

Forschungsbericht 2005

Abteilungsname: Physiologische Chemie / Biochemie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gaestel

I. Forschungsprofil der Abteilung

Innerhalb des Instituts werden Signaltransduktionsmechanismen, welche für Krebsentstehung, Entzündung und Infektabwehr relevant sind, auf verschiedenen Ebenen untersucht, mit dem Ziel, durch eine Modulation der Signalmechanismen Wege für eine effektive und rationale „Signaltransduktionstherapie“ dieser Erkrankungen zu eröffnen. Die Analyse von Proteinphosphorylierung und Proteinkinasen stellt einen übergreifenden Schwerpunkt des Instituts dar. Arbeiten zum Verständnis des *Signallings* von Rezeptortyrosinkinasen erfolgen in der Gruppe von PD Dr. Tamura, wobei Themen hinsichtlich Rezeptoraktivierung und Deaktivierung bearbeitet werden. Die Signalmechanismen von intrazellulären Serin/Threonin-Kinasen stehen im Mittelpunkt der Arbeiten der Gruppen Prof. Gaestel/Dr. Kotlyarov, Prof. Holtmann, Dr. Mielke, Dr. Niedenthal und Dr. Scheibe. Die Arbeiten der Gruppen von Prof. Gaestel/Dr. Kotlyarov und Prof. Holtmann (C3 „Biochemie der zellulären Signaltransduktion“) bilden dabei einen thematischen Schwerpunkt hinsichtlich der Erforschung von entzündungsrelevanten Mechanismen der p38 MAPK vermittelten Signaltransduktion inklusive der entsprechenden *downstream*-Mechanismen der post-transkriptionellen Genregulation. Die Arbeiten in der Gruppe von Dr. Niedenthal (C1) konzentrieren sich auf die Bedeutung von Proteinkonjugationprozessen für die Signaltransduktion und im speziellen für die Funktion von Serin/Threonin-Kinasen. In den Gruppen Dr. Scheibe und Dr. Mielke steht die Rolle von Proteinkinasen bei Differenzierung in verschiedenen relevanten zellulären Systemen, wie z.B. Muskelzellen und embryonalen Stammzelllinien, im Mittelpunkt des Interesses. Die Forschungsarbeiten des Instituts werden abgerundet durch die Arbeiten der Gruppe Dr. Binz, welche die signalmodulierende Wirkung bakterieller Neurotoxine für die Vesikelfusion untersucht.

Alle wissenschaftlichen Mitarbeiter des Instituts sind an der Lehre in den Studiengängen Human- und Zahnmedizin bzw. Biochemie beteiligt, einige darüber hinaus an der Lehre in den Studiengängen Biologie und Chemie und innerhalb der HBRS.

II. Forschungsprojekte

II.1. Ein ausgewähltes Forschungsprojekt

FMIP (Fms interacting protein): Ein Schlüsselmolekül der Granulozyten/ Makrophagen- und der Adipozyten/Muskelzell-Differenzierung.

Rezeptortyrosinkinasen spielen eine bedeutende Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung, dem Überleben, der Motilität und dem Metabolismus von Zellen. Die Übertragung ihrer Signale erfolgt durch Kombination diverser Signalmoleküle, die den Rezeptor direkt binden können oder an ihren Tyrosinresten phosphoryliert werden. In den letzten Jahren hat sich unsere Arbeit auf die Signaltransduktionswege von Rezeptortyrosinkinasen wie dem Rezeptor für M-CSF, c-Fms, oder dem Insulinrezeptor konzentriert. c-Fms kommt eine wichtige Aufgabe bei der Differenzierung von Makrophagen zu. Der Insulinrezeptor dagegen ist an einer ganzen Reihe von Signalen beteiligt, eines davon führt zur Differenzierung von Adipozyten. Bei der Untersuchung der Rezeptorinteraktionen mit Yeast-Two-Hybrid-Screenings ist es uns gelungen, einen neuen Bindungspartner der Fms-Rezeptortyrosinkinase zu identifizieren, das “Fms interacting protein” FMIP.

1) FMIP ist ein nucleär-zytoplasmatisches Shuttle-Protein.

FMIP beinhaltet verschiedene potentiell funktionelle Domänen wie einen Leucin-Zipper, eine WW-Domänen-Bindungsstelle, ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und eine PEST-Domäne (Abb. 1).

