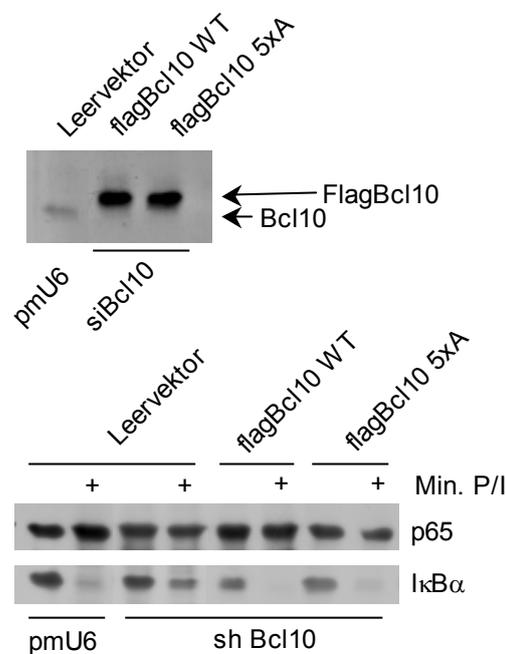
### 3.1.5 C-terminale Bcl10-Phosphorylierung ist keine Voraussetzung für primäre NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass Phosphorylierung von Bcl10 direkt oder indirekt von IKK $\beta$  katalysiert wird und Inaktivierung von IKK $\beta$  die CBM-Komplexbildung verhindert. Allerdings sprechen u.a. die gegenläufige Kinetik von CBM-Komplexbildung und Bcl10-Phosphorylierung gegen eine aktivierende Funktion der Bcl10-Phosphorylierung. Um auszuschließen, dass C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 zur IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung benötigt wird, wurde die Fähigkeit der phosphorylierungs-defekten Mutante Bcl10 5xA im Vergleich mit verschiedenen Epitop-markierten Bcl10-Konstrukten zur Stimulus-induzierten Interaktion mit Carma1 in transfizierten Jurkat T-Zellen getestet (Abbildung 3.16). Sowohl Bcl10 5xA, wie auch Bcl10 1-140 und Bcl10 1-116 zeigen trotz mutierter oder deletierter Phosphoakzeptorregion mit Bcl10 WT vergleichbare Affinität zu endogenem Carma1 nach T-Zell Aktivierung mit PMA/Iono. Im Gegensatz dazu interagiert die Bcl10-Mutante L41Q, deren Aminosäureaustausch die Funktionalität der CARD zerstört, nicht mehr mit Carma1. Demnach ist unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen die funktionale CARD zur Bildung des CBM-Komplexes ausreichend und eine potentielle C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 für die primäre Bildung des Komplexes keine Voraussetzung.



**Abbildung 3.16 Die Bcl10-CARD vermittelt Stimulus-induzierte Bcl10-CARMA1-Interaktion.** Jurkat T-Zellen wurden mit verschiedenen Epitop-markierten Bcl10-Konstrukten transfiziert und hinsichtlich der PMA/Iono-induzierbaren Bcl10-CARMA1-Interaktion untersucht. Mutation oder Deletion der C-terminalen Phosphoakzeptor-Region von Bcl10 hat keinen Einfluss auf die primäre CBM-Komplexbildung. Eine funktionale CARD ist dafür unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen ausreichend.

Weiterführend sollte festgestellt werden, ob Mutation der C-terminalen Bcl10 Phosphoakzeptor-Region eine Rolle auf NF- $\kappa$ B-aktivierende Mechanismen hat, die möglicherweise CBM-Komplex unabhängig sind. Hierzu wurden RNAi-kombinierte Rekonstitutionsexperimente in Jurkat T-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.17). Als Maß für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde die Stimulus-abhängige Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  herangezogen. Durch Behandlung der Zellen mit shRNA gegen Bcl10 wird die PMA/Iono-induzierte Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  stark verzögert. Rekonstitution shBcl10-vorbehandelter Zellen mit flag-markiertem Bcl10 WT oder Bcl10 5xA, deren shBcl10-Hybridisierungssequenz durch Einführung stiller Mutationen zerstört wurde, führt in beiden Fällen zur Wiederherstellung der Stimulus-abhängigen I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation auf das Niveau Leervektor-transfizierter Kontrollzellen.

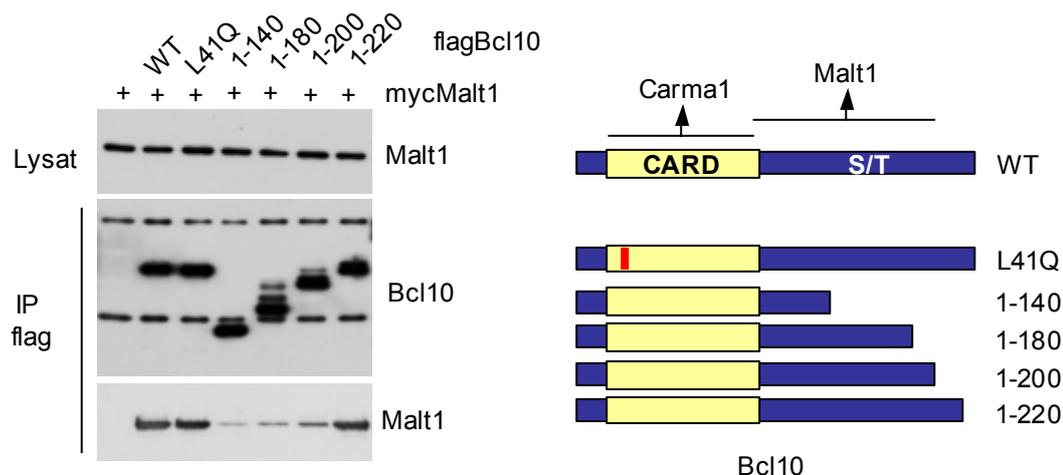


**Abbildung 3.17 C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 spielt keine Rolle bei primärer NF- $\kappa$ B-Aktivierung.** shBcl10-Behandlung von Jurkat T-Zellen verursacht die Verzögerung PMA/Iono-induzierter Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ . Sowohl durch Expression von flagBcl10 WT wie auch durch Expression von flagBcl10 5xA wird die I $\kappa$ B $\alpha$ -Stabilisierung rückgängig gemacht.

Zusammengefasst belegen diese Experimente, dass Mutation der C-terminalen Phosphorylierungsstellen von Bcl10 im Bereich zwischen Serin 134 und Serin 144 nicht die primäre Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinflusst.

### 3.1.6 C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 reguliert Bindungsaffinitäten innerhalb des CBM-Komplexes

Unter 3.1.5 wurde gezeigt, dass die N-terminale CARD von Bcl10 zur Vermittlung der Bcl10-Carma-Interaktion ausreicht. Zur Charakterisierung möglicher Funktionen der C-terminalen Region von Bcl10 in Bezug auf die Bcl10-Malt1-Bindung wurde die Interaktionsoberfläche von Bcl10 und Malt1 durch Kotransfektionsstudien in HEK293-Zellen ermittelt (Abbildung 3.18). Aus der Analyse flag-markierter Bcl10-Präzipitate geht hervor, dass die Bcl10-Malt1-Interaktion nicht an die Funktionalität der CARD geknüpft ist, vielmehr führt eine stufenweise Deletion des C-terminalen Bereichs von Bcl10 zu einer substantiellen Schwächung der Interaktion. Diese Daten zeigen, dass die C-terminale Region von Bcl10, welche die IKK $\beta$ -abhängige Phosphorylierungsstelle beinhaltet, eine wichtige Funktion bei der Bcl10-Malt1-Interaktion übernimmt.

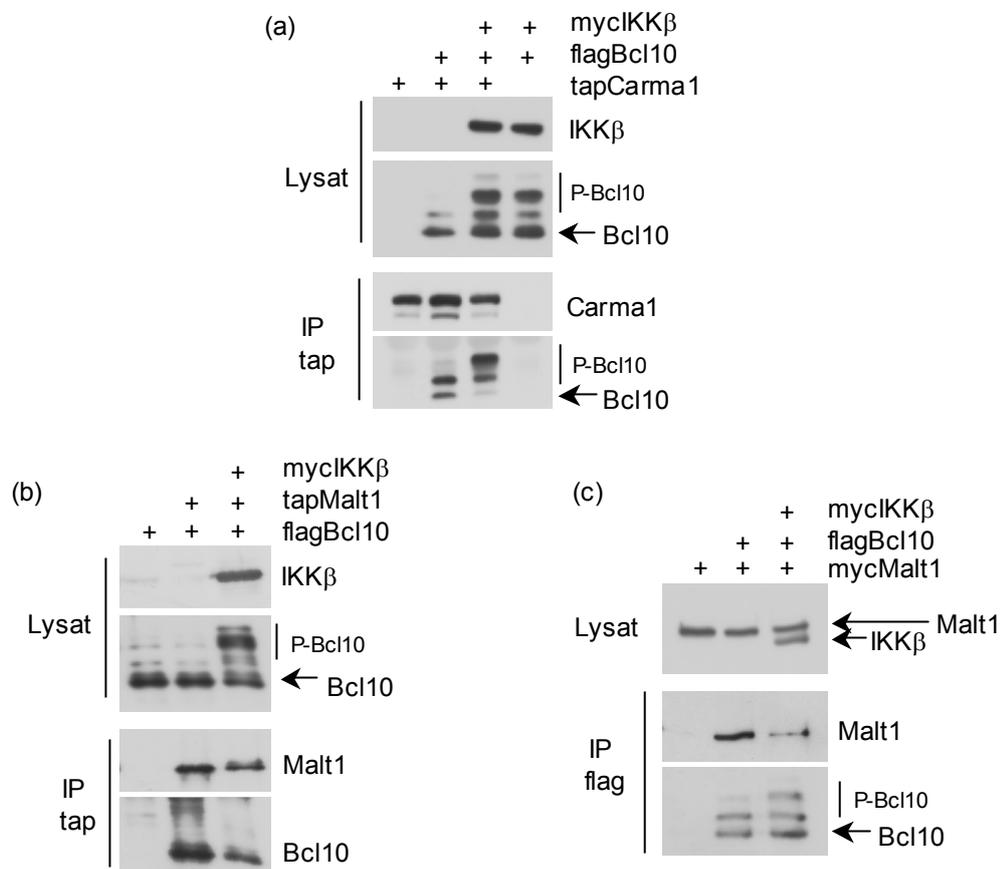


**Abbildung 3.18 Bestimmung der Malt1-Bindungsstelle von Bcl10.** Stufenweise Deletion des C-terminalen Bereichs von Bcl10 führt zu einer sukzessiven Schwächung der Bcl10-Malt1-Interaktion. Inaktivierung der CARD von Bcl10 hat keinen Einfluss auf die Bindungsstärke. Zur besseren Übersicht sind die verwendeten Bcl10-Mutanten schematisch mit Kennzeichnung der Carma1- und Malt1-Interaktionsoberflächen angegeben.

Weiterhin wurde im vorhergehenden Abschnitt aufgedeckt, dass der C-Terminus von Bcl10 offenbar nicht in die primäre CBM-Komplexbildung involviert ist. Um eventuelle Einflüsse C-terminaler Bcl10-Phosphorylierung auf sekundäre Regulationsmechanismen zu untersuchen, wurden die Proteinaffinitäten von Bcl10 zu Carma1 und Malt1 mit und ohne Phosphoinduktion durch IKK $\beta$  in kotransfizierten HEK293-Zellen genauer untersucht. Die

Untersuchung von tapCarma1-Präzipitat zeigt, dass phosphoryliertes Bcl10 über die Immunopräzipitation vom Carma1 angereichert wird. Durch IKK $\beta$ -Kotransfektion zusätzlich induzierte Bcl10-Phosphorylierung verstärkt diesen Effekt, es bindet fast ausschließlich C-terminal phosphoryliertes Bcl10 an Carma1 (Abbildung 3.19 a). Die CARD-vermittelte Bcl10-Carma1-Bindung erscheint daher durch IKK $\beta$ -abhängige C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 verstärkt.

Interessanterweise führt eine vergleichbar angelegte Analyse der Bcl10-Malt1-Interaktion zu konträren Effekten. Die Analyse von tapMalt1-Immunopräzipitat ergibt, dass ausschließlich unphosphoryliertes Bcl10 mit Malt1 kopräzipitiert. (Abbildung 3.19 b).



**Abbildung 3.19 C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 durch IKK $\beta$  beeinflusst die Bcl10-Bindungsaffinitäten zu Carma1 und Malt1.** (a) Die Phosphorylierung von Bcl10 verstärkt die Bcl10-Carma1-Interaktion. Nach IKK $\beta$ -Kotransfektion bindet hauptsächlich C-terminal phosphoryliertes Bcl10 an Carma1. (b) Im Gegensatz dazu schwächt IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von Bcl10 die Bcl10-Malt1-Interaktion, da C-terminal phosphoryliertes Bcl10 nicht mit Malt1 kopräzipitiert und (c) Malt1 deutlich schwächer an C-terminal phosphoryliertes Bcl10 bindet.

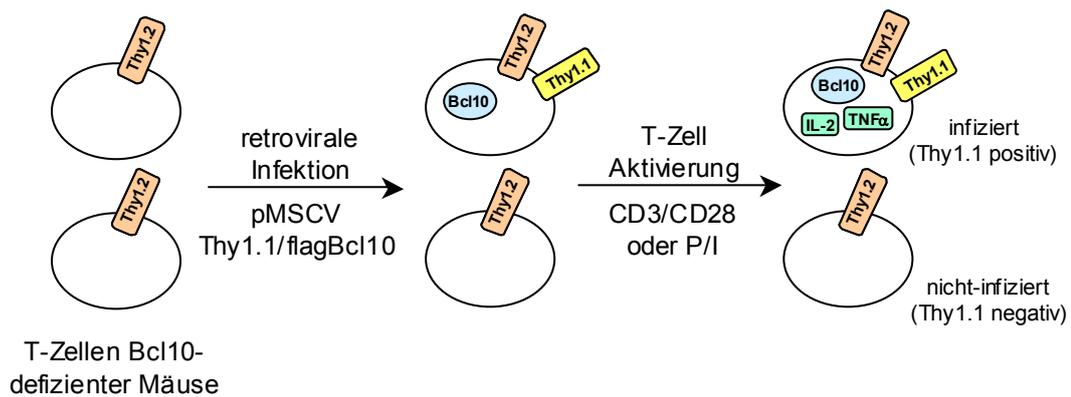
Umgekehrt führt die Phosphorylierung von Bcl10 durch IKK $\beta$  zur Reduktion der Bcl10-Malt1 Affinität, es wird deutlich weniger Malt1 mit phosphoryliertem als mit unphosphoryliertem flagBcl10 kopräzipitiert (Abbildung 3.19 c). Diese Ergebnisse deuten an, dass IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von Bcl10 im C-terminalen Bereich, der zuvor als essentiell für die Bcl10-Malt1 Bindung identifiziert wurde, einen negativ-regulatorischen Einfluss auf die Bcl10-Malt1 Bindung hat, da phospho-Bcl10 schwächer oder gar nicht an Malt1 bindet.

Unter Berücksichtigung der Daten aus 3.1.5 ergibt sich hieraus die Möglichkeit, dass die Phosphorylierung von Bcl10 zwar nicht Voraussetzung für primäre Komplex Bildung ist, aber dennoch Einfluss auf die Komplexaffinitäten innerhalb des CBM-Komplexes als Teil eines sekundären Regulationssystems nimmt.

### **3.1.7 C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 schwächt T-Zell Aktivierung**

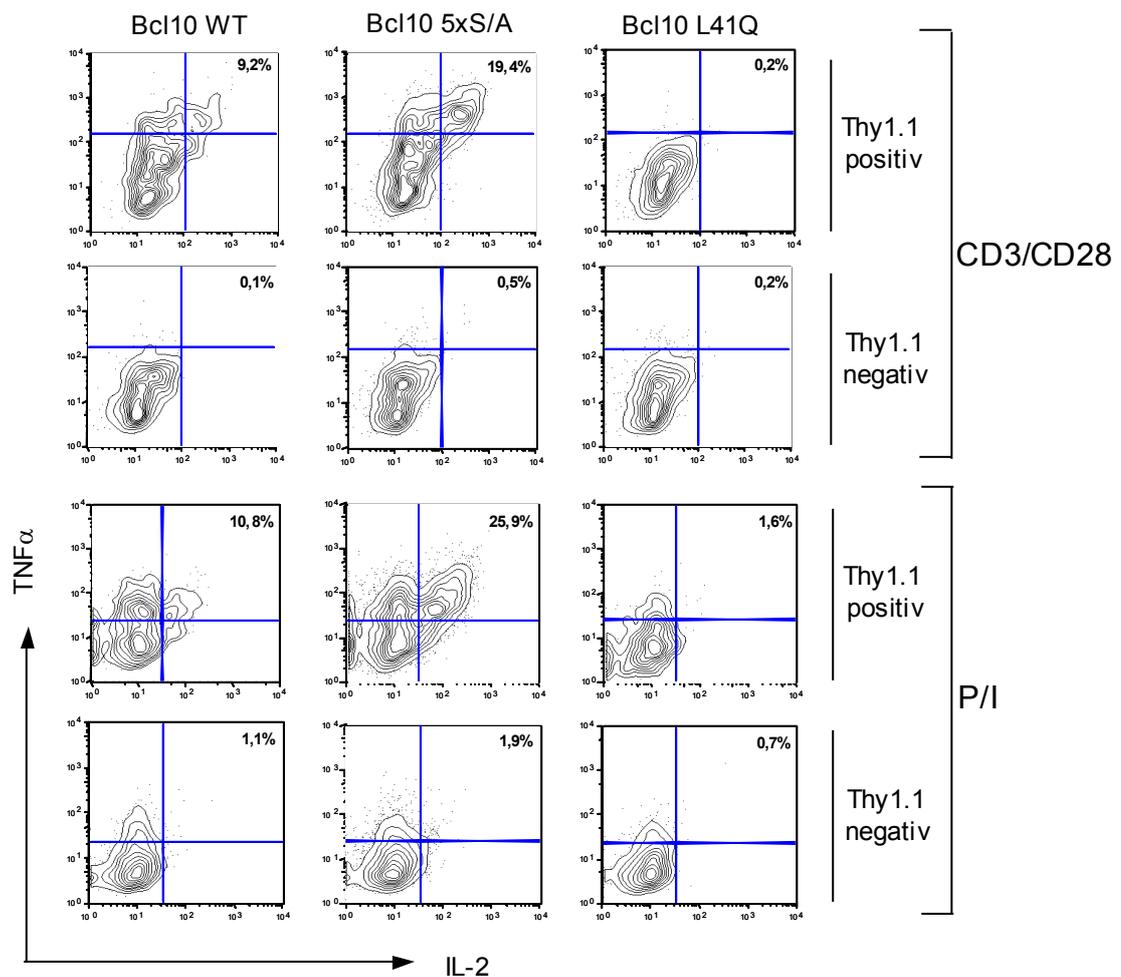
Um zu überprüfen, ob C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 bei der Aktivierung von T-Zellen unter physiologischen Bedingungen in Form eines sekundären Regulationsmechanismus' eine Rolle spielt, wurden Rekonstitutionsexperimente in primären Bcl10-defizienten T-Zellen durchgeführt. T-Zellen aus Bcl10 „Knock Out“-Mäusen sind aufgrund einer selektiven Blockade des NF- $\kappa$ B Signalweges nicht mehr in der Lage, nach Inkubation mit T-Zell aktivierenden Stimuli proliferationsfördernde oder proinflammatorische Zytokine wie IL-2 und TNF $\alpha$  zu produzieren [Ruland et al, 2001]. Zur Untersuchung des Einflusses C-terminaler Bcl10-Phosphorylierung auf die Fähigkeit primärer T-Zellen, Stimulus-induziert IL-2 und TNF $\alpha$  zu produzieren, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Bcl10 defizienten-Mäusen retroviral mit flagBcl10 WT, flagBcl10 5xA und flagBcl10 L41Q rekonstituiert.

Die T-Zellen Bcl10-defizienter Mäuse exprimieren aufgrund des genetischen Hintergrunds der Tiere ausschließlich eine Isoform des Oberflächenproteins Thy1 („Thymus Cell Antigen 1“), Thy1.2. Da die Möglichkeit besteht, Thy1.1, eine weitere Thy1-Isoform neben Thy1.2 selektiv mittels FACS-basierter Analyse zu detektieren, konnten erfolgreich infizierte T-Zellen aufgrund der Expressionskopplung von Bcl10 und Thy1.1 über eine IRES („Internal Ribosome Entry Segment“)-Sequenz des retroviralen Vektors anhand der Thy1.1-Oberflächenexpression identifiziert werden (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20** Schematische Verdeutlichung der Identifizierung retroviral rekonstituierter, Bcl10-defizienter CD4<sup>+</sup> T-Zellen. T-Zellen der Bcl10-defizienten Mäuse exprimieren aufgrund des genetischen Hintergrunds der Tiere ausschließlich Thy1.2. Da die erfolgreiche Infektion zur simultanen ektopischen Expression von Bcl10 und Thy1.1 führt, konnten infizierte Zellen anhand von Thy1.1-Oberflächenexpression identifiziert werden. Die Fähigkeit zur Rekonstitution der Antigenrezeptor-vermittelten Zytokinproduktion durch Bcl10-Expression wurde weiterführend analysiert.

Die Fähigkeit zur Wiederherstellung der Antigenrezeptor-induzierten Zytokinproduktion von Bcl10 WT, Bcl10 5xA und Bcl10 L41Q wurde nach sechsständiger Aktivierung der infizierten Zellen durch FACS-basierte Analyse der intrazellulären IL-2- und TNF $\alpha$ -Produktion bestimmt. Wie erwartet zeigen Thy1.1-negative und damit auch Bcl10-negative Zellen keine CD3/CD28-Antikörper- oder PMA/Iono-induzierbare Zunahme der intrazellulären Zytokinproduktion. Auch die mit der CARD-defekten Mutante Bcl10 L41Q rekonstituierten Zellen sind nicht in der Lage, auf T-Zell aktivierende Stimuli zu reagieren. Allerdings ergaben die Untersuchungen, dass ein signifikanter Anteil der retroviral infizierten „Knock Out“- T-Zellen nach Rekonstitution mit Bcl10 WT wieder auf T-Zell-aktivierende Stimuli reagiert, gekennzeichnet durch den deutlichen Anstieg der intrazellulären Produktion von IL-2 und TNF- $\alpha$ . Darüber hinaus ist die Fähigkeit der phosphorylierungs-defekten C-terminalen Mutante Bcl10 5xA zur Wiederherstellung der Zytokinproduktion im Vergleich mit Bcl10 WT noch einmal deutlich höher (Abbildung 3.21). Die Mutation der Phosphoakzeptor-Serine von Bcl10 führt demnach zu einer Verstärkung der T-Zell Antwort auf CD3/CD28- oder PMA/Iono-Stimulation.