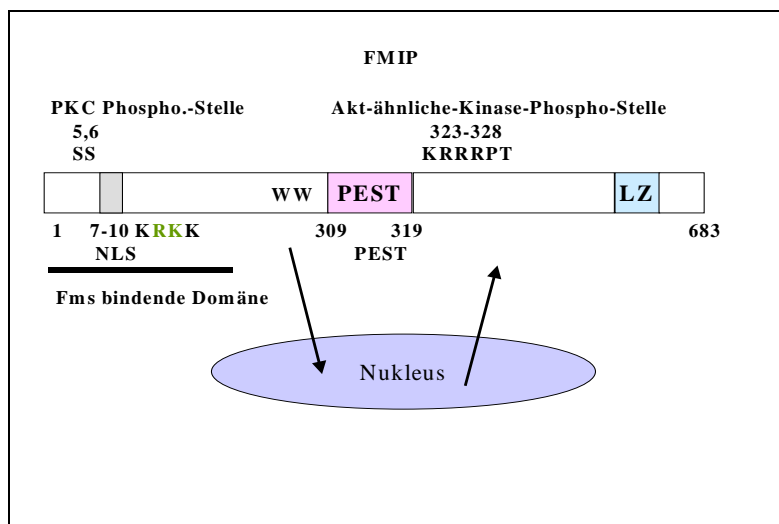


Abbildung 1: Anordnung potentiell funktioneller Domänen in FMIP (683 Aminosäurereste). WW: Bindungsstelle für WW-Domänen. PEST: PEST- Domäne. LZ: Leucin-Zipper. Serinrest 5 und 6 werden von der PKC α phosphoryliert, Threonin 328 von der S6 ribosomalen Kinase RSK.

Auf M-CSF-Stimulation hin bindet FMIP transient an den M-CSF-Rezeptor und wird an Tyrosinresten phosphoryliert. FMIP ist ein nukleär-zytoplasmatisches Shuttle-Protein, das von der Proteinkinase C an einer dem NLS direkt benachbarten Sequenz phosphoryliert und als Folge im Zytoplasma festgehalten wird. Um die biologische Bedeutung des neuen Proteins FMIP zu erfassen, haben wir zusammen mit Prof. Horak (FMI, Berlin) eine FMIP-Knockout-Maus hergestellt. Die Tiere sterben aber bereits in einem sehr frühen Embryonalstadium, was darauf schließen lässt, dass FMIP einen essentiellen Faktor für die Entwicklung der Maus darstellt.

2) FMIP kontrolliert die Granulozyten/Makrophagen-Differenzierung

Exprimiert man FMIP exogen in bipotenten myeloischen Zellen, differenzieren diese in Gegenwart hoher Konzentrationen von M-CSF nicht wie gewöhnlich zu Makrophagen sondern stattdessen zu Granulozyten (Abb. 2). Eine Behandlung der gleichen Zellen mit M-CSF in geringer Konzentration dagegen führt zur Apoptose. Daneben ist es uns inzwischen gelungen, eine mit Interferon induzierbare FMIP-Knockout-Maus herzustellen. Wenn diese Tiere mit dem Interferoninduktor Poly-IC behandelt werden, zeigen sie einen myelopoiden Phänotyp, was den Schluss nahe legt, dass FMIP unverzichtbar für die myeloische Differenzierung ist.

3) Ektopische Expression von FMIP in mesenchymalen Stammzellen hemmt die insulininduzierte Differenzierung von Adipozyten.

Da FMIP in fast allen Geweben exprimiert wird, lässt sich vermuten, dass das Protein neben dem M-CSF-Signal noch an anderen Tyrosinkinase-Signalen beteiligt ist. Tatsächlich ist mit Hilfe eines Akt-Substrat-Antikörpers gezeigt worden, dass FMIP in der Präadipozytenzelllinie 3T3-L1 nach Stimulation mit Insulin stark phosphoryliert wird. Außerdem verändert die Überexpression von FMIP in 3T3-L1-Zellen die insulinvermittelte Adipozytendifferenzierung. Für weitere Untersuchungen in dieser Richtung benutzen wir noch ein zusätzliches Zellsystem, die multipotente mesenchymale Vorläuferzelllinie C2C12. Auch diese Zellen differenzieren bei Stimulation mit Insulin zu Adipozyten, bei ektopischer Expression von FMIP allerdings zeigen sie eher die Charakteristika von Muskelzellen (Abb.2).