**Abbildung 3.21 Mutation der C-terminalen Phosphorylierungsstelle von Bcl10 verstärkt Zytokin-Produktion in primären T-Zellen.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden retroviral mit Bcl10 WT, Bcl10 5xA und Bcl10 L41Q rekonstituiert und die intrazelluläre Zytokinproduktion per FACS analysiert. Koexpression von Bcl10 mit dem Oberflächenmarker Thy1.1 ermöglicht die Identifizierung infizierter Zellen. Die Expression von Bcl10 WT und Bcl10 5xA, aber nicht die Expression von L41Q stellt die Fähigkeit der Zellen zur CD3/CD28- oder PMA/Iono-induzierten IL-2- und TNF $\alpha$ -Produktion wieder her. Im Vergleich mit Bcl10 WT ist die Wiederherstellung der Antigenrezeptor-induzierten Zytokinproduktion durch Bcl10 5xA deutlich effektiver. Dies deutet auf eine negativ-regulatorische Funktion der C-terminalen Bcl10-Phosphorylierungsstelle hin. Zur Kontrolle der Spezifität wurden auch nicht infizierte Zellen analysiert, die keine induzierbare Zytokinproduktion zeigen.

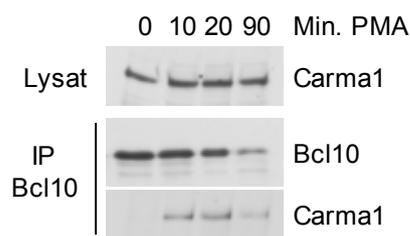
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Funktionalität der CARD von Bcl10 im Einklang mit den Ergebnissen aus 3.1.5 auch *in vivo* für die Aktivierung von primären T-Zellen essentiell ist. Zusätzlich deuten die Beobachtungen eine negativ-regulatorische Funktion der C-terminalen Serine 134, 136, 138, 141 und 144 von Bcl10 bei der Aktivierung von T-Zellen an, da deren

Mutation in verstärkter Zytokinproduktion resultiert. Interessanterweise wurden diese Serine in den Abschnitten 3.1.4 und 3.1.5 mit CBM-Komplex-interner Modulierung der Bindungsaffinitäten durch IKK $\beta$ -abhängige Phosphorylierung in Verbindung gebracht. Die Analyse der Thy1.1 negativen, nicht infizierten Zellen belegt, dass die beobachteten Effekte nach Rekonstitution in spezifischer Weise von der Bcl10-Expression abhängen.

## 3.2 Regulierung der CBM-Komplexaktivität durch Degradation von Bcl10

### 3.2.1 Lysosomale Degradation von Bcl10 nach T-Zell Aktivierung

In Kapitel 3.1 dieser Arbeit werden Daten präsentiert, die andeuten, dass C-terminale Phosphorylierung von Bcl10 interne CBM-Komplexaffinitäten reguliert und dadurch zur Modulierung der Zellantwort nach Aktivierung der Antigenrezeptor-vermittelten Signalwege beiträgt. Dabei handelt es sich um Prozesse, die bereits in den ersten Minuten nach Beginn der Stimulation beobachtet werden konnten. Nach längerer Stimulationszeit treten augenscheinlich andere Prozesse in den Vordergrund, wie die Analyse der Bcl10-Carma1-Interaktion in Jurkat T-Zellen nach 90-minütiger Stimulation durch PMA/Iono zeigt. Es fällt auf, dass die Menge an präzipitiertem Bcl10-Protein mit zunehmender Stimulationsdauer stark abnimmt und im Zuge dessen auch die Menge an kopräzipitiertem Carma1 reduziert ist (Abbildung 3.22).

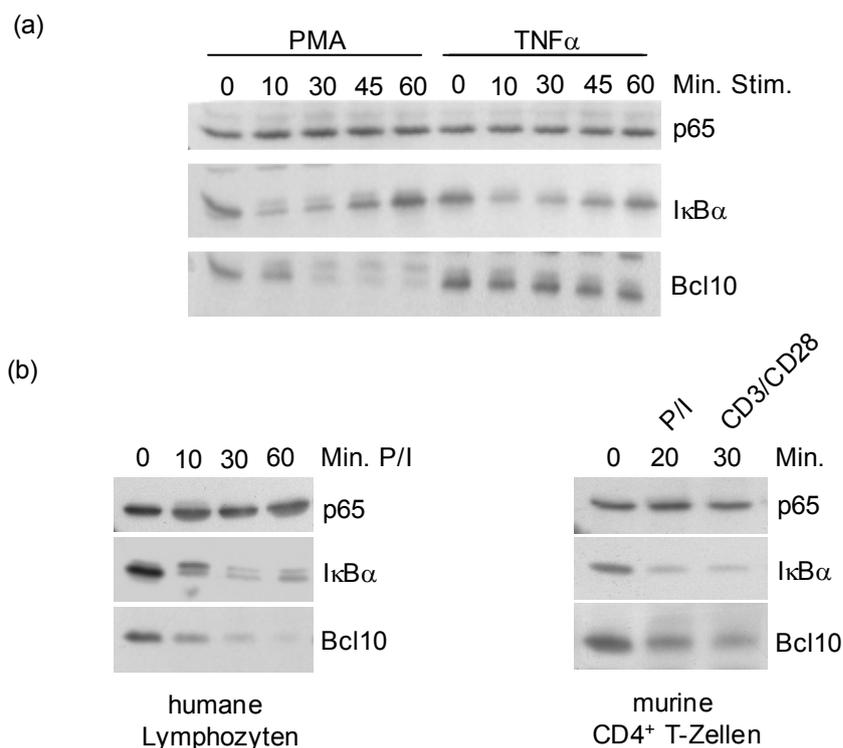


**Abbildung 3.22 Die Bcl10 Proteinmenge nimmt bei längerer Stimulationszeit stark ab.** Die Analyse der Bcl10-Carma1-Interaktion in Jurkat T-Zellen zeigt, dass nach 90-minütiger PMA/Iono-Stimulation die Menge an direkt präzipitiertem Bcl10-Protein und im Zuge dessen auch die Menge an kopräzipitiertem Carma1-Protein stark abnimmt.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen die Phosphorylierung von Bcl10 nicht detektierbar ist. Da für die Experimente in Kapitel 3.2 ein

anderer Zellyse-Puffer zur Herstellung zytoplasmatischer Extrakte als unter 3.1 verwendet wurde, könnte mögliche Instabilität der Bcl10-Phosphoformen im veränderten Milieu eine Erklärung für die Beobachtung sein.

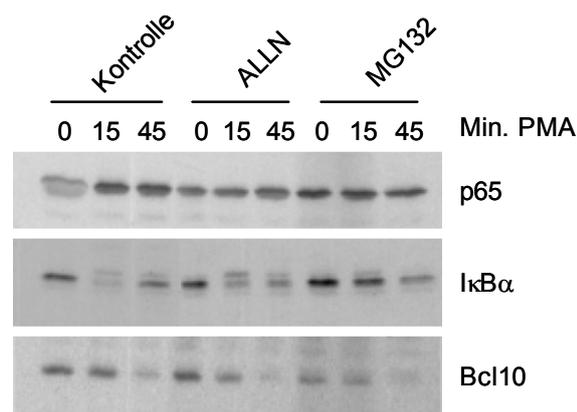
Die Untersuchung zytoplasmatischer Extrakte aus aktivierten Jurkat T-Zellen ergibt, dass die Stimulation mit PMA zu einer stetigen Reduzierung des Bcl10-Proteinlevels führt (Abbildung 3.23). Im Gegensatz dazu führt TNF $\alpha$ -Stimulation der Zellen zwar zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, angezeigt durch die Stimulations-abhängige Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , der Level an Bcl10-Protein bleibt in diesem Fall allerdings unverändert. Es handelt sich hier also um eine Beobachtung, die spezifisch mit T-Zell Aktivierung in Zusammenhang steht. Um zu überprüfen, ob die beschriebenen Effekte auch in primären Zellen zu beobachten sind, wurden humane Lymphozyten und murine CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit T-Zell aktivierenden Stimuli behandelt. Sowohl die Stimulation mit PMA/Iono als auch mit CD3/CD28-Antikörpern führt zu einer Reduktion der zytoplasmatischen Bcl10-Proteinmenge in primären Zellen.



**Abbildung 3.23 T-Zellaktivierung zieht Reduktion der zytoplasmatischen Bcl10-Proteinkonzentration nach sich.** (a) Die Analyse von zytoplasmatischen Jurkat T-Zell Extrakten zeigt, dass PMA Stimulation, aber nicht TNF $\alpha$ -Stimulation zur Reduktion der Bcl10-Proteinmenge führt. Die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  bestätigt die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkette, p65 Proteinlevel dokumentiert ausgeglichene Proteinladung. (b) Auch in primären humanen Lymphozyten und murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert T-Zellaktivierung durch PMA/Iono oder CD3/CD28-Antikörper die Reduktion der Bcl10-Proteinmenge.

Weiterführende Analysen konnten eindeutig zeigen, dass die Abnahme der Bcl10-Konzentration nicht auf den Transport des Proteins in unlösliche Zellkompartimente, sondern auf Stimulus-induzierte Proteindegradation zurückzuführen ist [Scharschmidt et al, 2004].

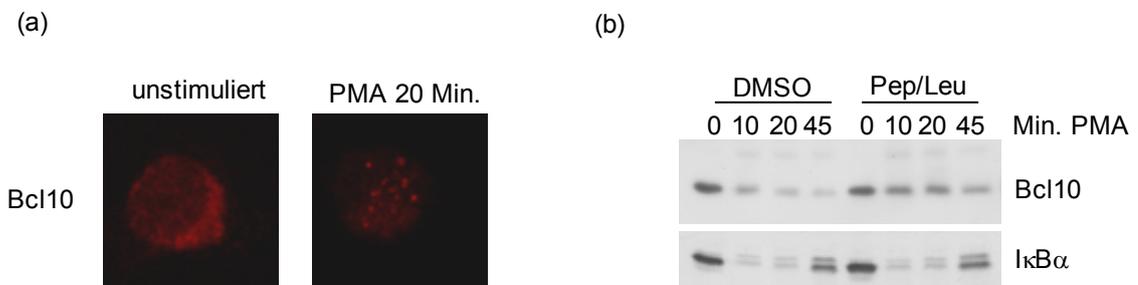
Die Stimulus-induzierte Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  durch das 26S-Proteasom spielt bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle. Um zu untersuchen, ob Bcl10 ebenfalls proteosomal degradiert wird, wurden Jurkat T-Zellen vor der Aktivierung durch PMA mit den Inhibitoren ALLN und MG132 vorbehandelt. Diese hemmen spezifisch die Funktion des Proteasoms und stabilisieren Zielproteine des proteosomalen Abbauweges. Allerdings führt weder ALLN- noch MG132-Vorbehandlung zur Stabilisierung des Bcl10-Proteinlevels (Abbildung 3.24). Im Gegensatz dazu ist die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation durch Vorbehandlung von ALLN deutlich verzögert und durch MG132 nahezu blockiert, was die grundsätzliche Wirkung der Substanzen belegt.



**Abbildung 3.24 Bcl10 wird nicht durch das Proteasom abgebaut.** Die Analyse von Jurkat T-Zellextrakt zeigt, dass Vorbehandlung der Zellen mit den proteosomalen Inhibitoren ALLN oder MG132 zwar die PMA-induzierte Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  verhindert, aber keinen Einfluss auf die Stabilität von Bcl10 hat.

Es ist bekannt, dass membranständige Rezeptoren wie der TCR Signal-abhängig internalisiert, in lysosomale Vesikel rekrutiert und degradiert werden, allerdings wurde bis heute kein derartiger Regulationsmechanismus für zytoplasmatische Proteine aufgedeckt. Zur Analyse der intrazellulären Proteinlokalisierung von Bcl10 wurden daher aktivierte Jurkat T-Zellen konfokalmikroskopisch untersucht. Stimulation der Zellen durch PMA führt zur Akkumulation von Bcl10 in Vesikel-ähnlichen Strukturen (Abbildung 3.25 a). In weiterführenden Immunfluoreszenzmikroskopie-Analysen wurde eine partielle

Kolokalisation von Bcl10 mit den lysosomalen Markerproteinen LAMP1 („Lysosomal Associated Membrane Protein 1“) und Cathepsin B in den Stimulus-induziert gebildeten Strukturen festgestellt [Scharschmidt et al, 2004]. Daraufhin wurde unter Verwendung pharmakologisch wirksamer Substanzen die Auswirkung lysosomaler Inhibitoren auf die Proteinstabilität von Bcl10 untersucht. Inkubation von Jurkat T-Zellen mit einer Kombination der Inhibitoren Pepstatin A und Leupeptin, die Lysosomen-assoziierte Proteasen hemmen, führt zu einer deutlichen Stabilisierung des Bcl10-Proteins nach T-Zell Aktivierung durch PMA (Abbildung 3.25 b). Gleichzeitig ist die Stimulus-induzierte Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  nicht beeinflusst. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse an, dass zytoplasmatisches Bcl10 nach der Aktivierung von T-Zellen in lysosomale Vesikel rekrutiert wird und anschließend durch den lysosomalen Abbauweg degradiert wird.

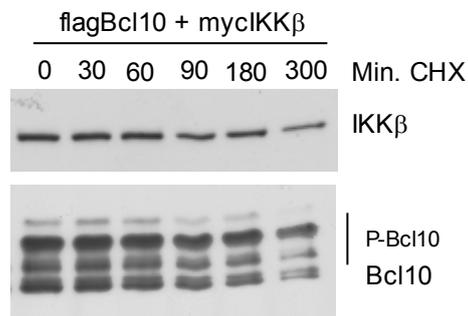


**Abbildung 3.25 Lysosomen-Inhibition stabilisiert Bcl10 nach T-Zellaktivierung.** (a) Analyse der intrazellulären Proteinlokalisierung von Bcl10 in Jurkat T-Zellen. Nach PMA-Stimulation akkumuliert Bcl10 in Lysosomen-ähnlichen Strukturen. (b) Vorbehandlung von Jurkat T-Zellen mit den Protease-Inhibitoren Pepstatin A und Leupeptin verzögert die PMA/Iono-induzierte Reduzierung des Bcl10-Proteinlevels. Dies deutet einen Lysosomen-abhängigen Degradationsmechanismus für Bcl10 an.

### 3.2.2 Bcl10-Phosphorylierung ist kein Signal für anschließende Bcl10-Degradation

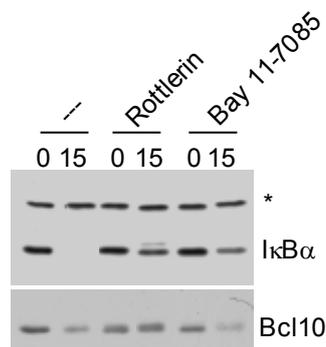
Zur Aufdeckung eines mechanistischen Zusammenhangs zwischen Bcl10-Phosphorylierung und Bcl10-Degradation wurde die Stabilität von unphosphoryliertem Bcl10 im Vergleich zu IKK $\beta$ -abhängig phosphoryliertem Bcl10 analysiert (Abbildung 3.26). Hierfür wurden HEK293-Zellen mit Epitop-markiertem Bcl10 und IKK $\beta$  kotransfiziert und mit Cycloheximide (CHX), einem Inhibitor der *de novo* Proteinbiosynthese, inkubiert, um eventuelle Stabilitätsunterschiede der unterschiedlich schnell migrierenden Bcl10-Modifikationsformen zu identifizieren. Allerdings nimmt die Proteinmenge von unphosphoryliertem und phosphoryliertem Bcl10 ohne *de novo* Synthese über die Zeit

gleichmäßig ab. Dies deutet an, dass die Phosphorylierung von Bcl10 nicht zur Stabilisierung oder Destabilisierung des Proteins beiträgt.



**Abbildung 3.26 Phosphorylierung von Bcl10 hat keinen Einfluss auf Proteininstabilität.** Die Analyse von Kotretransfektionsstudien in CHX-behandelten HEK293-Zellen ergibt, dass die Proteinmengen von C-terminal phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Bcl10 gleichmäßig abnehmen. Dies bedeutet, dass die Phosphorylierung weder Proteinabbau noch Proteininstabilisierung von Bcl10 begünstigt.

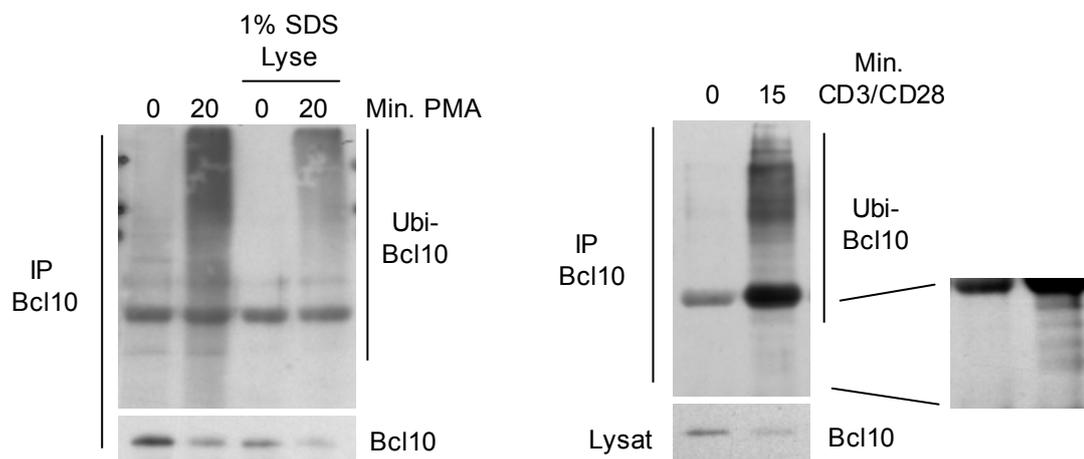
Im Einklang mit diesem Ergebnis steht die Beobachtung, dass Inhibition der IKKβ-Kinaseaktivität durch Bay 11-7085 in PMA/Iono-stimulierten Jurkat T-Zellen zwar die Stabilisierung von IκBα, nicht aber die Stabilisierung von Bcl10 nach sich zieht (Abbildung 3.27). Im Gegensatz dazu verzögert die Inhibition der Kinaseaktivität von PKCθ durch Rottlerin sowohl die Degradation von IκBα als auch die von Bcl10. Diese Beobachtung belegt, dass die Degradation von Bcl10 nach T-Zellaktivierung zwar von PKCθ abhängig ist, nicht aber durch IKKβ-induzierte Phosphorylierung vermittelt wird.



**Abbildung 3.27 Bcl10-Degradation ist nicht abhängig von IKKβ-Kinaseaktivität.** Die Analyse von Rottlerin oder Bay 11-7085 vorbehandelten Jurkat T-Zellen zeigt, dass die PMA/Iono-induzierte Bcl10-Degradation von PKCθ-, aber nicht von IKKβ-Kinaseaktivität abhängt. Die unspezifische Bande (\*) dokumentiert ausgeglichen geladene Proteinmengen.

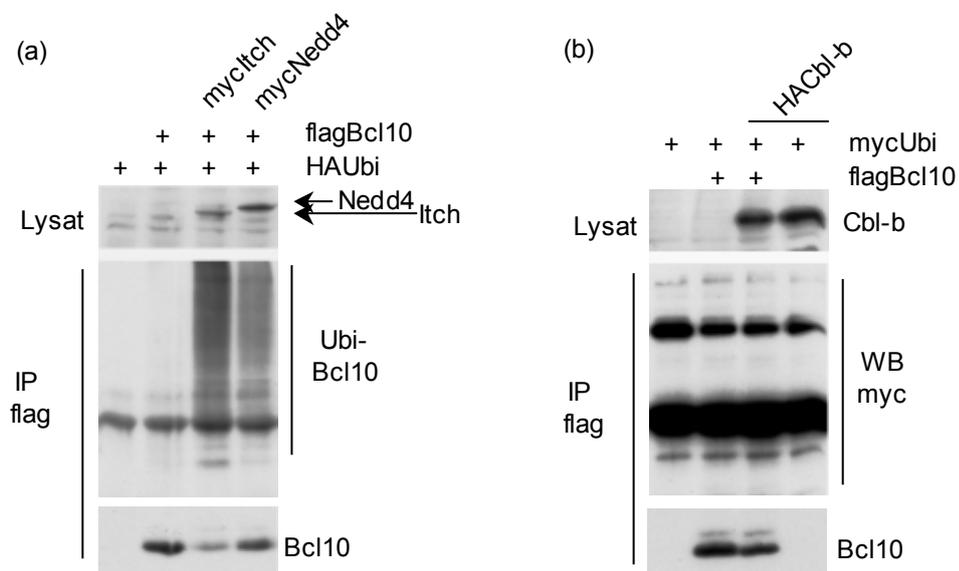
### 3.2.3 Bcl10-Ubiquitinierung durch die HECT E3-Ubiquitin-Ligasen Itch und Nedd4

In einer Vielzahl von Fällen stellt Ubiquitinierung das Signal für den Transport von Proteinen in lysosomale Vesikel dar [Hicke und Dunn, 2003]. Zur Beantwortung der Frage, ob die Stimulus-induzierte Degradation von Bcl10 auf Ubiquitin-vermittelte Prozesse zurück zu führen ist, wurde der Ubiquitinierungsstatus von Bcl10 in ruhenden und aktivierten Jurkat T-Zellen miteinander verglichen (Abbildung 3.28). Die Analyse von Bcl10-Präzipitat zeigt, dass PMA- oder CD3/CD28-Stimulation die Polyubiquitinierung von Bcl10 induziert. Längere Belichtungszeiten decken auch die Anwesenheit kurzkettiger Ubiquitinmodifikationen auf, die im Allgemeinen mit lysosomaler Degradation in Verbindung gebracht werden. Um auszuschließen, dass ein mit Bcl10-assoziiertes Protein ubiquitiniert wird, wurde die Bcl10-Ubiquitinierung unter Verwendung eines Zellyse Puffers mit 1%iger SDS-Konzentration durchgeführt. Die hohe Detergenz-Konzentration hat die Dissoziation nicht-kovalent gebundener Proteine zur Folge, wobei kovalente Protein-Modifikationen wie Ubiquitinierung bestehen bleiben. Auch unter derart stringenten Lyse-Bedingungen bleibt die Stimulus-abhängige Bcl10-Ubiquitinierung detektierbar. Das schwächere Ubiquitin-Signal kann dadurch erklärt werden, dass die Immunopräzipitation von Bcl10 im Lyse-Puffer mit hoher Detergenz-Konzentration deutlich weniger effizient ist.



**Abbildung 3.28 T-Zell Aktivierung induziert die Ubiquitinierung von Bcl10.** Die Analyse von Bcl10-Präzipitat aus PMA- oder CD3/CD28-stimulierten Jurkat T-Zellen ergibt, dass Bcl10 Signal-induziert auch unter stringenten Zellyse-Bedingungen (1% SDS) ubiquitiniert wird. Dadurch wird die Möglichkeit einer indirekten Ubiquitinierung assoziierter Proteine ausgeschlossen. Längere Belichtungszeit ermöglicht auch die Detektion kurzkettiger Ubiquitinmodifikationen von Bcl10.

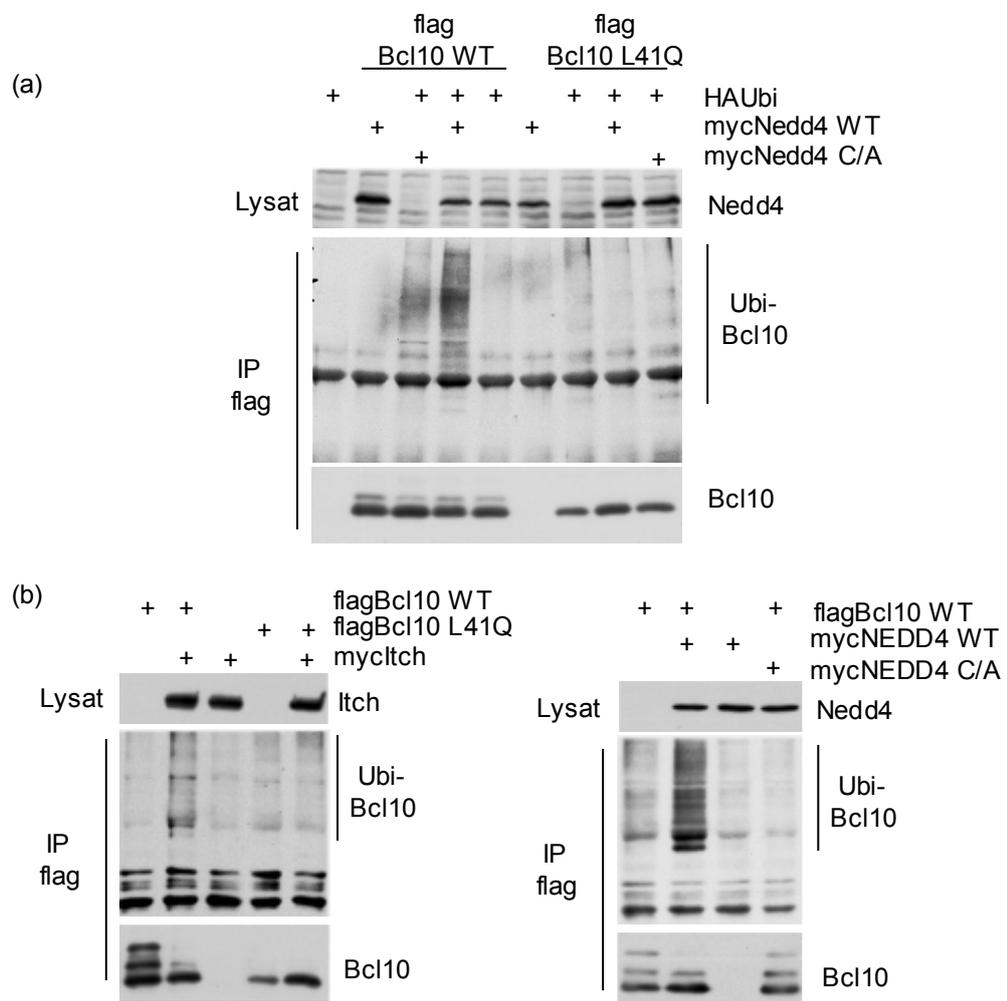
Die Verknüpfung zwischen Ubiquitin und einem Akzeptor-Lysin des Substrats wird von E3-Ubiquitin Ligasen katalysiert. Einige dieser Enzyme wie die HECT („Homology To The E6-Associated Protein Carboxyl Terminus“) E3-Ligasen Itch und Nedd4 („Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-regulated 4“) oder die RING („Really Interesting New Gene“) E3-Ligase Cbl-b („Casitas B-Lineage Lymphoma b“) sind durch biochemische Analysen oder genetische Inaktivierung in Mäusen mit der Regulation von T-Zell spezifischen Mechanismen in Verbindung gebracht worden [Liu, 2004]. Während Ubiquitin von HECT E3-Ligasen erst gebunden und dann auf das Substrat übertragen wird, unterstützen RING E3-Ligasen den direkten Ubiquitin-Transfer vom E2-Enzym auf das Zielprotein. Hierbei nehmen sowohl Ligasen des HECT-Typs als auch Ligasen des RING-Typs entscheidend Einfluss auf die Substratspezifität [Liu, 2004]. Um zu untersuchen, ob Itch, Nedd4 oder Cbl-b die Ubiquitinierung von Bcl10 vermitteln, wurden Kotransfektionsstudien in HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden Epitop-markiertes Bcl10, Ubiquitin und die unterschiedlichen Ligasen koexprimiert und deren Einfluss auf die Bcl10-Ubiquitinierung untersucht. Die Analyse von flagBcl10-Präzipitat zeigt, dass die HECT E3-Ligasen Itch und Nedd4 massiv verstärken (Abbildung 3.29 a). Im Gegensatz dazu ist die RING E3-Ligase Cbl-b nicht in der Lage, die Ubiquitinierung von Bcl10 zu induzieren (Abbildung 3.29 b).



**Abbildung 3.29 Bcl10-Ubiquitinierung durch Itch und Nedd4.** Koexpression von Itch oder Nedd4 mit Bcl10 in HEK293-Zellen induziert Bcl10-Ubiquitinierung (a), während Koexpression von Cbl-b keinen Effekt zeigt (b).

### 3.2.4 Charakterisierung der Bcl10-Ubiquitinierung

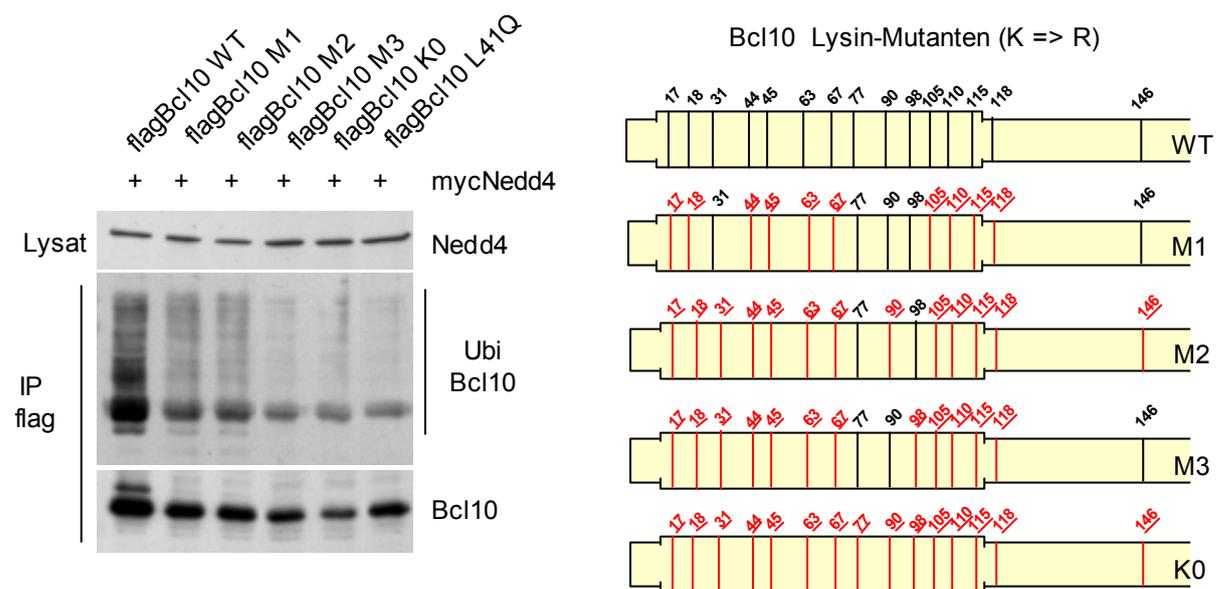
Zur Beurteilung der Spezifität der Bcl10-Ubiquitinierung durch HECT E3-Ligasen wurden die Grundlagen der Nedd4- und Itch-katalysierten Reaktion durch Koexpressionsstudien in HEK293-Zellen und in Jurkat T-Zellen genauer untersucht (Abbildung 3.30). Die Aktivität von Nedd4 kann durch Mutation eines Cysteins der enzymatisch aktiven Domäne zu Alanin (Nedd4 C/A) zerstört werden. Im Vergleich zu Nedd4 WT katalysiert Nedd4 C/A die Bcl10-Ubiquitinierung um ein Vielfaches schwächer. Zusätzlich ist die Nedd4-abhängige Bcl10-Ubiquitinierung unterbunden, wenn anstatt Bcl10 WT die Bcl10-Punktmutante L41Q koexprimiert wird. Diese Ergebnisse belegen, dass in HEK293-Zellen



**Abbildung 3.30 Charakterisierung der Bcl10-Ubiquitinierung durch Nedd4 und Itch.** Die Analyse von Koexpressionsstudien in (a) HEK293-Zellen und (b) Jurkat T-Zellen zeigt, dass für Bcl10-Ubiquitinierung durch Nedd4 und Itch die E3-Ligaseaktivität und eine funktionale CARD von Bcl10 benötigt werden.

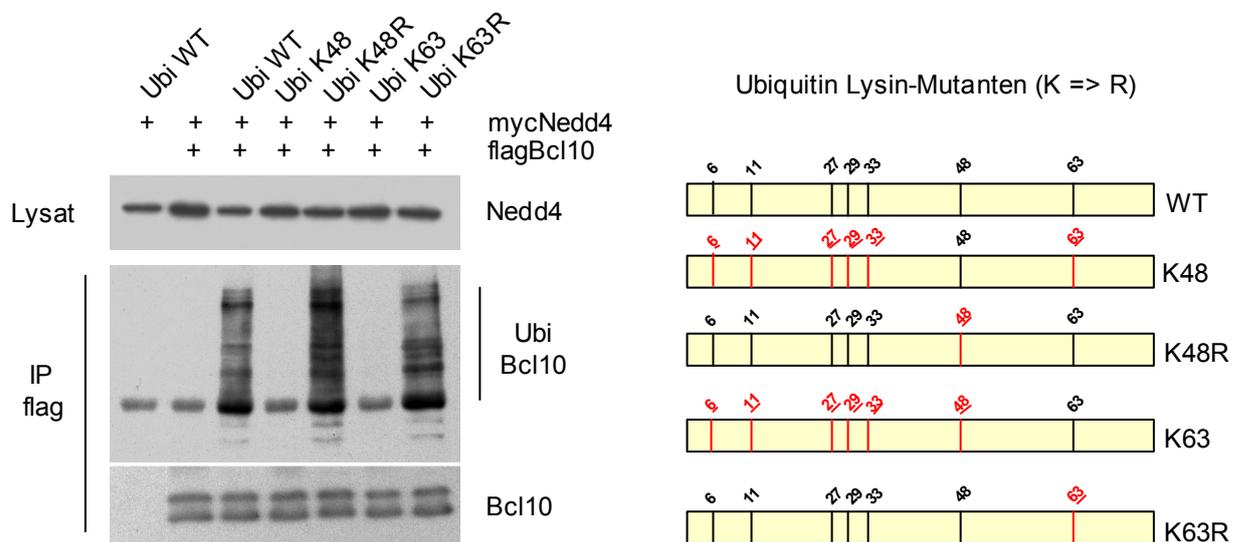
und in Jurkat T-Zellen für die Ubiquitinierung von Bcl10 durch die HECT E3-Ligasen Itch oder Nedd4 einerseits die katalytische Funktion der Enzyme und andererseits die Adapterfunktion der CARD von Bcl10 benötigt wird.

Die Proteinsequenz von Bcl10 beinhaltet fünfzehn potentielle Ubiquitin-Akzeptorlysine. Ein Großteil davon befindet sich innerhalb der N-terminalen CARD. Um die genaue Verknüpfungsstelle der Nedd4-abhängigen Bcl10-Ubiquitinierung zu ermitteln, wurde der Ubiquitinierungsstatus von verschiedenen Bcl10-Lysinmutanten durch Koexpressionsanalysen in HEK293-Zellen bestimmt (Abbildung 3.31). Interessanterweise ist es nicht möglich, durch Mutation einzelner Lysine zu Arginin die Ubiquitinierung von Bcl10 zu verhindern. Vielmehr entsteht der Eindruck, dass sukzessiver Austausch der Akzeptorlysine die Gesamtubiquitinierung stetig drückt. Da die Bcl10-Mutante K0, bei der alle Lysine durch Arginin ersetzt wurden, keine restliche Ubiquitinierung mehr zeigt, kann ein Lysin-unabhängiger Verknüpfungsmechanismus allerdings ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.31 Eingrenzung der Bcl10-Ubiquitinierungsstelle.** Koexpressionsanalysen von verschiedenen Bcl10-Lysinmutanten und Nedd4 in HEK293-Zellen deuten an, dass die Nedd4-abhängige Ubiquitinierung nicht an einem bestimmten Lysin von Bcl10 stattfindet, sondern der Bcl10 Ubiquitinierungsstatus von der Gesamtzahl verfügbarer Lysine abhängt. Die Lysinmutante Bcl10 K0 wird wie Bcl10 L41Q nicht mehr ubiquitiniert. Zur besseren Übersicht sind die unterschiedlichen Bcl10-Lysinmutanten schematisch, zu Arginin mutierte Lysine in rot (unterstrichen) dargestellt.

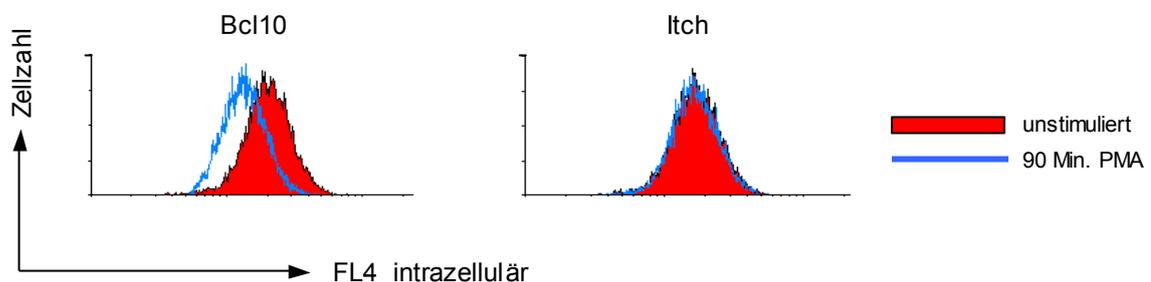
Die Verknüpfung der einzelnen Ubiquitinreste untereinander zu einer Polyubiquitinkette wiederum kann an unterschiedlichen Lysinen von Ubiquitin erfolgen. Da die Art der Verknüpfung Auskunft über das Schicksal des ubiquitinierten Substrats gibt, sollte durch Kotransfektionsstudien in HEK293-Zellen unter Verwendung von Ubiquitinmutanten herausgefunden werden, welche Art der Verknüpfung in der durch Nedd4 synthetisierten Polyubiquitinkette von Bcl10 vorliegt. Die am Besten charakterisierten Verknüpfungsarten erfolgen über die Lysine K48 oder K63. Daher wurden für die Analyse einerseits Ubiquitinmutanten verwendet, die an Position K48 oder K63 anstatt eines Lysins ein Arginin besitzen (K48R, K63R), andererseits wurden Mutanten eingesetzt, bei denen alle Lysine außer K48 oder K63 zu Arginin mutiert sind (K48, K63). Die Analyse von flagBcl10-Präzipitat nach Koexpression von Epitop-markiertem Bcl10 und Nedd4 mit Ubiquitin WT oder Mutanten zeigt, dass unter Verwendung von Ubiquitin K48 oder K63 die Bcl10 Polyubiquitinierung vollständig unterdrückt wird (Abbildung 3.32). Im Gegensatz dazu führt die Koexpression der Mutanten K48R und K63R zu ähnlich starker Polyubiquitinierung wie mit Ubiquitin WT. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Verknüpfungsart der Nedd4-abhängigen Bcl10-Ubiquitinierung weder K48 oder K63 basiert ist. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass Nedd4 die Bildung von Polyubiquitinketten katalysiert, die über eines der anderen Lysine in Ubiquitin, z.B. K29, verknüpft sind.



**Abbildung 3.32 Polyubiquitinverknüpfung bei Nedd4-abhängiger Bcl10-Ubiquitinierung.** Die Koexpressionsanalyse von Bcl10 und Nedd4 mit unterschiedlichen Ubiquitinmutanten in HEK293-Zellen deutet an, dass Nedd4 weder die Bildung von K48- noch von K63-polyubiquitiniertem Bcl10 katalysiert. Zur besseren Übersicht sind die unterschiedlichen Bcl10-Lysinmutanten schematisch dargestellt und zu Arginin mutierte Lysine rot (unterstrichen) markiert.

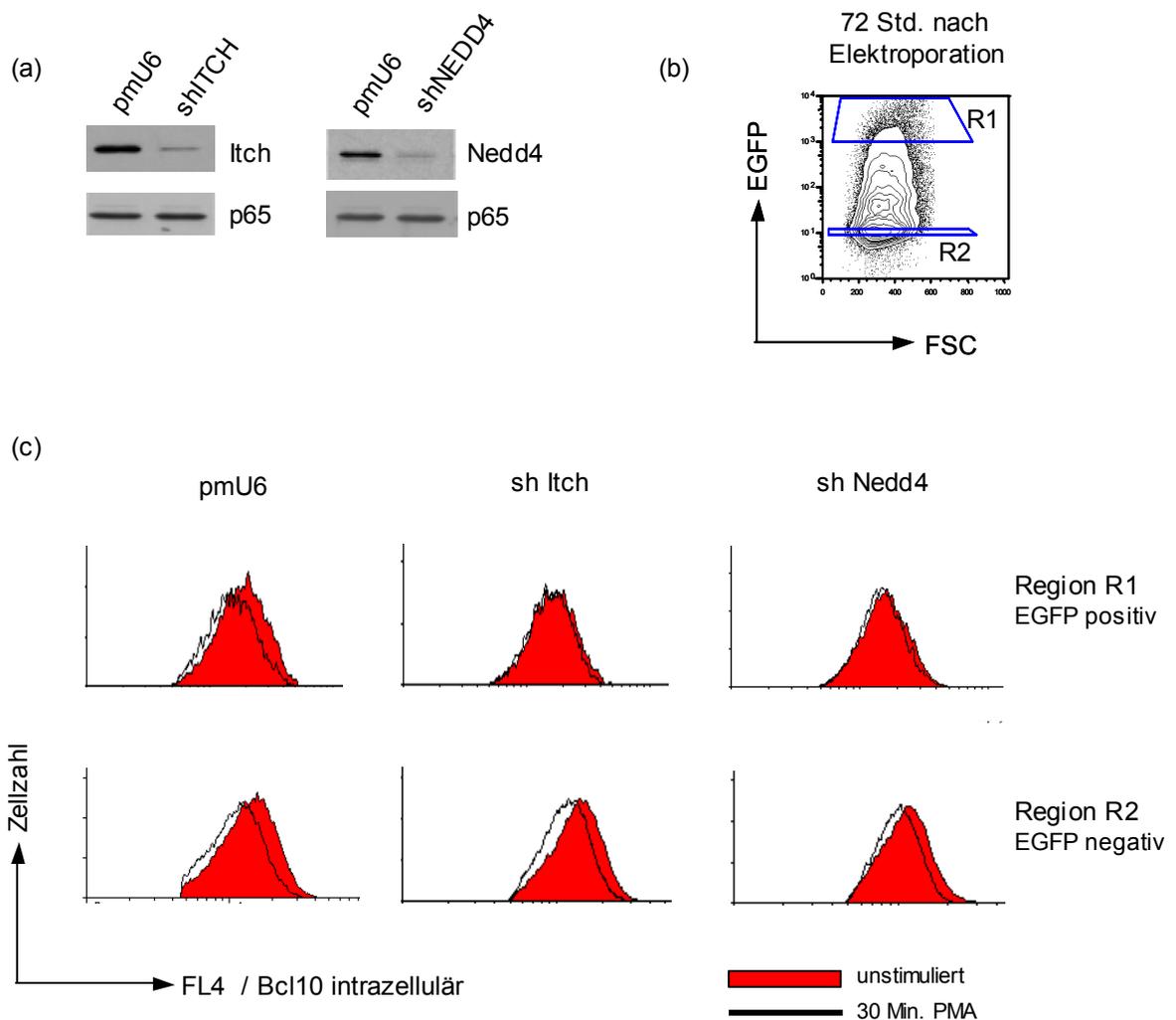
### 3.2.5 Inaktivierung von Nedd4 und Itch durch RNAi stabilisiert Bcl10

Zur Beurteilung der physiologischen Bedeutung der HECT E3-Ligasen Itch und Nedd4 beim Prozess Stimulus-induzierter Degradation von Bcl10 wurden RNAi-Experimente in Jurkat T-Zellen durchgeführt. Dabei wurde der Effekt shRNA-vermittelter Inaktivierung von Itch und Nedd4 auf die Stabilisierung des Bcl10-Proteinlevels PMA/Iono-aktivierter Zellen durch FACS-basierte Analyse untersucht. Grundlage hierfür war die Visualisierung der Stimulus-induzierten Degradation von Bcl10 durch einen Bcl10-spezifischen Fluorophor-gekoppelten Antikörper. Die FACS-Analyse ruhender und PMA-aktivierter Jurkat T-Zellen ergibt, dass sich bei histogrammischer Auftragung die Bcl10-spezifische Gesamtfluoreszenz Stimulus-induziert zu niedrigeren Werten verschiebt (Abbildung 3.33). Dies entspricht einer Fluoreszenz-Abschwächung, die durch die Degradation von Bcl10 hervorgerufen wird. Als Kontrolle wurde parallel die intrazelluläre Färbung von Itch analysiert. Erwartungsgemäß findet hier keine Fluoreszenz-Verschiebung statt, da für Itch keine Stimulus-induzierte Degradation beobachtet wurde.