All unsere bisher erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei FMIP um ein Schlüsselmolekül für die Festlegung der Entwicklungsrichtung einer Zelllinie handelt. Jedoch ist der molekulare Mechanismus hierfür zurzeit noch nicht bekannt. Laufenden Experimente legen allerdings nahe, dass FMIP-Expression die Aktivität von C/EBPbeta im Reporter-Assay und auch dessen Halbwertszeit beeinflusst.

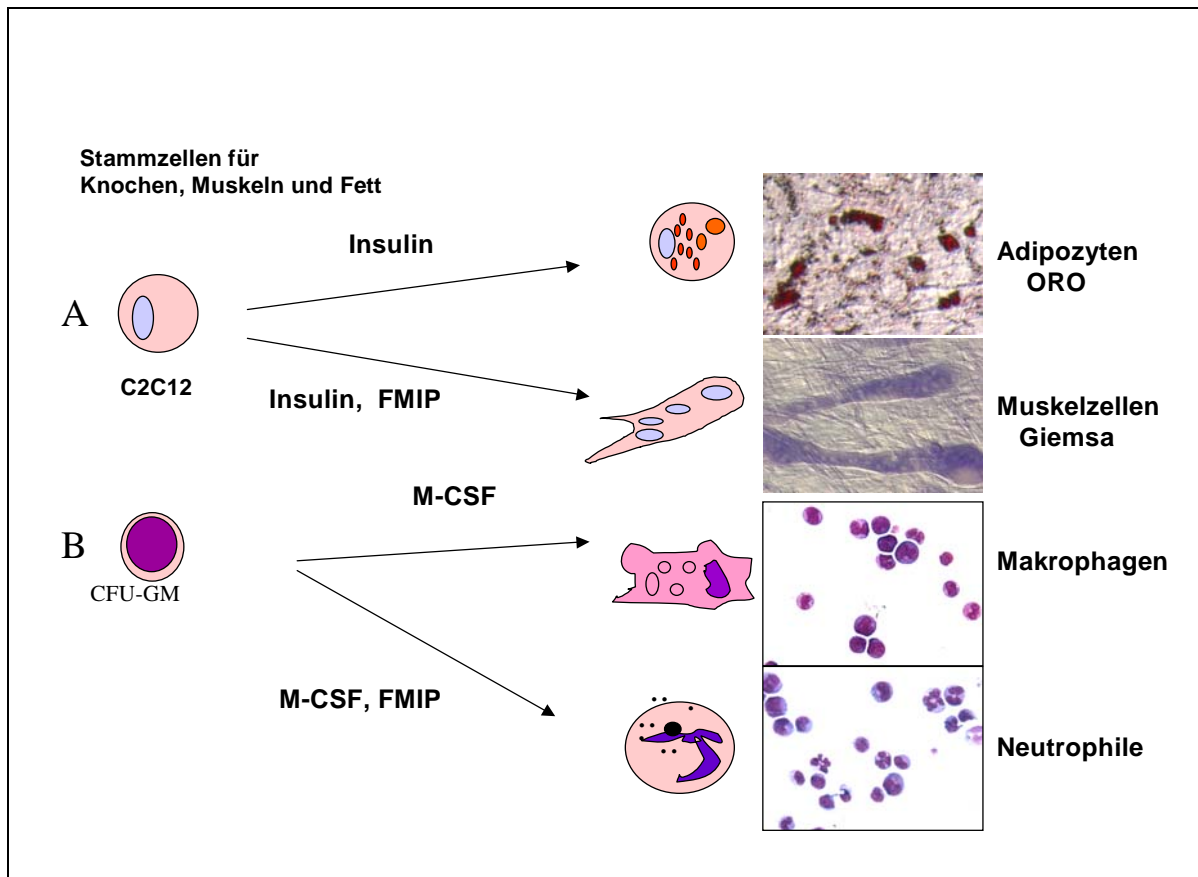


Abbildung 2: Ektopische Expression von FMIP verändert die insulin- und M-CSF-induzierte Zelldifferenzierung. A) C2C12-Zellen mit und ohne exogenes FMIP wachsen in Anwesenheit von Dexamethason, Isobutyl-methylxanthin und Insulin für 2 Tage, dann für weiter 6 Tage in Anwesenheit von Insulin. ORO: Färbung mit "Oil red O", Giemsa: Giemsa-Färbung. B) NSF60-Zellen mit und ohne FMIP wachsen 7 Tage lang in Anwesenheit von M-CSF. Die Zellen wurden auf ein Objektträger zentrifugiert und mit May-Grünwald-Giemsa gefärbt.