**Abbildung 3.33 FACS Analyse des PMA-induzierten Bcl10-Proteinabbaus.** Intrazelluläre Färbung von Bcl10 und Itch in Jurkat T-Zellen: PMA-Stimulation ruft bei Bcl10 eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität zu niedrigeren Werten hervor, die den Proteinabbau von Bcl10 anzeigt. Im Gegensatz dazu verschiebt sich die Fluoreszenz-Intensität für Itch nicht.

Um die Inaktivierungseffizienz abzuschätzen, wurden Itch- und Nedd4-Proteinlevel shRNA-behandelter Zellen mit pmU6-Kontrollzellen verglichen. In beiden Fällen wurde restliches Protein detektiert. Dies kann durch die Anwesenheit toter Zellen nach der Elektroporation oder eine nicht optimale Transfektionsrate erklärt werden (Abbildung 3.34 a). Der wesentliche Vorteil der FACS-basierten Untersuchung liegt darin, dass durch selektive



**Abbildung 3.34 Inaktivierung von Itch und Nedd4 stabilisiert Bcl10 nach T-Zell Aktivierung.** Jurkat T-Zellen wurden mit shRNA-kodierenden Vektoren gegen Itch und Nedd4 transfiziert und die Effekte auf PMA-induzierten Bcl10-Proteinabbau analysiert. (a) Überprüfung der Inaktivierung von Itch und Nedd4 durch shRNA-Transfektion. (b) Einteilung der Hauptpopulation 72 Std. nach Elektroporation: durch Kotransfektion eines EGFP-kodierenden Vektors wurden maximal transfizierte Zellen (Region R1) anhand der Intensität grüner Fluoreszenz identifiziert und von schwach transfizierten Zellen (Region R2) unterschieden. (c) Separate Populationsanalyse Bcl10-gefärbter Zellen aus Region R1 und Region R2: in stark EGFP-positiven Zellen ist die PMA-induzierte Fluoreszenzverschiebung im Vergleich zu pmU6 Leervektor-transfizierten Zellen durch shItch- oder shNedd4-Expression deutlich abgeschwächt. Dies entspricht einer Stabilisierung von Bcl10 nach T-Zell Aktivierung. In schwach EGFP-positiven Zellen dagegen hat die Kotransfektion von shRNAs keinen stabilisierenden Effekt.

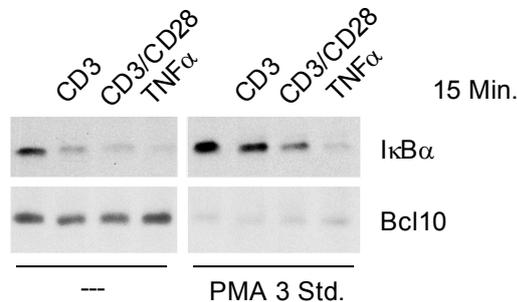
Populationsanalyse tote und ineffizient transfizierte Zellen ausgeschlossen werden können. Daher wurde zur Bestimmung der Transfektionsrate der Zellen ein EGFP-kodierender Vektor neben den shRNA-kodierenden Vektoren kotransfiziert. Auf diese Weise war es möglich, den

Stimulus-induzierten Proteinabbau von Bcl10 in stark transfizierten Zellen (Region R1) im Vergleich mit gering oder nicht transfizierten Zellen (Region R2) zu beurteilen (Abbildung 3.34 b). Während EGFP-positive und EGFP-negative pmU6-Leervektor transfizierte Referenzzellen eine ähnliche Abnahme der Bcl10-Proteinmenge nach PMA-Stimulation aufweisen, ist in shItch- und shNedd4-exprimierenden Zellen der stark EGFP-positiven Population eine deutliche Stabilisierung von Bcl10 zu beobachten (Abbildung 3.34 c). Im Gegensatz dazu findet keine Stabilisierung von Bcl10 in der schwach EGFP-exprimierenden Population nach T-Zell Aktivierung statt. Die stabilisierende Wirkung der shRNAs gegen Itch und Nedd4 ist somit auf Zellen mit einer hohen Transfektionsrate beschränkt. Dieses Ergebnis belegt die physiologische Bedeutung von Itch und Nedd4 beim Stimulus-abhängigen Proteinabbau von Bcl10, da durch effektive RNAi-vermittelte Inaktivierung der Ligasen die PMA-induzierbare Degradation von Bcl10 in Jurkat T-Zellen inhibiert wird.

### **3.2.6 Die Degradation von Bcl10 dient der Deaktivierung TCR-vermittelter NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion**

Bcl10-defiziente Mäuse zeigen massive Defekte bei der TCR-vermittelten IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung [Ruland et al, 2001]. Es bestand daher die Möglichkeit, dass die Degradation von Bcl10 einen inhibitorischen Einfluss auf die Antigenrezeptor-induzierte NF- $\kappa$ B-Signalübertragung in aktivierten T-Zellen hat. Um mögliche Zusammenhänge zu untersuchen wurden Jurkat T-Zellen mit PMA vorbehandelt, was zu einer nahezu vollständigen Degradation von Bcl10 führt (Abbildung 3.35). Nach anschließender Restimulation durch CD3- oder CD3/CD28-Antikörper wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung anhand der Stimulus-abhängigen I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation analysiert. Es zeigt sich, dass die durch Restimulation induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in PMA-vorbehandelten Zellen im Vergleich zu Referenz-Zellen deutlich verzögert ist. Dies deutet eine Inhibierung Antigenrezeptor-spezifischer Signalübertragung durch den Verlust von Bcl10 an. Da TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht beeinflusst wird, kann eine allgemeine Desensibilisierung der Zellen nach PMA-Vorbehandlung ausgeschlossen werden. Detaillierte Analysen der Antigenrezeptor-abhängigen Signalwege ergaben, dass auch die kostimulativ-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen in PMA-vorbehandelten Jurkat T-Zellen nicht beeinträchtigt ist. Dadurch wurden mögliche Antigenrezeptor-proximale Effekte, die zur Bcl10-unabhängigen Desensibilisierung der Zellen führen könnten, ebenfalls ausgeschlossen [Scharschmidt et al, 2004]. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus T-Zellen Bcl10-defizienter Mäuse kann daher der

Schluss gezogen werden, dass Bcl10-Degradation zur selektiven Deaktivierung des Antigenrezeptor-abhängigen NF- $\kappa$ B Signalweges führt.

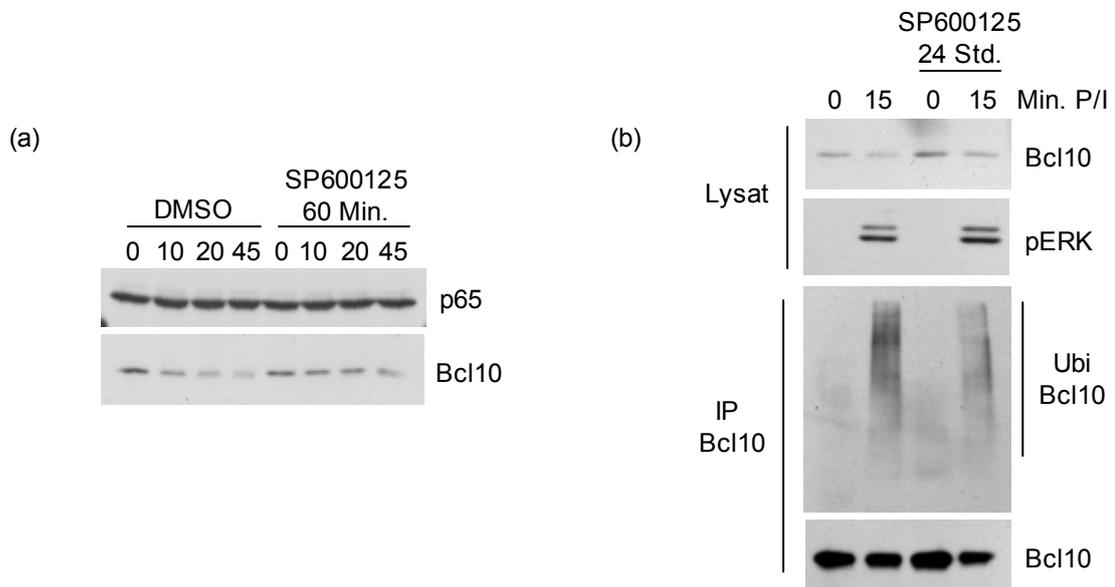


**Abbildung 3.35 Bcl10-Degradation führt zur Beendigung der Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung.** Der Bcl10-Proteinlevel in PMA-vorbehandelten Jurkat T-Zellen ist stark reduziert. Restimulation durch CD3- oder CD3/CD28-Antikörper deckt stark verzögerte I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation im Vergleich zu Referenzzellen auf, was für eine Inhibierung des Antigenrezeptor-vermittelten NF- $\kappa$ B Signalweges steht. Im Gegensatz dazu ist TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch PMA-Vorbehandlung nicht beeinflusst.

### 3.2.7 Jnk induziert Bcl10-Degradation

Die MAP-Kinase Jnk wurde bis jetzt vor allem mit der Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1 in Verbindung gebracht, allerdings ist die genaue Funktion dieses Enzyms in Lymphozyten noch nicht geklärt. Unlängst konnte gezeigt werden, dass Itch in T-Zellen durch Jnk-abhängige Phosphorylierung aktiviert wird und daraufhin die Ubiquitinierung und Degradation der AP-1-Untereinheiten c-Jun und JunB vermittelt [Altman et al, 2000; Gao et al, 2004]. Um zu untersuchen, ob Jnk eventuell über Itch auch in die Regulation der Signal-abhängigen Bcl10-Degradation involviert ist, wurde der Effekt des spezifischen Jnk-Inhibitors SP600125 in PMA/Iono-aktivierten Jurkat T-Zellen analysiert. Die Behandlung der Zellen mit SP600125 führt zu einer deutlichen Stabilisierung von Bcl10 nach T-Zell Aktivierung im Vergleich zu Referenzzellen, die mit equivalenten Mengen an Lösungsmittel inkubiert wurden (Abbildung 3.36 a). Auch die Analyse von Bcl10-Präzipitat im Hinblick auf das Maß an PMA/Iono-induzierter Bcl10-Ubiquitinierung ergibt eine Reduktion des Bcl10-Ubiquitinsignals in SP600125 behandelten Zellen (Abbildung 3.36 b). Diese Ergebnisse deuten an, dass Jnk-vermittelte Prozesse die Ubiquitinierung von Bcl10 beeinflussen. Unter Berücksichtigung der Daten in Bezug auf Itch- und Nedd4-vermittelte Degradation von Bcl10

besteht Anlass zur Annahme, dass Jnk über die Regulation von Itch oder möglicherweise weiterer Ubiquitin-Ligasen die Stabilität von Bcl10 steuert.



**Abbildung 3.36 Jnk-Inhibition stabilisiert Bcl10.** (a) Inkubation von Jurkat T-Zellen mit dem spezifischen Jnk-Inhibitor SP600125 vor Aktivierung durch PMA/Iono verzögert die Degradation von Bcl10 und (b) verringert das Maß an Bcl10-Ubiquitinierung.

## 4 Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit standen T-Zell spezifische Prozesse, die im Zusammenhang mit den Regulatorproteinen Carma1, Bcl10 und Malt1 die transiente Natur der Antigenrezeptor-vermittelten IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung begründen. Als Grundlage weiterführender Analysen sollte die Bildung des Carma1/Bcl10/Malt1 (CBM)-Proteinkomplexes unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Die präsentierten Daten belegen, dass Bcl10 und Malt1, die bereits in unstimuliertem Zustand aneinander binden, erst nach T-Zellaktivierung mit Carma1 interagieren. Die Bildung des CBM-Komplexes erfolgt demnach in Abhängigkeit von T-Zell aktivierenden Stimuli. Basierend auf diesen Daten wurde gezeigt, dass CBM-Komplexbildung und simultan auftretende Bcl10-Phosphorylierung von IKK $\beta$ , einer der regulatorischen Untereinheiten des IKK-Komplexes, abhängig ist. IKK $\beta$  phosphoryliert Bcl10 im C-Terminus, was eine interne Umlagerung der CBM-Komplexkomponenten bewirkt und zur Dämpfung primärer CBM-Komplexaktivität beiträgt. Bei anhaltender Stimulierung der Zellen treten Prozesse in Erscheinung, die verstärkt zur transienten Natur der Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beitragen. Zusätzlich zur Phosphorylierung tritt auch Stimulus-abhängige Bcl10-Ubiquitinierung durch die HECT E3-Ubiquitin-Ligasen Itch und Nedd4 auf. Die Ubiquitinierung dient als Signal für die lysosomale Degradation von Bcl10, wodurch eine wichtige Signalkomponente des CBM-Komplexes der Signalkette funktionell entzogen und eine konstitutive Signalweiterleitung verhindert wird.

### 4.1 IKK $\beta$ Funktion bei der CBM-Komplexbildung

Die am Besten charakterisierte Funktion des IKK-Komplexes liegt in der Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$ , welches nach anschließender Ubiquitinierung und Degradation transkriptionsaktive NF- $\kappa$ B-Dimere freigibt. Dabei fungiert der IKK-Komplex als zentrale Schaltstelle diverser Rezeptor-initiiierter Transduktionskaskaden, die durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden und eintreffende Signale in den Zellkern weiterleiten.

Bisher wurde angenommen, dass in T-Zellen Antigenrezeptor-vermittelte Signale in hierarchischer Weise über den CBM-Komplex an den IKK-Komplex weitergeleitet werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten modifizieren das gängige Modell. Die Ergebnisse der RNAi-Analysen zeigen, dass IKK $\beta$  bereits für die Bildung des CBM-Komplexes benötigt

wird. Da unter Verwendung pharmakologischer IKK $\beta$ -Inhibitoren die CBM-Komplexbildung ebenfalls unterbunden wurde, übt IKK $\beta$  nicht nur eine sterische Funktion bei der Komplexbildung aus, es wird auch die enzymatische Aktivität der Kinase benötigt (s. 3.1.2 und 3.1.3).

Interessanterweise bindet IKK $\beta$  konstitutiv an die CBM-Komplexkomponente Malt1 (s. 3.1.2). Malt1 kann daher eine wichtige vernetzende Eigenschaft als Interaktionsschnittstelle zwischen CBM- und IKK-Komplex zugeschrieben werden. Möglicherweise wird die Interaktion beider Komplexe über Malt1 durch Rekrutierung von Casp8 stabilisiert, da gezeigt wurde, dass Casp8 Stimulus-induziert sowohl an den CBM- als auch an den IKK-Komplex bindet [Su et al, 2005]. In einer unabhängigen Studie wird der Kinase PDK1, die simultan den CBM-Komplex, den IKK-Komplex und PKC $\theta$  in definierte Mikrodomänen der immunologischen Synapse rekrutiert, eine integrative Funktion bei der Antigenrezeptor-vermittelten Signalweiterleitung zugeschrieben [Lee et al, 2005]. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der in dieser Arbeit präsentierten Daten zeichnet sich ein nicht-hierarchisches Modell der Antigenrezeptor-vermittelten Signalweiterleitung ab. Die Gesamtheit der Analysen deutet an, dass nach T-Zell Aktivierung ein Multikomponentenkomplex an der Membran gebildet wird, der für die Weiterleitung NF- $\kappa$ B-spezifischer Signale zuständig ist. Durch funktionelle oder sterische Inaktivierung einer beteiligten Komponente kommt es zu Defekten bei der Bildung des Multikomponentenkomplexes und dadurch zu Defekten bei der Signalweiterleitung.

Die unerwartete Funktion von IKK $\beta$  bei der Bildung des CBM-Komplexes lässt sich am Besten durch Inaktivierungs-bedingte sterische Defekte eines Multikomponentenkomplexes erklären. Über die katalytische Funktion von IKK $\beta$  bei der Bildung dieses Komplexes kann zum derzeitigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Möglicherweise findet eine initiale, schwache IKK $\beta$ -Aktivierung durch direkte Phosphorylierung einer vorgelagerten, noch unbekanntes Kinase statt. Für nachhaltige Signaltransduktion im weiteren Verlauf ist dann die Bildung des Multikomponentenkomplexes Voraussetzung, wobei Signale vom transient aktivierten IKK-Komplex für die Bildung des Multikomponentenkomplexes benötigt werden. Unlängst wurde gezeigt, dass Carma1 nach T-Zell Aktivierung innerhalb einer „Linker“-Region zwischen CC- und PDZ-Domäne phosphoryliert wird [Matsumoto et al, 2005; Sommer et al, 2005]. Weiter wurde postuliert, dass diese Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung von Carma1 führt, die die CARD-CARD Interaktion mit Bcl10 erst ermöglicht. Bei einigen dieser Carma1-Phosphoakzeptorstellen handelt es sich um

Konsensus-Phosphorylierungssequenzen von PKC, die *in vitro* von PKC $\theta$  phosphoryliert werden. Interessanterweise wurde durch Mutation des Serins 565 zwar die Antigenrezeptor-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung beeinträchtigt, allerdings konnte PKC $\theta$  in diesem Fall nicht als Kinase identifiziert werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass weitere Kinasen wie IKK $\beta$ , die Teil des sich bildenden Multikomponentenkomplexes sind, in die Regulation der phosphorylierungsbasierten Aktivierung von Carma1 eingreifen und dadurch das primär PKC $\theta$ -abhängige Signal substantiell verstärken [Rueda und Thome, 2005].

Unter physiologischen Bedingungen wird ein Kostimulationssignal für produktive T-Zell Aktivierung benötigt. Allerdings ist nach wie vor nicht vollständig geklärt, welchen Beitrag das Kostimulationssignal hierbei auf molekularer Ebene leistet [Acuto et al, 2003]. Es könnte daher sein, dass eine schwache transiente IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TCR Signale ausgelöst wird, die erst in Kombination mit CD28-abhängigen kostimulativen Signalen zur Bildung des CBM/IKK-enthaltenden Multikomponentenkomplexes führt und nachhaltige Signaltransduktion ermöglicht. Diese Theorie wird von der Beobachtung gestützt, dass Antigenrezeptor-vermittelte Signaltransduktion bereits ohne vollständigen Aufbau des Proteinnetzwerks der immunologischen Synapse möglich ist, für nachhaltige Aktivierung jedoch benötigt wird [Lee et al, 2002; Horejsi, 2005].

## **4.2 Der Zusammenhang zwischen CBM-Komplexbildung und Phosphorylierung von Bcl10**

Zeitgleich mit der TCR/CD28-induzierten CBM-Komplexbildung tritt die Phosphorylierung der Komplexkomponente Bcl10 auf (s 3.1.1). In bisherigen Studien konnte zwar eine Phosphorylierung von Bcl10 nach Antigenrezeptor-Aktivierung nachgewiesen werden, sowohl die zugrunde liegenden Mechanismen als auch die physiologische Funktion dieser Modifikation blieben aber unklar. Es wurde vorgeschlagen, dass RIP2 („Receptor Interacting Protein 2“), eine Serin/Threonin Kinase, die über eine N-terminale CARD an Bcl10 bindet, für Bcl10-Phosphorylierung verantwortlich sein könnte [Ruefli-Brasse et al, 2004]. Die stark eingeschränkte Proliferation, IL-2 Produktion und Bcl10-Phosphorylierung in T-Zellen RIP2-defizienter Mäuse unterstützen zwar diese Annahme, der Nachweis direkter Bcl10-Phosphorylierung durch RIP2 konnte jedoch nicht erbracht werden [Chin et al, 2002; Kobayashi et al, 2002].

Die hier präsentierten Daten legen nahe, dass die Bildung des CBM-Komplexes und die Phosphorylierung von Bcl10 in direktem Zusammenhang stehen. RNAi-vermittelte Inaktivierung von Carma1 und Malt1 führt in beiden Fällen zur Unterdrückung der Antigenrezeptor-induzierten Bcl10 Phosphorylierung. Interessanterweise tritt auch nach Inaktivierung von IKK $\beta$  sowohl durch pharmakologische Inhibitoren als auch durch RNAi neben Defekten bei der CBM-Komplex Bildung keine Phosphorylierung von Bcl10 mehr auf (s. 3.1.2 und 3.1.3). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass entweder als Folge shIKK $\beta$ -vermittelter Unterdrückung der CBM-Komplexbildung keine Phosphorylierung von Bcl10 mehr stattfindet oder dass die Kinaseaktivität von IKK $\beta$  für die Phosphorylierung von Bcl10 direkt benötigt wird. Es galt daher zu klären, ob die Phosphorylierung von Bcl10 als Signal für die Bildung des CBM-Komplexes fungiert oder ob Bcl10-Phosphorylierung eine Folge der CBM-Komplexbildung ist, vor allem aber inwieweit IKK $\beta$  an der Phosphorylierung beteiligt ist.

### **4.3 IKK $\beta$ -Funktion bei der Phosphorylierung von Bcl10**

Um die Rolle von IKK $\beta$  bei der Phosphorylierung von Bcl10 zu beurteilen, wurden Kinasereaktionen mit gereinigtem GSTBcl10 als Substrat durchgeführt (s. 3.1.4). Diese zeigen, dass GSTBcl10 zwar nur sehr schlecht von rekombinantem IKK $\beta$ , aber effizient durch IKK $\beta$ - und IKK $\gamma$ -Präzipitat aus aktivierten Jurkat T-Zellen phosphoryliert wird. Im Vergleich dazu wird I $\kappa$ B $\alpha$  sowohl durch rekombinantes IKK $\beta$  als auch durch IKK-Präzipitat aus aktivierten Jurkat T-Zellen effizient phosphoryliert. Diese Ergebnisse deuten an, dass für die Phosphorylierung von Bcl10 durch IKK $\beta$  die Anwesenheit eines Kofaktors erforderlich ist, der durch IKK-Immunopräzipitation kopräzipitiert, bei der Reinigung des rekombinanten Proteins allerdings abgetrennt wird. Dabei könnte es sich um einen sterisch stabilisierendes Protein ohne eigene enzymatische Aktivität oder aber auch um eine IKK $\beta$ -abhängig regulierte, noch unbekannt Kinase handeln. Weiterführende Analysen allerdings stützen die Annahme, dass Bcl10 ein direktes IKK $\beta$ -Substrat ist, da ein der Kinasereaktion zugesetzter pharmakologisch wirksamer IKK $\beta$ -Inhibitor die Phosphorylierung von Bcl10 verhindert (A. Oeckinghaus, unveröffentlichte Daten).

Die Stimulus-abhängige Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und Bcl10 zeigt unterschiedliche *in vivo* Kinetiken. Während I $\kappa$ B $\alpha$  bereits nach fünf Minuten T-Zell Stimulation fast vollständig degradiert ist, wofür eine noch schnellere Phosphorylierung des Proteins Voraussetzung ist,

steigt die Phosphorylierung von Bcl10 innerhalb von 30 Minuten stetig an. Der Grund für die Verzögerung könnte eine geringere Affinität zum Substrat sein, die sich auch in den durchgeführten Kinasereaktionen widerspiegelt. Während GSTI $\kappa$ B $\alpha$  *in vitro* bereits von IKK-Präzipitat aus nicht aktivierten Jurkat T-Zellen phosphoryliert wird, tritt eine Phosphorylierung von Bcl10 erst nach Stimulation auf und ist unter Einsatz äquivalenter Mengen an Substrat vergleichsweise schwächer.

#### 4.4 IKK $\beta$ phosphoryliert Bcl10 im C-Terminus

Die Analyse der Bcl10-Proteinsequenz ergab keine offensichtliche Sequenzhomologie zu den Phosphoakzeptorbereichen bekannter IKK $\beta$ -Substrate wie den kleinen zytosolischen I $\kappa$ Bs oder p105. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Phosphorylierungsstellen aller bisher bekannten IKK $\beta$ -Substrate auch als Erkennungssequenzen für den  $\beta$ -TrCP-enthaltenden SCF-Ubiquitin-Ligasekomplex dienen. Da Proteine mit Sequenzhomologie zur I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierungsstelle existieren, die nicht von IKK $\beta$  erkannt werden, z.B.  $\beta$ -Catenin oder Vpu, scheint die Aminosäuresequenz der Phosphorylierungsstelle eher durch die Wechselwirkung mit  $\beta$ -TrCP als mit IKK $\beta$  bestimmt zu sein. Umgekehrt besteht also durchaus die Möglichkeit, dass IKK $\beta$ -Substrate existieren, die zwar phosphoryliert, aber nicht von  $\beta$ -TrCP erkannt werden und daher auch keine direkte Sequenzhomologie zu den erwähnten Substraten aufweisen (Abbildung 4.1).

Bcl10 wird nicht nur durch IKK-Präzipitat aktivierter Jurkat T-Zellen, sondern auch nach Kotransfektion von Bcl10 und IKK $\beta$  in HEK293-Zellen effizient phosphoryliert. Dies spricht dafür, dass ein eventuell benötigter Kofaktor in HEK293-Zellen vorhanden ist oder in seiner Funktion durch verstärkte Expression von IKK $\beta$  ersetzt werden kann. Daher wurden Koexpressionsstudien zur exakten Bestimmung der IKK $\beta$ -abhängigen Phosphoakzeptorstelle von Bcl10 in HEK293-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass mehrere Serine im C-terminalen Bereich von Bcl10 phosphoryliert werden (s. 3.1.4). Erst die Mutation der Serine 134, 136, 138, 141 und 144 zu Alanin unterbindet die Phosphorylierung von Bcl10 (Bcl10 5xA). Die Tatsache, dass mehrere IKK $\beta$ -abhängig modifizierbare Phosphoakzeptorserine existieren, spiegelt auch das Migrationsverhalten von phosphoryliertem Bcl10 wieder. Nach IKK $\beta$ -Koexpression und T-Zell Aktivierung treten mehrere langsamer migrierende, Phosphatase-sensitive Bcl10-Banden auf, die die Anwesenheit multipler Phosphorylierungsstellen andeuten. Allerdings war es nicht möglich,

bestimmten Serinen der relevanten Region einzelne Phospho-Banden zuzuordnen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierung einzelner Serine der IKK $\beta$ -abhängigen Phosphoakzeptorstelle als Signal für weitere Phosphorylierung an anderen Akzeptorstellen, die nicht im Bereich zwischen Serin 134 und Serin 144 von Bcl10 liegen, dient.

Substrat	Phosphorylierungsstelle										Kinase							
I $\kappa$ B $\alpha$	D	R	H	D	S	G	L	D	S	M	K	K	IKK $\beta$					
I $\kappa$ B $\beta$	E	W	C	D	S	G	L	G	S	L	G	P						
I $\kappa$ B $\gamma$	S	Q	Y	D	S	G	I	E	S	L	R	S						
p105	R	D	S	D	S	V	C	D	S	G	V	E						
Foxo3a	L	T	S	D	S	L	S	H	S	D	V	M						
$\beta$ -Catenin	S	Y	L	D	S	G	I	H	S	G	A	T	GSK3 $\beta$					
Vpu	D	A	E	D	S	G	N	E	S	D	G	D	CKII					
Konsensus				D	S	$\Psi$	X	X	S									
Bcl10	N	N	L	S	R	S	N	S	D	E	S	N	F	S	E	K	L	IKK $\beta$

**Abbildung 4.1 Sequenzvergleich der Phosphoakzeptorstellen unterschiedlicher IKK $\beta$ -Substrate.** Die Phosphoakzeptorstellen der IKK $\beta$ -Substrate I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ , p105 und Foxo3a zeigen Sequenzhomologie zur Phosphoakzeptorstelle von  $\beta$ -Catenin und Vpu, die keine IKK $\beta$ -Substrate sind, da der relevante Bereich auch als Erkennungssequenz für  $\beta$ -TrCP dient (Konsensus-Sequenz:  $\Psi$  = hydrophober Rest, X = beliebiger Rest). Die Phosphoakzeptorstelle von Bcl10 zeigt keine Homologie zur einem der anderen Proteine.

#### 4.5 Umbau und negative Regulation des CBM-Komplexes durch Bcl10-Phosphorylierung

Durch die in dieser Arbeit präsentierten Analysen wird Bcl10 als ein potentielles Substrat von IKK $\beta$  identifiziert. Zur Beurteilung der physiologischen Relevanz dieses Prozesses wurden mehrere Beobachtungen herangezogen, die eine duale Funktion von IKK $\beta$  in Bezug auf die Wechselwirkung mit dem CBM-Komplex andeuten. Einerseits spielt IKK $\beta$ , wie bereits diskutiert, eine essentielle Rolle bei der Bildung des CBM-Komplexes, andererseits sprechen folgende Punkte für eine negativ-regulatorische Wirkung IKK $\beta$ -vermittelter Bcl10-Phosphorylierung auf die Aktivität des CBM-Komplexes.

1. Da Bcl10 nach RNAi-vermittelter Inaktivierung von Carma1 nicht mehr Stimulus-induziert phosphoryliert wird, übernimmt die Phosphorylierung von Bcl10 offensichtlich keine aktivierende Funktion bei der CBM-Komplexbildung (s. 3.1.3). Wäre die

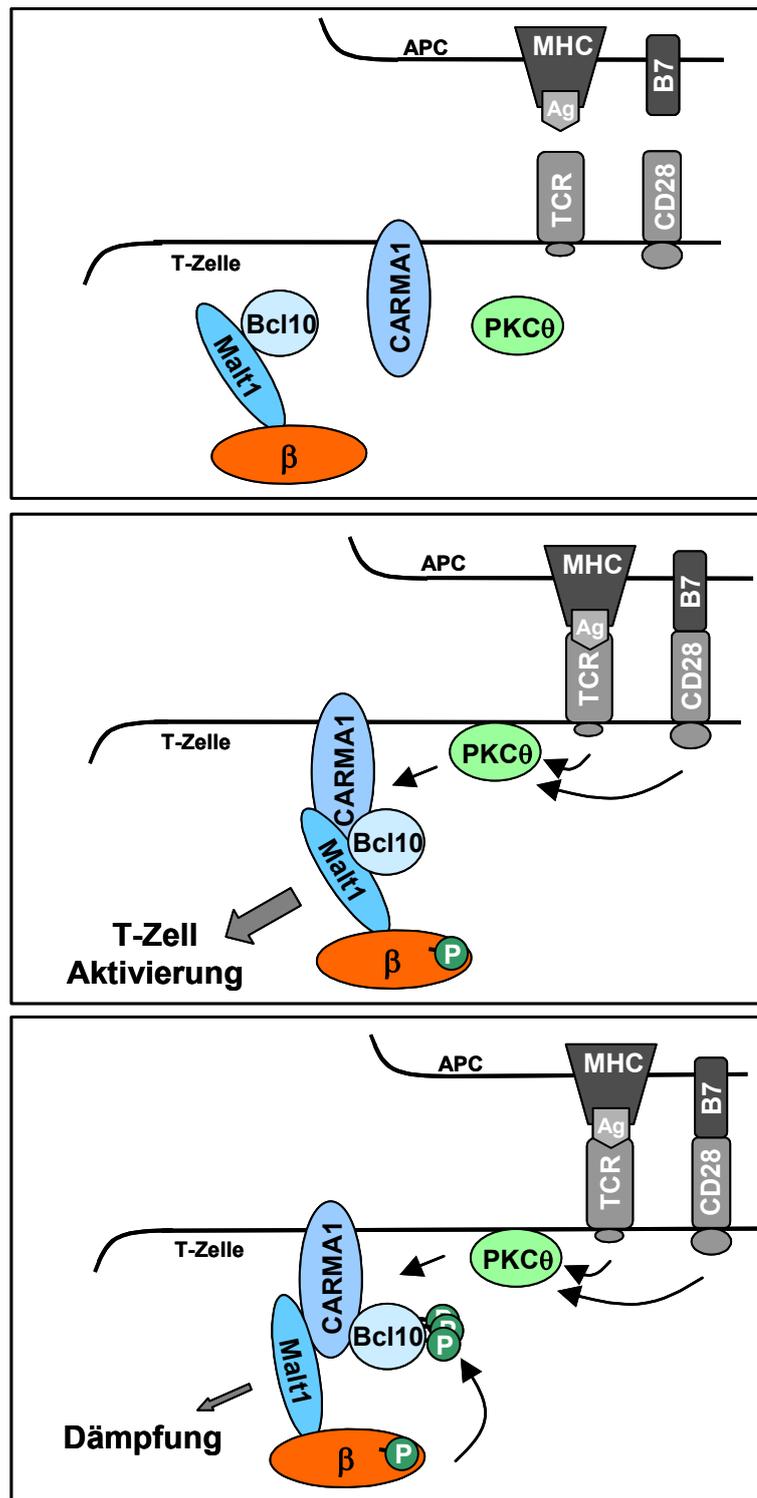
Phosphorylierung das Signal für die Bildung des Komplexes, so müsste Bcl10 auch in Abwesenheit von Carma1 phosphoryliert werden, es sei denn, Carma1 rekrutiert die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase. Die Daten sprechen aber eher dafür, dass Malt1 diese Brückenfunktion übernimmt, da IKK $\beta$  konstitutiv an Malt1 bindet. Eine derartige vernetzende Rolle von Malt1 wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Malt1-Inaktivierung sowohl die Stimulus-induzierte Carma1-Bcl10-Interaktion als auch die Bcl10-Phosphorylierung unterbindet.

2. Die Bcl10-CARD allein reicht für die Vermittlung der Stimulus-abhängigen Carma1-Bcl10 Interaktion aus (s. 3.1.5). Daher wird der C-terminale Teil des Proteins, der die potentiell relevante Phosphorylierungsstelle enthält, für primäre CBM-Komplexbildung nicht benötigt.

3. Bcl10 WT und die phospho-defiziente Bcl10-Mutante 5xA besitzen die gleiche Effizienz zur primären Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wie durch Analyse rekonstituierter Jurkat T-Zellen nach RNAi-vermittelter Inaktivierung von endogenem Bcl10 gezeigt wurde (s. 3.1.5).

4. Koexpressionsstudien in HEK293-Zellen ergeben, dass IKK $\beta$ -vermittelte Bcl10-Phosphorylierung die Bindungsaffinitäten der CBM-Komplexkomponenten beeinflusst (s. 3.1.6). Im Gegensatz zur Bcl10-Carma1-Bindung, die durch Bcl10-Phosphorylierung eher verstärkt wird, führt die Phosphorylierung von Bcl10 zur Schwächung der Bcl10-Malt1-Interaktion. Interessanterweise wurde Malt1 als eine essentielle Komponente bei der Aktivierung des IKK-Komplexes beschrieben [Sun et al, 2004; Zhou et al, 2004]. Eine substantielle Schwächung der Bcl10-Malt1-Bindung zugunsten der Bcl10-Carma1-Bindung könnte daher zu einer Ummodellierung des Komplexes führen, die eine effektive Signalweiterleitung nicht weiter unterstützt. Bcl10-abhängige Oligomerisierung von Malt1 gilt als Voraussetzung für die Aktivierung der Traf6 E3-Ubiquitin Ligase, die wiederum zur Aktivierung des IKK-Komplexes benötigt wird [Sun et al, 2004]. Im Gegensatz dazu wird in einer anderen Studie der CLD von Malt1 eigenständige Ubiquitin-Ligaseaktivität bei der IKK-Aktivierung zugeschrieben [Zhou et al, 2004]. Unabhängig davon, ob Malt1 selbst eine enzymatische Funktion besitzt, ist es denkbar, dass die Schwächung der Bcl10-Malt1-Affinität weitreichende Folgen auf die Oligomerisierungsfähigkeiten der Proteine hat und damit reprimierenden Einfluss auf die IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung nimmt.

5. Die Analyse von T-Zellen Bcl10-defizienter Mäuse, die retroviral mit Bcl10 WT oder der phosphorylierungsdefekten Mutante Bcl10 5xA rekonstituiert wurden, unterstützt die



**Abbildung 4.2** Mögliche physiologische Funktion der Bcl10-Phosphorylierung. Die kostimulativ-induzierte Bildung des CBM-Komplexes ermöglicht IKK/NF- $\kappa$ B- und T-Zell Aktivierung. Durch simultan auftretende IKK $\beta$ -abhängige Phosphorylierung von Bcl10 wird eine Umordnung des CBM-Komplexes eingeleitet, die zur Dämpfung des ursprünglichen Signals führt.

Hypothese, dass C-terminale Bcl10-Phosphorylierung einen negativ-regulatorischen Einfluss auf die Weiterleitung T-Zell aktivierender Signale hat (s. 3.1.7). Die Rekonstitution der Zellen mit Bcl10 WT gibt einem signifikanten Teil der infizierten Zellen die Fähigkeit zur Antigenrezeptor-induzierten Zytokinproduktion zurück. Da die IL-2/TNF $\alpha$ -produzierende Population der Bcl10 5xA exprimierenden Zellen vergleichsweise größer ist als bei Bcl10 WT exprimierenden Zellen, konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Serine 134/136/138/141/144 von Bcl10 eine wichtige reprimierende Funktion bei der Modulierung der T-Zellantwort spielen.

Zusammengefasst legen diese Beobachtungen folgenden Mechanismus für die Antigenrezeptor-induzierte IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivierung nahe (Abbildung 4.2): T-Zell Kostimulation führt zur Phosphorylierung einer Vielzahl Rezeptor-proximaler Signalproteine, wodurch die Aktivierung der Kinasen PDK1, PKC $\theta$  und IKK $\beta$  eingeleitet wird. Diese Prozesse führen zur Bildung eines Multikomponentenkomplexes an der Membran, der u.a die CBM- und IKK-Subkomplexe beinhaltet. Die Bildung des CBM-Komplexes ermöglicht die nachhaltige Aktivierung des IKK-Komplexes über einen noch unbekanntem Mechanismus, der aber wahrscheinlich über Bcl10-abhängige Oligomerisierung von Malt1 verläuft. Um bereits in der Frühphase der T-Zell Aktivierung eine Überreaktion zu vermeiden, werden autoregulative Mechanismen aktiviert. IKK $\beta$  ist nicht nur in der Lage, die Signalweiterleitung durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  voranzutreiben. Neben I $\kappa$ B $\alpha$  ist auch die CBM-Komplexkomponente Bcl10 ein Substrat von IKK $\beta$ . IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von Bcl10 induziert eine Umlagerung innerhalb des CBM-Komplexes, der die Affinität von Bcl10 und Malt1 reduziert und eine Abschwächung der Signalweiterleitung möglicherweise durch verminderte Oligomerisierungstendenz nach sich zieht. Ein derartiger Mechanismus würde auch der beobachteten Kinetik der Bcl10-Phosphorylierung Rechnung tragen, die in den ersten 30 Minuten nach T-Zell Aktivierung kontinuierlich stärker wird.

#### **4.6 Bcl10-Degradation durch HECT E3-Ligasen**

Die kostimulativ-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in T-Zellen ist von vergleichsweise transientser Natur. Zusätzlich zur reprimierend wirkenden Phosphorylierung von Bcl10 treten bei nachhaltiger Aktivierung Mechanismen in Erscheinung, die trotz anhaltender Stimulation zur völligen Inhibierung der IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivität führen. Dabei stellt sich heraus, dass erneut die CBM-Komplexkomponente Bcl10 als Regulatorelement genutzt wird.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass Bcl10 nach T-Zell Aktivierung nicht nur phosphoryliert, sondern auch degradiert wird (s. 3.2.1). Die Kinetik der Bcl10-Degradation ist dabei deutlich langsamer als die der Bcl10-Phosphorylierung. Die Degradation führt zu einer wirksamen Reduktion des zytoplasmatischen Proteinlevels von Bcl10 innerhalb der ersten 45 Minuten nach T-Zell Aktivierung, wodurch das Protein der Signaltransduktionskette als funktioneller Baustein entzogen wird. Dies hat zur Folge, dass eine effiziente Bildung des CBM-Komplexes unterbunden und die Aktivierung der IKK/NF- $\kappa$ B-Signalkette selektiv blockiert wird.

Weiterführende Analysen zeigen, dass Bcl10 vor der Degradation Antigenrezeptor-induziert ubiquitiniert wird, wobei Bcl10 als Substrat der Ubiquitin-Ligasen Itch und Nedd4 identifiziert werden konnte (s. 3.2.3). Beide Enzyme gehören der Familie der Nedd4-ähnlichen HECT E3-Ubiquitin-Ligasen an, die mit der Degradation einer Reihe von Substraten in unterschiedlichen Geweben, aber auch mit T-Zell spezifischen Funktionen in Verbindung gebracht wurden [Ingham et al, 2004; Liu, 2004]. Itch-defiziente Mäuse zeigen massive immunologische Störungen, u.a ausgelöst durch hyperproliferierende T-Zellen. Andere Studien zeigen, dass die Nedd4- und Itch-abhängige Degradation von PKC $\theta$  und PLC $\gamma$ 1 zur Auslösung von Anergie beiträgt [Hustad et al, 1995; Fang et al, 2002; Mueller, 2004].

Da Bcl10-Phosphorylierung und Bcl10-Ubiquitinierung simultan auftreten, wurde untersucht, ob IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von Bcl10 in Anlehnung an den Mechanismus der Stimulus-induzierten Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  als Signal für anschließende Ubiquitinierung dient. Durch pharmakologische Inhibition der IKK $\beta$ -Kinaseaktivität wird zwar die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , aber nicht die von Bcl10 verzögert (s. 3.2.2). Dieses Ergebnis belegt, dass Bcl10-Degradation und Bcl10-Phosphorylierung mechanistisch unabhängig voneinander ablaufen. Da die Inaktivierung von IKK $\beta$  die Bildung des CBM-Komplexes ebenfalls verhindert, kann vermutet werden, dass Bcl10-Degradation auch unabhängig von der CBM-Komplexbildung stattfindet. Allerdings wird die Degradation von Bcl10 durch Inhibition der PKC $\theta$ -Kinaseaktivität verhindert. Zusätzlich besitzt rekombinant exprimiertes PKC $\theta$  die Fähigkeit, Bcl10 in Kinasereaktionen mit gereinigten Proteinen effizient zu phosphorylieren (D. Krappmann, unveröffentlichte Beobachtungen). Da jedoch die Koexpression von PKC $\theta$  und Bcl10 nicht zur Destabilisierung von Bcl10 führt und Bcl10-Ubiquitinierung nach PKC $\theta$ -Koexpression aufgrund von technischen Problemen nicht analysiert werden konnte, ist zum

derzeitigen Augenblick keine Aussage über eventuell PKC $\theta$ -gesteuerte Bcl10-Phosphorylierung als Signal für Bcl10-Degradation möglich.

## 4.7 Der lysosomale Abbauweg

Signal-induzierte Ubiquitinierung von Proteinen kann in unterschiedlichen Varianten auftreten und eine Vielzahl zellulärer Funktionen steuern. Der Ubiquitinrest wird in einem dreistufigen Mechanismus auf ein Lysin des Zielproteins übertragen [Wilkinson, 2000; Pickart, 2001]. Unter physiologischen Bedingungen tritt allerdings nicht nur Mono-, sondern auch Multi- (bis zu vier Ubiquitinreste) und Polyubiquitinierung (ab fünf Ubiquitinresten) auf, deren Verknüpfung über bestimmte Lysine (K29, K48 und K63) von Ubiquitin selbst erfolgt [Pickart, 2000]. Mono- und Multiubiquitinierung werden u.a mit ortsspezifischem intrazellulären Proteintransport und Signal-induzierter Rezeptorendozytose in Verbindung gebracht [Hicke L, 2001]. Weitere Information über das Schicksal eines polyubiquitinierten Proteins ist in der Art der Verknüpfung der Ubiquitinketten gespeichert. Dabei sind K48-Verknüpfungen, die in der Regel zur Degradation des Zielproteins durch das Proteasom führen, und K63-Verknüpfungen, die anstatt Proteindegradation Protein-Protein-Interaktionen und Enzymaktivitäten regulieren, am Besten charakterisiert. Mitglieder der Familie Nedd4-ähnlicher E3-Ubiquitin Ligasen katalysieren sowohl die Übertragung von Monoubiquitin als auch die Bildung K29-, K48- und K63-verknüpfter Polyubiquitinketten, was die Substrate u. a. für den proteosomalen oder den lysosomalen Abbauweg markiert [Ingham et al, 2004; Moren et al, 2005; Wang und Pickart, 2005].

Zum Nachweis der physiologischen Relevanz der Wechselwirkung zwischen Bcl10 und Itch/Nedd4 wurden die E3-Ligasen mittels RNAi inaktiviert (s. 3.2.5). Dies führt zur Hemmung des Antigenrezeptor-induzierten Bcl10-Proteinabbaus. Weiterführend wurde unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren gezeigt, dass die Stimulus-abhängige Ubiquitinierung von Bcl10 zum lysosomalen Abbau des Proteins führt (s. 3.2.1). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass Stimulus-induzierte Degradation von Bcl10 durch Itch- und Nedd4-abhängige Ubiquitinierung in direktem Zusammenhang stehen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen deuten an, dass die Nedd4-vermittelte Ubiquitinierung von Bcl10 nicht nur an einem Lysin des Proteins stattfindet (s. 3.2.4). Vielmehr scheinen mehrere Lysine als Ubiquitinakzeptoren in Frage zu kommen. Dabei ist derzeit nicht klar, ob die Akzeptorposition in Abhängigkeit von den eingeführten Mutationen

variieren kann oder ob Bcl10 an mehreren Positionen gleichzeitig ubiquitiniert wird. Letztere Variante würde die Möglichkeit einer multiplen Monoubiquitinierung eröffnen, was bei anderen Substraten ebenfalls als Signal für lysosomale Degradation nachgewiesen wurde [Hicke, 2001].

Hefen exprimieren das Nedd4-Homolog Rsp5p, welches für die Ubiquitinierung, Internalisierung und lysosomale Degradation einer Reihe membranständiger Proteine wie Fur4p verantwortlich ist [Hicke und Riezman, 1996; Fisk und Yaffe, 1999; Rotin et al, 2000; Dunn und Hicke, 2001]. Monoubiquitinierung von Fur4p ist bereits ausreichend für die Internalisierung und Degradation des Proteins. Trotzdem wird Fur4p zeitgleich auch K63-polyubiquitiniert [Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997; Springael et al, 1999]. In Anlehnung hieran kann ein ähnliches Szenario für die Ubiquitinierungsprozesse von Bcl10 diskutiert werden. Da nach Itch/Nedd4-Koexpression oder T-Zellaktivierung neben Bcl10-Polyubiquitinierung auch kurzketzige Bcl10-Ubiquitinierung detektiert wird, besteht die Möglichkeit, dass zwischenzeitlich synthetisiertes mono- oder multiubiquitiniertes Bcl10, zumindest teilweise, durch den lysosomalen Abbauweg degradiert wird. Der Grund für eine derartige Regulation könnte sein, dass nach der Aktivierung auftretende Bcl10-Polyubiquitinierung nicht für Protein-Degradation, sondern zur Steuerung von Proteinaffinitäten innerhalb der sich bildenden Proteinkomplexe benötigt wird, monoubiquitiniertes Bcl10 allerdings teilweise degradiert wird, um einen transienten Prozess zu ermöglichen.

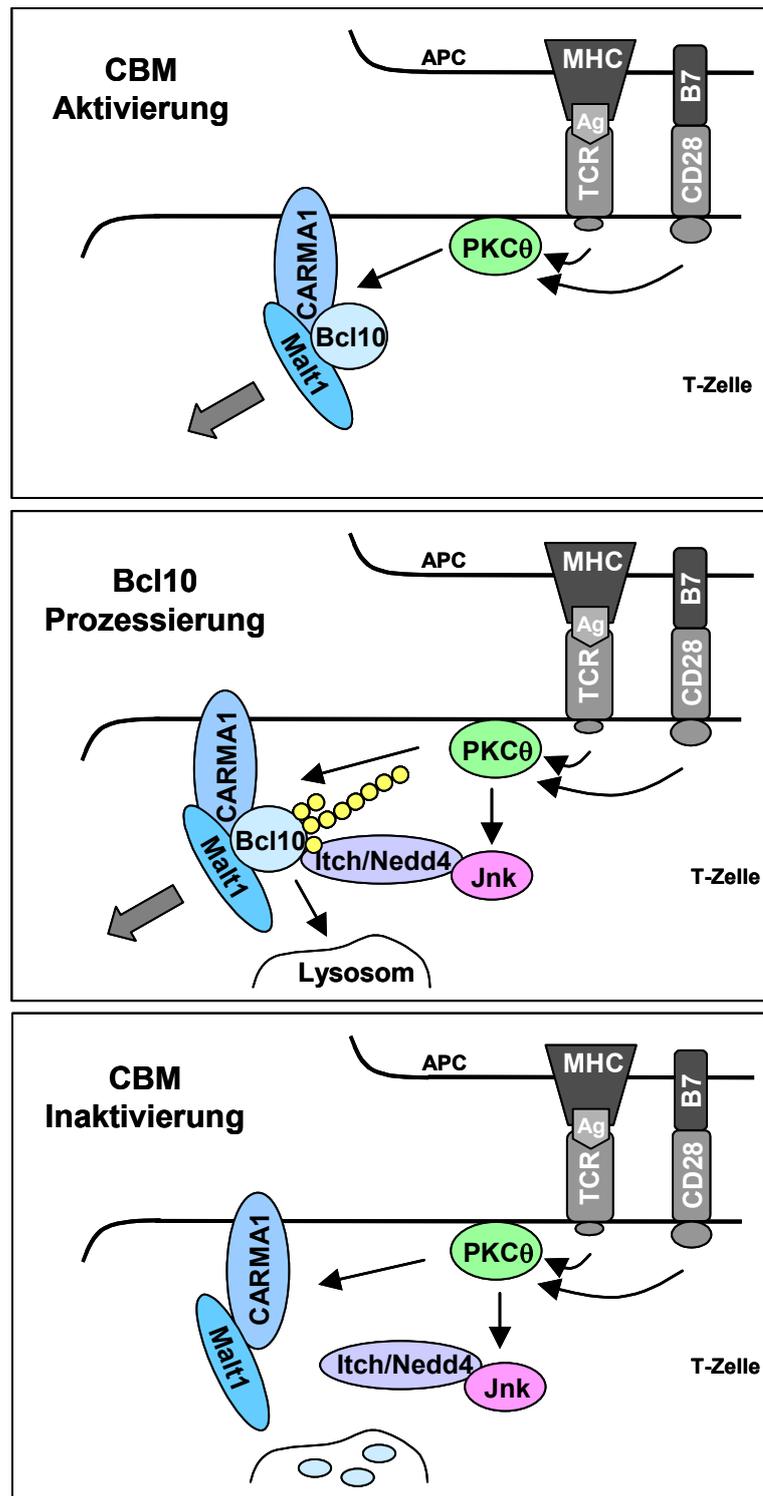
Interessanterweise zeigt die Analyse Nedd4-vermittelter Bcl10-Polyubiquitinierung, dass die Verknüpfung der Ubiquitinkette weder über K48 noch über K63 erfolgt (s. 3.2.4). Daher könnte die Bcl10-Polyubiquitinkette auch unter physiologischen Bedingungen über eines der anderen Lysine von Ubiquitin verknüpft sein. Wie bereits erwähnt, sind HECT E3-Ligasen bekannt, die die Bildung K29-verknüpfter Polyubiquitinketten katalysieren, allerdings ist die physiologische Bedeutung dieser Kettenvariante noch nicht eingehend charakterisiert [Mastrandrea et al, 1999; Russell und Wilkinson, 2004]. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass Bcl10-Polyubiquitinierung kein degradatives Signal ist.

Eine physische Interaktion zwischen Bcl10 und Itch oder Nedd4 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies spricht einerseits für ein Bcl10-assoziiertes Protein wie z.B. Malt1 oder Carma1 als Interaktionsplattform der E3-Ligasen oder andererseits für eine transiente Wechselwirkung, die möglicherweise ausschließlich durch die Aktivität der beteiligten Ligase reguliert wird und keine hohe Affinität zwischen Substrat und Enzym

benötigt. In der Regel sind WW-Domänen von Nedd4-ähnlichen E3-Ubiquitin-Ligasen für die Substratinteraktion verantwortlich, die im Fall von Itch und Nedd4 bevorzugt Prolin-enthaltende Motive der Form PPXY oder (phospho-S/phospho-T)P erkennen [Chen und Sudol, 1995; Sudol et al, 1995; Murillas et al, 2002; Ingham et al, 2005]. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Substrate mit anderen Erkennungssequenzen existieren [Ingham et al, 2004]. Bcl10 besitzt im C-Terminus eine Prolin-reiche Region mit zwei kurzen Sequenzmotiven, PR und PPLP, die bereits im Zusammenhang mit anderen Proteinen als WW-Interaktionsmotif genannt wurden [Bedford et al, 1997; Bedford et al, 2000; Sudol und Hunter, 2000]. Die physiologische Relevanz dieser potentiellen WW-Interaktionsstellen von Bcl10 gilt es noch zu untersuchen.

#### **4.8 Der Einfluss von Jnk auf die Stabilität von Bcl10**

T-Zell Kostimulation führt neben den bereits beschriebenen Effekten auch zur Aktivierung der MAP-Kinasen Jnk1 und Jnk2, die an der Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1 beteiligt sind. Allerdings zeigen Jnk1- oder Jnk2-defiziente Mäuse keine Defekte bei der Aktivierung von T-Zellen aufgrund möglicher funktioneller Redundanzen [Dong et al, 1998; Yang et al, 1998]. T-Zellen aus Jnk1/2-defizienten Mäusen dagegen sind hyperproliferativ und produzieren vergleichsweise mehr IL-2 als WT-Zellen, was auf einen negativen Regulationsmechanismus von Jnk-Kinasen bei der Aktivierung von T-Zellen hinweist [Dong et al, 2000]. Als Erklärung dieser Effekte wurde ein reprimierender Einfluss von Jnk auf die NF- $\kappa$ B-regulierte Aktivität des IL-2 Gens postuliert [Altman et al, 2000]. Interessanterweise könnte die molekulare Verbindung dieser Prozesse über Bcl10 stattfinden. Kürzlich wurde gezeigt, dass die E3-Ligase Itch nach T-Zell Kostimulation durch Phosphorylierung von Jnk aktiviert wird [Gao et al, 2004]. Daraufhin ubiquitiniert Itch die zur AP-1-Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren c-Jun und JunB, was deren Degradation zur Folge hat und übermäßige IL-4-Produktion verhindert. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten identifizieren Bcl10 als Substrat von Itch und decken zudem eine stabilisierende Wirkung pharmakologischer Jnk-Inhibitoren auf den Bcl10-Proteinlevel durch Hemmung Stimulus-induzierter Ubiquitinierung von Bcl10 auf (s. 3.2.7). Es besteht daher die Möglichkeit, dass Jnk über die Aktivierung von Itch die Stabilität von Bcl10 kontrolliert (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3 Degradation von Bcl10 verhindert konstitutive Signalweiterleitung.** Durch Stimulus-induzierte lysosomale Degradation wird die für NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion essentielle CBM-Komplexkomponente Bcl10 aus der Signalkette entfernt, woraufhin die Signaltransduktion trotz anhaltender Stimulation zum Erliegen kommt. Zur besseren Übersicht wurde die zeitgleich auftretende Phosphorylierung von Bcl10 nicht eingezeichnet.

Der negativ-regulatorische Effekt von Jnk auf die Antigenrezeptor-induzierte T-Zell Antwort könnte demzufolge molekular neben Itch-abhängiger Degradation von c-Jun und JunB auch auf Itch-abhängiger Degradation von Bcl10 basieren, die zur Reprimierung der IKK/NF- $\kappa$ B-Aktivität und damit auch zur Reduktion der IL-2-Expression führt.

#### **4.9 Reprimierende Regulationsmechanismen nach T-Zell Aktivierung**

Prozesse, die reprimierend auf T-Zell Signaltransduktion wirken, sind von immenser Bedeutung für die T-Zell Homöostase im Körper. Durch die Regulation der Dauer und Intensität der Antigenrezeptor-vermittelten Signale wird eine übermäßige T-Zell Aktivierung und damit schädliche Fehlregulationen der adaptiven Immunantwort vermieden. Erst die Summe vieler einzelner aktivierend und deaktivierend wirkender Regulationsprozesse ermöglicht eine den unterschiedlichsten Bedingungen angepasste T-Zell Antwort [Healy und Goodnow, 1998; Singer und Koretzky, 2002]. In Abbildung 4.4 sind die wichtigsten der bereits bekannten, für die Antigenrezeptor-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung relevanten und reprimierend wirksamen Mechanismen mit denen in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen im Zusammenhang dargestellt.

Ein allgemein beobachteter Mechanismus zur Reprimierung Stimulus-abhängiger NF- $\kappa$ B-Aktivität ist die Induktion des Zielgens I $\kappa$ B $\alpha$ . Verstärkt synthetisiertes I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein bewirkt in erster Linie die Dissoziation transkriptionsaktiver NF- $\kappa$ B-Dimere von der DNA, die daraufhin zurück ins Zytoplasma translozieren und für die Zielgen-Aktivierung im Zellkern nicht mehr zur Verfügung stehen [Arenzana-Seisdedos et al, 1995]. Dieser Mechanismus allein scheint bei anhaltender Stimulation allerdings nicht zur Reprimierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auszureichen.

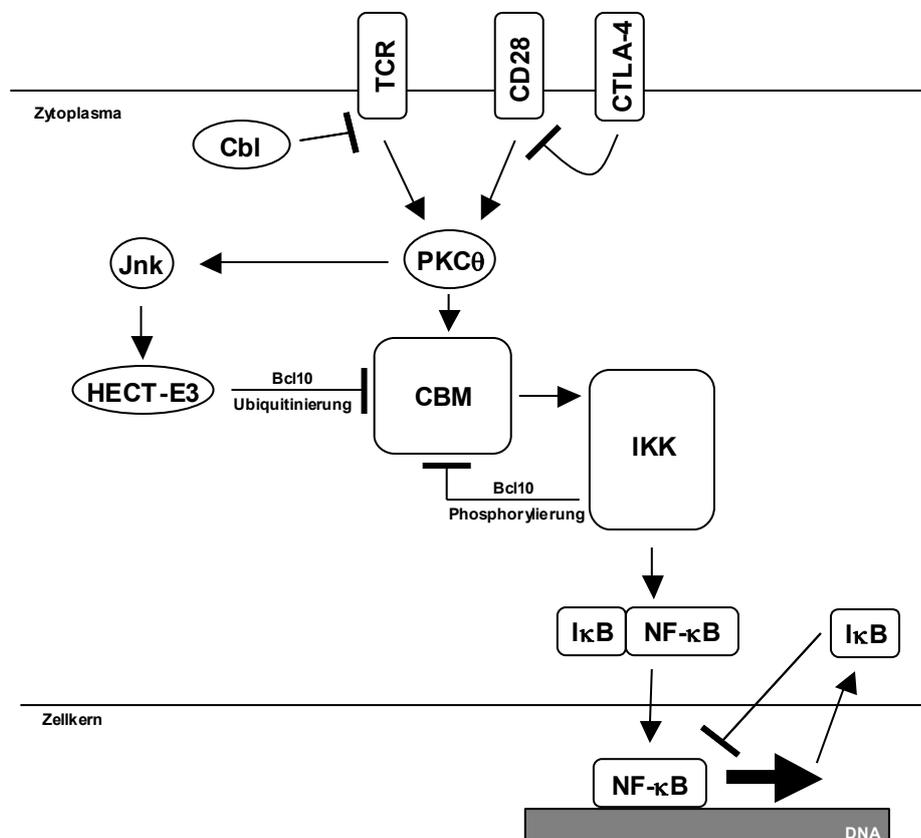
In T-Zellen wurden mehrere Prozesse mit der Reprimierung Rezeptor-proximaler Signalübertragung in Verbindung gebracht. Die Expression des Oberflächenrezeptors CTLA-4 („Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4“), der wie CD28 an B7-Moleküle auf der APC bindet, wird durch TCR/CD28-Stimulation induziert. Dabei ist die Affinität von CTLA-4 zu den B7-Liganden zehn- bis zwanzigfach höher als die von CD28, allerdings wirken CTLA-4 vermittelte Signale der zuvor durch TCR/CD28-Stimulation eingeleiteten T-Zell Aktivierung entgegen [Walunas et al, 1994; Greenwald et al, 2002]. CTLA-4 defiziente Mäuse sterben daher wenige Wochen nach der Geburt aufgrund massiver

Lymphozytenproliferation und Organinfiltration durch aktivierte T-Zellen [Waterhouse et al, 1995; Tivol et al, 1995, Waterhouse et al, 1996]. Mechanistisch ist die inhibierende Wirkung durch CTLA-4 noch nicht aufgeklärt. Es wird angenommen, dass diese einerseits auf einer Konkurrenz zwischen CD28 und CTLA-4 um kostimulatorische Signale der B7-Proteinfamilie auf der APC beruht, andererseits scheinen aber auch Zell-autonome Prozesse eine Rolle zu spielen, da die Wechselwirkungen zwischen CTLA-4 und Tyrosin-spezifischen Phosphatasen der TCR/CD28-induzierten Welle Rezeptor-proximaler Tyrosinphosphorylierung entgegenwirken [Marengere et al, 1996; Chuang et al, 2000].

Reprimierende Mechanismen der Antigenrezeptor-induzierten Signaltransduktion setzen auch am TCR direkt an. Kostimulation führt neben T-Zell-aktivierenden Prozessen zur Ubiquitinierung des TCRs, was als Degradationssignal für den lysosomalen Abbauweg dient und die Anzahl aktivierbarer TCRs auf der T-Zell Oberfläche schnell reduziert [Cenciarelli et al, 1992; Valitutti et al, 1997]. Für die Ubiquitinierung des TCRs werden die RING E3-Ubiquitin Ligasen c-Cbl und Cbl-b verantwortlich gemacht. T-Zellen c-Cbl/Cbl-b-defizienter Mäuse zeigen eine ausgeprägte Hypersensitivität gegenüber TCR-Stimulation. Biochemische Analysen ergaben, dass bei diesen Tieren die Aussortierung des TCRs in den lysosomalen Abbauweg gestört ist, wodurch alle internalisierten Rezeptoren zurück an die Membran transportiert werden [Chiang et al, 2000; Bachmaier et al, 2000; Naramura et al, 2002; Duan et al, 2004].

Biochemische und genetische Analysen haben gezeigt, dass es sich bei der CBM-Komplexkomponente Bcl10 um einen spezifischen Regulator der NF- $\kappa$ B-aktivierenden Signalkaskade in T-Zellen handelt. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten legen nahe, dass die CBM-Komplexbildung im Zusammenhang mit der Bildung eines Multikomponentenkomplexes, der auch den IKK-Komplex enthält, essentiell für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist. Daher stellt Bcl10 als Komponente des CBM-Komplexes eine ideale Plattform für die spezifische Regulation der Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar. Um eine übermäßige Aktivierung von T-Zellen zu verhindern, wird durch IKK $\beta$ -abhängige Phosphorylierung von Bcl10 bereits in den ersten Minuten nach Beginn der T-Zell Kostimulation Einfluss auf die Zusammensetzung des CBM-Komplexes genommen. Diese Umordnung scheint eine limitierende Wirkung auf die Signalintensität zu haben. Im weiteren Verlauf anhaltender Stimulation wird Bcl10 durch Itch/Nedd4-vermittelte Degradation aus der Signalkette entfernt, wodurch die CBM-abhängige Signalweiterleitung zusammenbricht. Unter Berücksichtigung der oben erwähnten, bekanntermaßen reprimierend

wirkenden Mechanismen liefern diese Erkenntnisse einen weiteren wichtigen Beitrag zum Verständnis der transienten Natur Antigenrezeptor-induzierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung in T-Zellen.



**Abbildung 4.4 Reprimierend wirkende Regulationsmechanismen in der Antigenrezeptor-abhängigen NF- $\kappa$ B-Signalkette.** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit identifizierten Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit bereits bekannten Prozessen. Bcl10 dient als zentraler Regulator der CBM-Komplexaktivität. Kostimulativ induzierte Bcl10-Phosphorylierung hat reprimierenden Einfluss auf die CBM-Komplexaktivität, Ubiquitin-abhängige Bcl10-Degradation trägt zur Abschaltung der NF- $\kappa$ B-Aktivität trotz anhaltender Stimulation bei. Weitere reprimierend wirkende Mechanismen involvieren zytosolisches I $\kappa$ B, Cbl und CTLA-4 (Erläuterungen im Text).

#### 4.10 Ausblick

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten erweitern maßgeblich das Verständnis bezüglich der intrazellulären Prozesse, die zur Steuerung der T-Zell Antwort beitragen. Von großem Interesse wird in Zukunft die Analyse des komplexen Netzwerks an Proteininteraktionen sein, in welches sich der Signal-induziert gebildete CBM-Komplex einfügt. Die Bildung eines

Multikomponentenkomplexes an der Membran scheint auch von Proteinen wie IKK $\beta$ , denen ursprünglich eine nachgelagerte Funktion in der Signaltransduktionskaskade zugeordnet war, abhängig zu sein. Dies wirft die Frage auf, ob bestehende Vorstellungen stufenweiser Signalübertragung in aktivierten T-Zellen neu überdacht werden müssen. Die dynamische Natur dieser Proteinkomplexe lässt weiterhin vermuten, dass noch unbekannte Bindungspartner der bereits identifizierten Komponenten existieren, die signalabhängig rekrutiert werden und eine vergleichbar essentielle Rolle bei der Signal-Weiterleitung spielen.

Am Beispiel von Bcl10 wurde gezeigt, dass postrtranslationale Modifikationen einer einzelnen Netzwerks-Komponente wesentlichen Einfluss auf die Signalübertragung haben können. Dabei wird die Bedeutung negativ wirksamer Regulationsmechanismen für die Steuerung physiologischer Prozesse zunehmend deutlich. Die Beteiligung von Jnk an der Regulation des CBM-Komplexes unterstreicht, dass einzelne Signalwege nicht mehr getrennt betrachtet werden können. Ein weites Feld für zukünftige Analysen wird daher die Untersuchung der molekularen Kommunikation zwischen ursprünglich separat betrachteten Proteinkaskaden wie den NF- $\kappa$ B-, AP-1- und NF-AT-aktivierenden Signalketten sein.

NF- $\kappa$ B-abhängige Zielgene spielen nicht nur bei der Steuerung der Immunantwort, sondern auch bei einer Vielzahl von anderen Prozessen wie z. B. Apoptose, zellulärer Stress-Antwort oder Zellzyklusregulation eine Rolle und sind mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Tumoren in Verbindung gebracht worden. Dies begründet gegenwärtige Anstrengungen, aufgrund weitgreifender mechanistischer Vernetzung von NF- $\kappa$ B selektive Ansatzpunkte für therapeutische Strategien zu finden. Die Funktionsaufklärung hochspezifischer Regulatorproteine wie Carma1, Malt1 und Bcl10 eröffnet daher ein breites Spektrum an therapeutischen Interventionsmöglichkeiten. Ein besonderer Aspekt bei der Modulierung definierter Signalwege könnte hierbei den negativ-regulatorischen Schaltkreisen zukommen. So wäre es denkbar, auf Basis der Untersuchungen dieser Arbeit durch pharmakologische Verstärkung Bcl10-degradativer Prozesse den NF- $\kappa$ B-Signalweg in aktivierten T-Zellen selektiv zu hemmen sowie im Gegenzug durch Inhibierung des Bcl10-Proteinabbaus oder der Bcl10-Kinasereaktion die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion nach T-Zell Aktivierung nachhaltig zu verlängern und auf diese Weise die Immunantwort *in vivo* je nach Bedarf zu beeinflussen. Die Kenntnis der in dieser Arbeit identifizierten Mechanismen könnte daher die Grundlage für die Entwicklung spezifischer Medikamente zur Behandlung von Erkrankungen bilden, die im Zusammenhang mit Fehlregulationen der T-Zell Antwort wie beispielsweise chronischen Entzündungen oder Immunschwäche stehen.

## 5 Zusammenfassung

Der Organismus hält bei der Regulation des Immunsystems eine ständige Balance zwischen Immunodefizienz und Autoimmunität. Dabei unterliegt die Aktivierung der adaptiven Immunantwort einer strengen Überwachung durch Antigen-sensitive T-Zellen. Diese sind in der Lage, auf vergleichsweise schwache Stimuli zu reagieren, da die intrazellulären Transduktionskaskaden das ursprüngliche Signal um ein Vielfaches verstärken. Allerdings besteht durch unkontrollierte Signalverstärkung bei anhaltender Stimulation auch die Gefahr einer Überreaktion. Die Grundlage einer funktionierenden Immunantwort ist daher ein vielschichtig reguliertes Zusammenspiel aus Signalen, die zur Auslösung, Verstärkung oder Dämpfung der T-Zell Antwort beitragen.

Eine Vielzahl von Genen, die das Schicksal von T-Zellen bestimmen, steht unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B. Auf molekularer Ebene ist der IKK-Komplex die zentrale Schaltstelle der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade, dessen Aktivität in T-Zellen von den Signalproteinen Carma1, Bcl10 und Malt1 gesteuert wird. Die Untersuchungen in dieser Arbeit belegen, dass es nach der Aktivierung von T-Zellen zur Bildung eines Carma1/Bcl10/Malt1 (CBM)-Komplexes kommt. Überraschenderweise ist die Bildung dieses Komplexes abhängig von IKK $\beta$ , einer der katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes, die zuvor ausschließlich mit CBM-nachgelagerten Effektorfunktionen in Zusammenhang stand. Weiterführende Untersuchungen decken neben der essentiellen Funktion von IKK $\beta$  bei der Bildung des CBM-Komplexes eine negativ-regulatorische Funktion bei der Steuerung der CBM-Komplexaktivität durch Phosphorylierung von Bcl10 auf. Interaktionsstudien zeigen, dass IKK $\beta$ -vermittelte Bcl10-Phosphorylierung die Bcl10-Carma1-Affinität zwar verstärkt, die Bcl10-Malt1-Interaktion aber substantiell schwächt. Da die Phosphorylierung von Bcl10 in primären T-Zellen zu einer Dämpfung der Stimulus-induzierten Zytokinproduktion führt, könnte die IKK $\beta$ -gesteuerte Modulation CBM-interner Proteinaffinitäten als Erklärung für verminderte Effizienz bei der Signaltransduktion dienen.

Im Zuge anhaltender T-Zell Stimulation treten Prozesse in Erscheinung, die verstärkt zur transienten Natur der Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beitragen. Die Analysen zeigen, dass persistente Stimulation von T-Zellen die Ubiquitinierung und Degradation von Bcl10 induziert. Dadurch wird ein essentieller Regulator der Signalkaskade abgebaut und konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindert. Pharmakologische und immunhistochemische Untersuchungen decken auf, dass Bcl10 über den lysosomalen

Abbauweg degradiert wird, wobei die HECT E3-Ligasen Itch und Nedd4 für die Ubiquitinierung des Proteins verantwortlich sind. Auch die MAP-Kinase Jnk hat einen destabilisierenden Einfluss auf Bcl10, wodurch negativ-regulatorische Mechanismen zur Abschaltung der NF- $\kappa$ B-Aktivität zusätzlich unterstützt werden.

Zusammengefasst tragen die präsentierten Ergebnisse maßgeblich zum Verständnis spezifischer Regulationsmechanismen bei, die an der Modulierung der T-Zell Antwort beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden CBM/IKK-abhängige Mechanismen identifiziert, die eine aktivierende und reprimierende Funktion bei der Antigenrezeptor-gesteuerten NF- $\kappa$ B-Induktion haben. Zusätzlich modifizieren die Beobachtungen das gängige Modell Antigenrezeptor-gesteuerter Signalübertragung in T-Zellen, da IKK $\beta$  auf duale Weise die Aktivität des CBM-Komplexes reguliert, obwohl der Kinase bis jetzt eine CBM-nachgelagerte Funktion in der Antigenrezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade zugeschrieben wurde. Es besteht daher Grund zur Annahme, dass in aktivierten T-Zellen ein vielfältig positiv und negativ regulierter Multikomponentenkomplexes gebildet wird, der die CBM- und IKK-Subkomplexe beinhaltet und eine nicht-hierarchische Signalübertragung unterstützt.

## 6 Abkürzungen

A	Adenosin
Ag	Antigen
ALLN	N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal
AP-1	Activator Protein 1
APC	Antigen Presenting Cell
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	Ankyrin Repeat Domain
AS	Aminosäure
Bcl	B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia/Lymphoma Associated
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CARD	Caspase Recruitment Domain
Carma1	CARD Containing MAGUK Protein 1
Casp8	Caspase 8
Cbl	Casitas B-Lineage Lymphoma b
CBM	Carma1/Bcl10/Malt1
CC	Coiled Coil
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
CK	Casein Kinase
CLD	Caspase Like Domain
cpm	Counts Per Minute
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DD	Death Domain
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EHV2	Equine Herpesvirus 2

---

EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FL	Fluorescence
Foxo3a	Forkhead Box O3a
FSC	Forward Scatter
G	Guanosin
GST	Glutathion-S-Transferase
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
GUK	Guanylate Kinase Like
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES buffered saline (HEPES gepufferte Kochsalzlösung)
HECT	Homology To The E6-Associated Protein Carboxyl Terminus
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
HRP	Horseradish Peroxidase
IAP	Inhibitor Of Apoptosis
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	Inhibitor Of NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IL-2-APC	IL-2-Allophycocyanin
IL-R	IL-Rezeptor
Iono	Ionomycin
IP	Immunopräzipitation
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
IRES	Internal Ribosome Entry Segment
Jnk	Jun N-terminal Kinase
KA	Kinase-Assay, <i>in vitro</i> Kinasereaktion
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LAT	Linker Of Activation In T-Cells
LAMP1	Lysosomal Associated Membrane Protein 1
LB	Luria-Bertani Medium
Lck	Lymphocyte Protein Tyrosine Kinase
LFA1	Lymphocyte Function Associated Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
MAGUK	Membrane Associated Guanylate Kinase

---

MAIL	Molecule Possessing Ankyrin Repeats Induced By Lipopolysaccharide
Malt1	Mucosa Associated Lymphoid Tissue 1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
MTOC	Microtubule Organisation Center
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nedd4	Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-regulated 4
NEM	N-Ethylmaleimide
NF-AT	Nuclear Factor Of Activated T-Cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
NLS	Kernlokalisierungssignal
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	3-Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1 Homologous
PG	Proteoglykane
P/I	PMA/Ionomycin
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
PKC	Protein Kinase C
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C $\gamma$ 1
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RHD	Rel Homologie Domain
RING	Really Interesting New Gene
RIP	Receptor Interacting Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds Per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek	Sekunde
SH3	Src Homology 3
SLP76	SH2 Domain Containing Leukocyte Protein Of 76 kD
SMAC	Supra Molecular Adhesion Complex

---

SRD	Signal Response Domain
SSC	Sideward Scatter
Stim	Stimulation
T	Thymidin
TAB	TAK1 Binding Protein
TAK1	Transforming Growth Factor $\beta$ Activated Kinase 1
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCR	T-Cell Receptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thy1	Thymus Cell Antigen
TIR	Toll/IL-1R
TLR	Toll Like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TNF $\alpha$ -PE	TNF $\alpha$ -Phycoerythrin
TRADD	RNF Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF-Rezeptor Associated Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Ubi	Ubiquitin
UV	ultraviolette Strahlung
Vpu	Viral Protein u
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZAP70	$\zeta$ -Chain Associated Protein

## 7 Literaturverzeichnis

- Acuto, O. and Michel, F. (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*, **3**, 939-951.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. and Akira, S. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, **9**, 143-150.
- Altman, A., Isakov, N. and Baier, G. (2000) Protein kinase C  $\theta$ : a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunol Today*, **21**, 567-573.
- Andres, P.G., Howland, K.C., Dresnek, D., Edmondson, S., Abbas, A.K. and Krummel, M.F. (2004b) CD28 signals in the immature immunological synapse. *J Immunol*, **172**, 5880-5886.
- Andres, P.G., Howland, K.C., Nirula, A., Kane, L.P., Barron, L., Dresnek, D., Sadra, A., Imboden, J., Weiss, A. and Abbas, A.K. (2004a) Distinct regions in the CD28 cytoplasmic domain are required for T helper type 2 differentiation. *Nat Immunol*, **5**, 435-442.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelier, F., Thomas, D. and Hay, R.T. (1995) Inducible nuclear expression of newly synthesized I $\kappa$ B $\alpha$  negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol*, **15**, 2689-2696.
- Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y.Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., Le, J., Ohashi, P.S., Sarosi, I., Nishina, H., Lipkowitz, S. and Penninger, J.M. (2000) Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature*, **403**, 211-216.
- Baeuerle, P.A. and Baichwal, V.R. (1997) NF- $\kappa$ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol*, **65**, 111-137.
- Baier, G. (2003) The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol Rev*, **192**, 64-79.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, **14**, 649-683.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245-252.
- Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, **300**, 1524-1525.
- Bedford, M.T., Chan, D.C. and Leder, P. (1997) FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *Embo J*, **16**, 2376-2383.
- Bedford, M.T., Sarbassova, D., Xu, J., Leder, P. and Yaffe, M.B. (2000) A novel pro-Arg motif recognized by WW domains. *J Biol Chem*, **275**, 10359-10369.
- Bertin, J., Wang, L., Guo, Y., Jacobson, M.D., Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Merriam, S., DiStefano, P.S. and Alnemri, E.S. (2001) 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*, **276**, 11877-11882.
- Betts, J.C. and Nabel, G.J. (1996) Differential regulation of NF- $\kappa$ B2 (p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol Cell Biol*, **16**, 6363-6371.

- Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M.J. and Altman, A. (2001) Antigen-induced translocation of PKC $\theta$  to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol*, **2**, 556-563.
- Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D.C., Johnson-Vroom, K.E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A.G., Aronow, B.J., Ghosh, G., Rickert, R.C. and Karin, M. (2004) Activation of IKK $\alpha$  target genes depends on recognition of specific  $\kappa$ B binding sites by RelB:p52 dimers. *Embo J*, **23**, 4202-4210.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004) The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, **25**, 280-288.
- Bouchier-Hayes, L. and Martin, S.J. (2002) CARD games in apoptosis and immunity. *EMBO Rep*, **3**, 616-621.
- Bradley, L.M., Harbertson, J., Freschi, G.C., Kondrack, R. and Linton, P.J. (2000) Regulation of development and function of memory CD4 subsets. *Immunol Res*, **21**, 149-158.
- Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y. and Ballard, D.W. (1995) Coupling of a signal response domain in I $\kappa$ B $\alpha$  to multiple pathways for NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol*, **15**, 2809-2818.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. and Siebenlist, U. (1995) Control of I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*, **267**, 1485-1488.
- Bryant, P. and Ploegh, H. (2004) Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol*, **16**, 96-102.
- Bull, P., Morley, K.L., Hoekstra, M.F., Hunter, T. and Verma, I.M. (1990) The mouse c-rel protein has an N-terminal regulatory domain and a C-terminal transcriptional transactivation domain. *Mol Cell Biol*, **10**, 5473-5485.
- Burr, J.S., Savage, N.D., Messah, G.E., Kimzey, S.L., Shaw, A.S., Arch, R.H. and Green, J.M. (2001) Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol*, **166**, 5331-5335.
- Call, M.E. and Wucherpfennig, K.W. (2005) The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol*, **23**, 101-125.
- Cenciarelli, C., Hou, D., Hsu, K.C., Rellahan, B.L., Wiest, D.L., Smith, H.T., Fried, V.A. and Weissman, A.M. (1992) Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor. *Science*, **257**, 795-797.
- Che, T., You, Y., Wang, D., Tanner, M.J., Dixit, V.M. and Lin, X. (2004) MALT1/paracaspase is a signaling component downstream of CARMA1 and mediates T cell receptor-induced NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem*, **279**, 15870-15876.
- Chen, H.I. and Sudol, M. (1995) The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7819-7823.
- Chiang, Y.J., Kole, H.K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R.J., Jang, I.K., Gutkind, J.S., Shevach, E. and Gu, H. (2000) Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature*, **403**, 216-220.
- Chin, A.I., Dempsey, P.W., Bruhn, K., Miller, J.F., Xu, Y. and Cheng, G. (2002) Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature*, **416**, 190-194.
- Chuang, E., Fisher, T.S., Morgan, R.W., Robbins, M.D., Duerr, J.M., Vander Heiden, M.G., Gardner, J.P., Hambor, J.E., Neveu, M.J. and Thompson, C.B. (2000) The CD28 and

- CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity*, **13**, 313-322.
- Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N. and Altman, A. (2000) NF- $\kappa$ B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C  $\theta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3394-3399.
- Cross, S.L., Halden, N.F., Lenardo, M.J. and Leonard, W.J. (1989) Functionally distinct NF- $\kappa$ B binding sites in the immunoglobulin  $\kappa$  and IL-2 receptor  $\alpha$  chain genes. *Science*, **244**, 466-469.
- Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B. and Chien, Y. (1998) Ligand recognition by  $\alpha/\beta$  T cell receptors. *Annu Rev Immunol*, **16**, 523-544.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. and Chen, Z.J. (2000) Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, **103**, 351-361.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. and Karin, M. (1999) Positive and negative regulation of I $\kappa$ B kinase activity through IKK $\beta$  subunit phosphorylation. *Science*, **284**, 309-313.
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*, **388**, 548-554.
- Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J.M., Hossfeld, D.K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H. and Marynen, P. (1999) 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*, **93**, 3601-3609.
- Dimitratos, S.D., Woods, D.F., Stathakis, D.G. and Bryant, P.J. (1999) Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays*, **21**, 912-921.
- Dong, C., Yang, D.D., Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Xu, J., Davis, R.J. and Flavell, R.A. (2000) JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature*, **405**, 91-94.
- Dong, C., Yang, D.D., Wysk, M., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. and Flavell, R.A. (1998) Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science*, **282**, 2092-2095.
- Douglass, A.D. and Vale, R.D. (2005) Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell*, **121**, 937-950.
- Duan, L., Reddi, A.L., Ghosh, A., Dimri, M. and Band, H. (2004) The Cbl family and other ubiquitin ligases: destructive forces in control of antigen receptor signaling. *Immunity*, **21**, 7-17.
- Dunn, R. and Hicke, L. (2001) Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem*, **276**, 25974-25981.
- Dunne, A. and O'Neill, L.A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*, **2003**, re3.
- Egawa, T., Albrecht, B., Favier, B., Sunshine, M.J., Mirchandani, K., O'Brien, W., Thome, M. and Littman, D.R. (2003) Requirement for CARMA1 in antigen receptor-induced NF- $\kappa$ B activation and lymphocyte proliferation. *Curr Biol*, **13**, 1252-1258.
- Fan, C.M. and Maniatis, T. (1991) Generation of p50 subunit of NF- $\kappa$ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, **354**, 395-398.

- Fang, D., Elly, C., Gao, B., Fang, N., Altman, Y., Joazeiro, C., Hunter, T., Copeland, N., Jenkins, N. and Liu, Y.C. (2002) Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol*, **3**, 281-287.
- Fanning, A.S. and Anderson, J.M. (1999) Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 432-439.
- Fisk, H.A. and Yaffe, M.P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **145**, 1199-1208.
- Gaide, O., Favier, B., Legler, D.F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J. and Thome, M. (2002) CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nat Immunol*, **3**, 836-843.
- Gaide, O., Martinon, F., Micheau, O., Bonnet, D., Thome, M. and Tschopp, J. (2001) Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett*, **496**, 121-127.
- Galan, J.M. and Haguenaer-Tsapis, R. (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J*, **16**, 5847-5854.
- Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y.C. and Karin, M. (2004) Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science*, **306**, 271-275.
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L. and Wilson, I.A. (1996) An  $\alpha/\beta$  T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, **274**, 209-219.
- Gay, N.J. and Keith, F.J. (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, **351**, 355-356.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell*, **109 Suppl**, S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.
- Green, J.M., Noel, P.J., Sperling, A.I., Walunas, T.L., Gray, G.S., Bluestone, J.A. and Thompson, C.B. (1994) Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity*, **1**, 501-508.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J. and Sharpe, A.H. (2005) The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, **23**, 515-548.
- Greenwald, R.J., Latchman, Y.E. and Sharpe, A.H. (2002) Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, **14**, 391-396.
- Griffin, G.E., Leung, K., Folks, T.M., Kunkel, S. and Nabel, G.J. (1989) Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- $\kappa$ B. *Nature*, **339**, 70-73.
- Griffiths, G.M. (1995) The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol*, **7**, 343-348.
- Hannink, M. and Temin, H.M. (1989) Transactivation of gene expression by nuclear and cytoplasmic rel proteins. *Mol Cell Biol*, **9**, 4323-4336.
- Hara, H., Wada, T., Bakal, C., Kozieradzki, I., Suzuki, S., Suzuki, N., Nghiem, M., Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Bauer, B., D'Acquisto, F., Ghosh, S., Yeh, W.C., Baier, G., Rottapel, R. and Penninger, J.M. (2003) The MAGUK family protein CARD11 is essential for lymphocyte activation. *Immunity*, **18**, 763-775.
- Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins, S.M., Morris, J.S., Yurochko, A.D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P. and Baldwin, A.S., Jr. (1991) Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I $\kappa$ B-like activity. *Cell*, **65**, 1281-1289.

- Hatada, E.N., Krappmann, D. and Scheidereit, C. (2000) NF- $\kappa$ B and the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, **12**, 52-58.
- Hatada, E.N., Naumann, M. and Scheidereit, C. (1993) Common structural constituents confer I $\kappa$ B activity to NF- $\kappa$ B p105 and I $\kappa$ B/MAD-3. *Embo J*, **12**, 2781-2788.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev*, **18**, 2195-2224.
- He, H.T., Lellouch, A. and Marguet, D. (2005) Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Semin Immunol*, **17**, 23-33.
- Hehner, S.P., Li-Weber, M., Giaisi, M., Droge, W., Krammer, P.H. and Schmitz, M.L. (2000) Vav synergizes with protein kinase C  $\theta$  to mediate IL-4 gene expression in response to CD28 costimulation in T cells. *J Immunol*, **164**, 3829-3836.
- Heissmeyer, V., Macian, F., Im, S.H., Varma, R., Feske, S., Venuprasad, K., Gu, H., Liu, Y.C., Dustin, M.L. and Rao, A. (2004) Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol*, **5**, 255-265.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.
- Hicke, L. and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hicke, L. and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, **84**, 277-287.
- Ho, L., Davis, R.E., Conne, B., Chappuis, R., Berczy, M., Mhawech, P., Staudt, L.M. and Schwaller, J. (2005) MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF- $\kappa$ B-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells. *Blood*, **105**, 2891-2899.
- Horejsi, V. (2005) Lipid rafts and their roles in T-cell activation. *Microbes Infect*, **7**, 310-316.
- Hoshino, K., Takeushi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, **162**, 3749 - 3752.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. and Goeddel, D.V. (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, **4**, 387-396.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**, 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, **81**, 495-504.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK $\alpha$  subunit of I $\kappa$ B kinase. *Science*, **284**, 316-320.
- Hustad, C.M., Perry, W.L., Siracusa, L.D., Rasberry, C., Cobb, L., Cattanaach, B.M., Kovatch, R., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (1995) Molecular genetic characterization of six recessive viable alleles of the mouse agouti locus. *Genetics*, **140**, 255-265.
- Iezzi, G., Karjalainen, K. and Lanzavecchia, A. (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naïve and effector T cells. *Immunity*, **8**, 89-95.
- Ingham, R.J., Colwill, K., Howard, C., Dettwiler, S., Lim, C.S., Yu, J., Hersi, K., Raaijmakers, J., Gish, G., Mbamalu, G., Taylor, L., Yeung, B., Vassilovski, G., Amin, M., Chen, F., Matskova, L., Winberg, G., Ernberg, I., Linding, R., O'Donnell, P., Starostine, A.,

- Keller, W., Metalnikov, P., Stark, C. and Pawson, T. (2005) WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Mol Cell Biol*, **25**, 7092-7106.
- Ingham, R.J., Gish, G. and Pawson, T. (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*, **23**, 1972-1984.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M. and Davis, M.M. (2002) Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*, **419**, 845-849.
- Isakov, N. and Altman, A. (1985) Tumor promoters in conjunction with calcium ionophores mimic antigenic stimulation by reactivation of alloantigen-primed murine T lymphocytes. *J Immunol*, **135**, 3674-3680.
- Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S., Chan, A.C. and Weiss, A. (1994) Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*, **263**, 1136-1139.
- Jain, J., Loh, C. and Rao, A. (1995) Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol*, **7**, 333-342.
- Janeway, C. A. Jr., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002) Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage.
- Janeway, C.A. Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.
- Jun, J.E., Wilson, L.E., Vinuesa, C.G., Lesage, S., Blery, M., Miosge, L.A., Cook, M.C., Kucharska, E.M., Hara, H., Penninger, J.M., Domashenz, H., Hong, N.A., Glynn, R.J., Nelms, K.A. and Goodnow, C.C. (2003) Identifying the MAGUK protein Carma1 as a central regulator of humoral immune responses and atopy by genome-wide mouse mutagenesis. *Immunity*, **18**, 751-762.
- Kaibuchi, K., Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1985) Protein kinase C and calcium ion in mitogenic response of macrophage-depleted human peripheral lymphocytes. *J Biol Chem*, **260**, 1366-1369.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, **11**, 115-122.
- Khoshnan, A., Bae, D., Tindell, C.A. and Nel, A.E. (2000b) The physical association of protein kinase C  $\theta$  with a lipid raft-associated inhibitor of  $\kappa$ B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF- $\kappa$ B cascade by TCR and CD28. *J Immunol*, **165**, 6933-6940.
- Khoshnan, A., Tindell, C., Laux, I., Bae, D., Bennett, B. and Nel, A.E. (2000a) 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*, **165**, 1743-1754.
- Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M. and Saito, M. (2000) MAIL, a novel nuclear I $\kappa$ B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett*, **485**, 53-56.
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Nunez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*, **416**, 194-199.
- Kopp, E. and Medzhitov, R. (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, **15**, 396-401.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Hottiger, M.O., Nabel, G.J. and Nunez, G. (1999) CIPER, a novel NF- $\kappa$ B-activating protein containing a caspase recruitment domain with homology to Herpesvirus-2 protein E10. *J Biol Chem*, **274**, 9955-9961.

- Krappmann, D., Hatada, E.N., Tegethoff, S., Li, J., Klippel, A., Giese, K., Baeuerle, P.A. and Scheidereit, C. (2000) The I $\kappa$ B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK $\gamma$  but not IKAP as a regular component. *J Biol Chem*, **275**, 29779-29787.
- Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y. and Gelinas, C. (2003) To be, or not to be: NF- $\kappa$ B is the answer--role of Rel/NF- $\kappa$ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, **22**, 8961-8982.
- Kupfer, H., Monks, C.R. and Kupfer, A. (1994) Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J Exp Med*, **179**, 1507-1515.
- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P. and Parker, P.J. (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, **281**, 2042-2045.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M. and Shaw, A.S. (2002) T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*, **295**, 1539-1542.
- Lee, K.Y., D'Acquisto, F., Hayden, M.S., Shim, J.H. and Ghosh, S. (2005) PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF- $\kappa$ B activation. *Science*, **308**, 114-118.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, **14**, 233-258.
- Li-Weber, M., Giasi, M. and Krammer, P.H. (1998) Involvement of Jun and Rel proteins in up-regulation of interleukin-4 gene activity by the T cell accessory molecule CD28. *J Biol Chem*, **273**, 32460-32466.
- Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Buscher, D., Lee, K.F., Izipisua-Belmonte, J.C. and Verma, I.M. (1999a) IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev*, **13**, 1322-1328.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F. and Verma, I.M. (1999b) Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science*, **284**, 321-325.
- Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M. (1999c) The IKK $\beta$  subunit of I $\kappa$ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor  $\kappa$ B activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med*, **189**, 1839-1845.
- Lin, J., Miller, M.J. and Shaw, A.S. (2005) The c-SMAC: sorting it all out (or in). *J Cell Biol*, **170**, 177-182.
- Lin, J. and Weiss, A. (2001) T cell receptor signalling. *J Cell Sci*, **114**, 243-244.
- Lin, X., O'Mahony, A., Mu, Y., Geleziunas, R. and Greene, W.C. (2000) Protein kinase C  $\theta$  participates in NF- $\kappa$ B activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of I $\kappa$ B kinase  $\beta$ . *Mol Cell Biol*, **20**, 2933-2940.
- Liu, S.K., Fang, N., Koretzky, G.A. and McGlade, C.J. (1999) The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol*, **9**, 67-75.
- Liu, Y.C. (2004) Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol*, **22**, 81-127.
- Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., van der Heiden, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sasaki, T., Cao, Z., Penninger, J.M., Paige, C.J., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Boyle, W.J., Goeddel, D.V. and Mak, T.W. (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev*, **13**, 1015-1024.

- Lucas, P.C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L.M., Abazeed, M.E., Chen, F.F., Yamaoka, S., Seto, M. and Nunez, G. (2001) Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, 19012-19019.
- Marengere, L.E., Waterhouse, P., Duncan, G.S., Mittrucker, H.W., Feng, G.S. and Mak, T.W. (1996) Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science*, **272**, 1170-1173.
- Mastrandrea, L.D., You, J., Niles, E.G. and Pickart, C.M. (1999) E2/E3-mediated assembly of lysine 29-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **274**, 27299-27306.
- Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., Wang, D. and Lin, X. (2005) Phosphorylation of CARMA1 Plays a Critical Role in T Cell Receptor-Mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Immunity*, **23**, 575-585.
- May, M.J., D'Acquisto, F., Madge, L.A., Glockner, J., Poher, J.S. and Ghosh, S. (2000) Selective inhibition of NF- $\kappa$ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I $\kappa$ B kinase complex. *Science*, **289**, 1550-1554.
- May, M.J. and Ghosh, S. (1998) Signal transduction through NF- $\kappa$ B. *Immunol Today*, **19**, 80-88.
- Mellman, I. and Steinman, R.M. (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, **106**, 255-258.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science*, **278**, 860-866.
- Miller, B.S. and Zandi, E. (2001) Complete reconstitution of human I $\kappa$ B kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKK $\gamma$  on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem*, **276**, 36320-36326.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A. (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **395**, 82-86.
- Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. and Kupfer, A. (1997) Selective modulation of protein kinase C  $\theta$  during T-cell activation. *Nature*, **385**, 83-86.
- Mordmuller, B., Krappmann, D., Esen, M., Wegener, E. and Scheidereit, C. (2003) Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF- $\kappa$ B-p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO Rep*, **4**, 82-87.
- Moren, A., Imamura, T., Miyazono, K., Heldin, C.H. and Moustakas, A. (2005) Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem*, **280**, 22115-22123.
- Mueller, D.L. (2004) E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol*, **5**, 883-890.
- Murillas, R., Simms, K.S., Hatakeyama, S., Weissman, A.M. and Kuehn, M.R. (2002) Identification of developmentally expressed proteins that functionally interact with Nedd4 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **277**, 2897-2907.
- Naramura, M., Jang, I.K., Kole, H., Huang, F., Haines, D. and Gu, H. (2002) c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol*, **3**, 1192-1199.
- Okkenhaug, K., Bilancio, A., Emery, J.L. and Vanhaesebroeck, B. (2004) Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. *Biochem Soc Trans*, **32**, 332-335.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. and Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell*, **78**, 773-785.

- Pfeifhofer, C., Kofler, K., Gruber, T., Tabrizi, N.G., Lutz, C., Maly, K., Leitges, M. and Baier, G. (2003) Protein kinase C  $\theta$  affects Ca<sup>2+</sup> mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med*, **197**, 1525-1535.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-548.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pitcher, L.A. and van Oers, N.S. (2003) T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol*, **24**, 554-560.
- Plaksin, D., Baeuerle, P.A. and Eisenbach, L. (1993) KBF1 (p50 NF- $\kappa$ B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J Exp Med*, **177**, 1651-1662.
- Poltorak, A., He, X., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science*, **11**, 2085 - 2088.
- Reiner, S.L. and Seder, R.A. (1995) T helper cell differentiation in immune response. *Curr Opin Immunol*, **7**, 360-366.
- Reynolds, L.F., Smyth, L.A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D. and Tybulewicz, V.L. (2002) Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C $\gamma$ 1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med*, **195**, 1103-1114.
- Rocha, B. and Tanchot, C. (2004) CD8 T cell memory. *Semin Immunol*, **16**, 305-314.
- Rodriguez, M.S., Wright, J., Thompson, J., Thomas, D., Baleux, F., Virelizier, J.L., Hay, R.T. and Arenzana-Seisdedos, F. (1996) Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  in vivo. *Oncogene*, **12**, 2425-2435.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998) IKK $\gamma$  is an essential regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300.
- Rotin, D., Staub, O. and Haguenaer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol*, **176**, 1-17.
- Rueda, D. and Thome, M. (2005) Phosphorylation of CARMA1: The Link(er) to NF- $\kappa$ B Activation. *Immunity*, **23**, 551-553.
- Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M. and Dixit, V.M. (2003) Regulation of NF- $\kappa$ B-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science*, **302**, 1581-1584.
- Ruefli-Brasse, A.A., Lee, W.P., Hurst, S. and Dixit, V.M. (2004) Rip2 participates in Bcl10 signaling and T-cell receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem*, **279**, 1570-1574.
- Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S. and Mak, T.W. (2001) Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF- $\kappa$ B and neural tube closure. *Cell*, **104**, 33-42.
- Ruland, J., Duncan, G.S., Wakeham, A. and Mak, T.W. (2003) Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity*, **19**, 749-758.
- Russell, N.S. and Wilkinson, K.D. (2004) Identification of a novel 29-linked polyubiquitin binding protein, Ufd3, using polyubiquitin chain analogues. *Biochemistry*, **43**, 4844-4854.

- Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., Mittelbrunn, M., Montoya, M.C., Gordon-Alonso, M., Serrador, J.M. and Sanchez-Madrid, F. (2002) Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol Rev*, **189**, 84-97.
- Scharschmidt, E., Wegener, E., Heissmeyer, V., Rao, A. and Krappmann, D. (2004) Degradation of Bcl10 induced by T-cell activation negatively regulates NF- $\kappa$ B signaling. *Mol Cell Biol*, **24**, 3860-3873.
- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., Levine, B.L. and June, C.H. (2000) Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, **96**, 3490-3498.
- Schmidt-Supprian, M., Courtois, G., Tian, J., Coyle, A.J., Israel, A., Rajewsky, K. and Pasparakis, M. (2003) Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity*, **19**, 377-389.
- Schmitz, M.L., Bacher, S. and Dienz, O. (2003) NF- $\kappa$ B activation pathways induced by T cell costimulation. *Faseb J*, **17**, 2187-2193.
- Schmitz, M.L., dos Santos Silva, M.A., Altmann, H., Czisch, M., Holak, T.A. and Baeuerle, P.A. (1994) Structural and functional analysis of the NF- $\kappa$ B p65 C terminus. An acidic and modular transactivation domain with the potential to adopt an  $\alpha$ -helical conformation. *J Biol Chem*, **269**, 25613-25620.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C. J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor2. *J Biol Chem*, **274**, 17406-17409.
- Schwartz, R.H. (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol*, **21**, 305-334.
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986) Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**, 921-928.
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**, 705-716.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M. (2001) Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
- Shapiro, V.S., Truitt, K.E., Imboden, J.B. and Weiss, A. (1997) CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol*, **17**, 4051-4058.
- Shi, C.S. and Kehrl, J.H. (2003) Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem*, **278**, 15429-15434.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K. (1994) Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 405-455.
- Singer, A.L. and Koretzky, G.A. (2002) Control of T cell function by positive and negative regulators. *Science*, **296**, 1639-1640.
- Sommer, K., Guo, B., Pomerantz, J.L., Bandaranayake, A.D., Moreno-Garcia, M.E., Ovechkina, Y.L. and Rawlings, D.J. (2005) Phosphorylation of the CARMA1 Linker Controls NF- $\kappa$ B Activation. *Immunity*, **23**, 561-574.
- Spencer E., Jiang J. and Chen, Z.J. (1999) Signal-induced ubiquitination of I $\kappa$ B $\alpha$  by the F-box protein Slimb/ $\beta$ -TrCP. *Genes and Dev*, **13**, 284 - 294.

- Springael, J.Y., De Craene, J.O. and Andre, B. (1999) The yeast Npi1/Rsp5 ubiquitin ligase lacking its N-terminal C2 domain is competent for ubiquitination but not for subsequent endocytosis of the gap1 permease. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 561-566.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Lin, J.H., Poyet, J.L., Fernandes-Alnemri, T., Tsichlis, P.N. and Alnemri, E.S. (1999) CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF- $\kappa$ B activation and apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 17946-17954.
- Stern, L.J. and Wiley, D.C. (1994) Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure*, **2**, 245-251.
- Stockinger, B., Kassiotis, G. and Bourgeois, C. (2004) CD4 T-cell memory. *Semin Immunol*, **16**, 295-303.
- Streubel, B., Lamprecht, A., Dierlamm, J., Cerroni, L., Stolte, M., Ott, G., Raderer, M. and Chott, A. (2003) T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood*, **101**, 2335-2339.
- Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S. and Lenardo, M. (2005) Requirement for caspase-8 in NF- $\kappa$ B activation by antigen receptor. *Science*, **307**, 1465-1468.
- Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. and Bork, P. (1995) Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett*, **369**, 67-71.
- Sudol, M. and Hunter, T. (2000) NeW wrinkles for an old domain. *Cell*, **103**, 1001-1004.
- Sun, L. and Chen, Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 119-126.
- Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P. and Chen, Z.J. (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell*, **14**, 289-301.
- Sun, Z., Arendt, C.W., Ellmeier, W., Schaeffer, E.M., Sunshine, M.J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P.L. and Littman, D.R. (2000) PKC $\theta$  is required for TCR-induced NF- $\kappa$ B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*, **404**, 402-407.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J.M., Wesche, H., Ohashi, P.S., Mak, T.W. and Yeh, W.C. (2002) Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*, **416**, 750-756.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, **21**, 335-376.
- Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N. and Akira, S. (1999) Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK $\alpha$ . *Science*, **284**, 313-316.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, **11**, 443 - 451.
- Tanaka, M., Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, D. A., Hardy, K. L. and Goeddel, D. V. (1999) Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- $\kappa$ B activation in IKK $\beta$ -deficient mice. *Immunity*, **10**, 421-429.

- Tegethoff, S., Behlke, J. and Scheidereit, C. (2003) Tetrameric oligomerization of IKK $\gamma$  is obligatory for IKK complex activity and NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol*, **23**, 2029 - 2041.
- Thery, C. and Amigorena, S. (2001) The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, **13**, 45-51.
- Thomas, J.A., Allen, J.L., Tsen, M., Dubnicoff, T., Danao, J., Liao, X.C., Cao, Z. and Wasserman, S.A. (1999) Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol*, **163**, 978-984.
- Thome, M., Gaide, O., Micheau, O., Martinon, F., Bonnet, D., Gonzalez, M. and Tschopp, J. (2001) Equine herpesvirus protein E10 induces membrane recruitment and phosphorylation of its cellular homologue, Bcl-10. *J Cell Biol*, **152**, 1115-1122.
- Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P., Mattmann, C. and Tschopp, J. (1999) Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF- $\kappa$ B transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, **274**, 9962-9968.
- Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S. (1995) I $\kappa$ B- $\beta$  regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- $\kappa$ B. *Cell*, **80**, 573-582.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A. and Sharpe, A.H. (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, **3**, 541-547.
- Truneh, A., Albert, F., Golstein, P. and Schmitt-Verhulst, A.M. (1985) Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature*, **313**, 318-320.
- Ullman, K.S., Northrop, J.P., Verweij, C.L. and Crabtree, G.R. (1990) Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol*, **8**, 421-452.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. and Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*, **6**, 961-967.
- Valitutti, S., Muller, S., Salio, M. and Lanzavecchia, A. (1997) Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3- $\zeta$  complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med*, **185**, 1859-1864.
- van der Merwe, P.A. and Davis, S.J. (2002) Immunology. The immunological synapse - a multitasking system. *Science*, **295**, 1479-1480.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. and Miyamoto, S. (1995) Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*, **9**, 2723-2735.
- Villalba, M., Bi, K., Hu, J., Altman, Y., Bushway, P., Reits, E., Neefjes, J., Baier, G., Abraham, R.T. and Altman, A. (2002) 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*, **157**, 253-263.
- Viola, A. and Lanzavecchia, A. (1996) T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, **273**, 104-106.

- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B. and Bluestone, J.A. (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, **1**, 405-413.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. and Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351.
- Wang, M. and Pickart, C.M. (2005) Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *Embo J*, **24**, 4324-4333.
- Waterhouse, P., Marengere, L.E., Mittrucker, H.W. and Mak, T.W. (1996) CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev*, **153**, 183-207.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H. and Mak, T.W. (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*, **270**, 985-988.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. and Israel, A. (1997) I $\kappa$ B $\epsilon$ , a novel member of the I $\kappa$ B family, controls RelA and cRel NF- $\kappa$ B activity. *Embo J*, **16**, 1413-1426.
- Wilkinson, K.D. (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 141-148.
- Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., Pan, L., Crook, T., Hamoudi, R., Isaacson, P.G. and Dyer, M.J. (1999) Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*, **96**, 35-45.
- Wulczyn, F.G., Naumann, M. and Scheidereit, C. (1992) Candidate proto-oncogene Bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*, **358**, 597-599.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. and Sun, S.C. (2001) NF- $\kappa$ B-inducing kinase regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100. *Mol Cell*, **7**, 401-409.
- Yablonski, D., Kadlecsek, T. and Weiss, A. (2001) Identification of a phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC $\gamma$ 1 and NFAT. *Mol Cell Biol*, **21**, 4208-4218.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J. and Israel, A. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, **93**, 1231-1240.
- Yang, D.D., Conze, D., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Davis, R.J., Rincon, M. and Flavell, R.A. (1998) Differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity*, **9**, 575-585.
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A.M., Andersen, J.S., Mann, M., Mercurio, F. and Ben-Neriah, Y. (1998) Identification of the receptor component of the I $\kappa$ B $\alpha$ -ubiquitin ligase. *Nature*, **396**, 590-594.
- Zandi, E., Chen, Y. and Karin, M. (1998) Direct phosphorylation of I $\kappa$ B by IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ : discrimination between free and NF- $\kappa$ B-bound substrate. *Science*, **281**, 1360-1363.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. (1997) The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, **91**, 243-252.
- Zhang, Q., Didonato, J.A., Karin, M. and McKeithan, T.W. (1994) Bcl3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF- $\kappa$ B proteins. *Mol Cell Biol*, **14**, 3915-3926.
- Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Nowotny, H., Vesely, M.,

- 
- Callet-Bauchu, E., Salles, G., Dixit, V.M., Rosenthal, A., Schlegelberger, B. and Morris, S.W. (1999) Inactivating mutations and overexpression of Bcl10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, **22**, 63-68.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. and Samelson, L.E. (1998 a) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, **92**, 83-92.
- Zhang, W., Tribble, R.P. and Samelson, L.E. (1998 b) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, **9**, 239-246.
- Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W. and Dixit, V.M. (2004) Bcl10 activates the NF- $\kappa$ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*, **427**, 167-171.

## **8 Anhang**

### **8.1 Publikationen**

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Wegener, E., Oeckinghaus, A., Papadopoulou, N., Lavitas, L., Schmidt-Supprian, M., Ferch, U., Mak, T. W., Ruland, J., Heissmeyer, V., Krappmann, D. (2006) Essential role for I $\kappa$ B kinase  $\beta$  in remodelling Carma1-Bcl10-Malt1 complexes upon T cell activation. *Mol Cell*, in press

Scharschmidt, E., Wegener, E., Heissmeyer, V., Rao, A., Krappmann, D. (2004) Degradation of Bcl10 induced by T-cell activation negatively regulates NF- $\kappa$ B signaling. *Mol Cell Biol* 24 (9): 3860 – 73.

## 8.2 Lebenslauf

Name	Elmar Wegener
Geburtsdatum	21.08.1974
Geburtsort	Hildesheim
Familienstand	ledig
08/2001 bis heute	<p>Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch</p> <p>Arbeitsgruppe: „Signaltransduktion in Tumorzellen“ von Prof. Dr. Claus Scheidereit.</p> <p>Beginn des Promotionsverfahrens and der Humboldt-Universität zu Berlin: 01/2004</p>
07/2000 bis 06/2001	<p>Diplomarbeit an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, Institut für Biochemie</p> <p>Arbeitsgruppe: „Zelluläre Neurobiologie“ von Dr. Markus Plomann/ Prof. Dr. Mats Paulsson.</p> <p>Titel: Charakterisierung potentieller Bindungspartner der Paccine</p>
10/1994 bis 06/2000	<p>Chemiestudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln</p> <p>Hauptfächer:           Biochemie</p> <p>                                  Organische Chemie</p> <p>                                  Anorganische Chemie</p> <p>                                  Physikalische Chemie</p>
Schulausbildung	
08/1989 bis 06/1994	Gymnasium Deutsche Schule Brüssel, Belgien
08/1986 bis 07/1989	Gymnasium Deutsche Schule Paris, Frankreich
08/1985 bis 07/1986	Orientierungsstufe St. Augustinus, Hildesheim
08/1984 bis 07/1985	Gladstone Elementary School, Columbus, Ohio, USA
08/1980 bis 07/1984	Grundschule Algermissen

### 8.3 Danksagung

Prof. Dr. Claus Scheiderei danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Labor, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, im Speziellen für die uneingeschränkte Freiheit bei der Planung und Durchführung der unterschiedlichen Projekte.

Dr. Daniel Krappmann danke ich für permanente Diskussionsbereitschaft und unermüdlichen fachlichen Einsatz, wodurch die Erstellung dieser Arbeit tagtäglich unterstützt wurde.

Prof. Dr. Wolfgang Lockau danke ich für die spontane Bereitschaft, als mein Betreuer an der Humboldt-Universität zu fungieren.

Prof. Dr. Anjana Rao, Prof. Dr. Klaus Rajewsky, Dr. Vigo Heissmeyer und Dr. Marc Schmidt-Supprian danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung von *in vivo* Experimenten und für die ausgesprochen freundliche Aufnahme in Boston.

Allen weiteren Mitarbeitern des Labors, Dr. Annette Ahlers, Dr. Meike Brömer, Dr. Mira Choi, Seda Cöl Arslan, Rudolf Dettmer, Jan Ebert, Dr. Christian Freund, Karin Ganzel, Dr. Norbert Henke, Dr. Michael Hinz, Sabine Jungmann, Dr. Eva Kärgel, Daniela Keyner, Liron Lavitas, Andrea Oeckinghaus, Anke Renger, Erika Scharschmidt, Dr. Ruth Schmidt-Ullrich, Michael Stilmann, Yoshiaki Sunami und Sarah Ugowski danke ich für die immer freundliche und produktive Arbeitsatmosphäre, anregende Diskussionen und fortwährende Unterstützung im Alltag.