Projektleiterin: T. Teruko Tamura-Niemann, Förderung DFG-SFB566

II. 2. Weitere Forschungsprojekte

Die Signaltransduktionswege von c-Kit und verwandten Tyrosinkinase: Molekularer Mechanismus der hämatopoetischen Differenzierung und der Entstehung von Leukämien.

Projektleiter: T. Tamura-Niemann, A. Mancini, Förderung: DFG - SFB 566

Molekularer Mechanismus der Kooperation von Nerven- und Hepatozytenwachstumsfaktor (NGF u. HGF) bei der Entwicklung von Neuronen und der Tubulogenese („branching tubulogenesis“) epithelialer Zellen.

Projektleiter: T. Tamura-Niemann, A. Koch, Förderung: DFG

Untersuchungen zur physiologischen Funktion der MAPK-aktivierten Proteinkinase 2 (MK2): Weitere Analyse des Phänotyps der MK2-knockout-Maus und ihrer Zellen

Projektleiter: M. Gaestel, A. Kotlyarov, Förderung: SFB 566

Biologische Funktion der MAPKAP Kinasen: Aktivierung, Scaffolding und Substrat-targeting des ERK3-MK5 Signalling Moduls

Projektleiter: A. Kotlyarov und M. Gaestel; Förderung: DFG

Modulation of Signaling for the Treatment of Cancer, Diabetes and Inflammation

Projektleiter: M. Gaestel, Förderung: Europäische Gemeinschaft

Nervenzellrezeptoren clostridieller Neurotoxine

Projektleiter: T. Binz; Kollaboration: H. Bigalke, Institut für Toxikologie der MHH. Förderung: DFG

Protease/Substrat-Interaktionen clostridieller Neurotoxin L-Ketten

Projektleiter: T. Binz; Kollaboration: T. Galli, Institut Jacques Monod, Paris, F; S. Swaminathan, Brookhaven National Laboratory, Upton, USA; Förderung: Human Frontier Science Program

Untersuchung der Funktion der SNARE-Proteine im vesikulären Transport

Projektleiter: T. Binz; Kollaboration: T. Galli, Institut Jacques Monod, Paris, F; B. Davletov, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, GB; Förderung: Human Frontier Science Program

Untersuchungen zur Interferon/LPS induzierten ISG15 Konjugation

Projektleiter: Dr. R. Niedenthal, Förderung durch HILFII

Etablierung und Anwendung eines durch Ubc9-Proteinfusion gerichteten SUMOylierungs-Systems

Projektleiter: Dr. R. Niedenthal, ohne externe Förderung

Struktur und Funktion der SUMOylierung von Komponenten der MAPK-Kaskaden in Säugerzellen

Projektleiter: Dr. R. Niedenthal, Prof. M. Gaestel, ohne externe Förderung

Stabilisierung von Cytokin-mRNAs durch den p38 MAP-Kinase Signalweg: Identifizierung von beteiligten Proteinen

Projektleiter: H. Holtmann, Förderung: SFB 566

Regulation von Spleißen und Stabilität der TNF mRNA durch RNA-abhängige Signalwege: Cross-Talk zwischen PKR und p38 MAP Kinase

Projektleiter: H. Holtmann, Förderung: DFG

Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression: Stabilisierung von mRNAs durch UV-B Strahlung

Projektleiter: H. Holtmann, Förderung: HiLF

Untersuchung von Signaltransduktionswegen der Stresskinase JNK in der Differenzierung und Migration neuronaler Stammzellen

Projektleiter: K. Mielke, ohne externe Förderung

III.1 Originalpublikationen in peer-reviewed Zeitschriften

1. Agarwal R, **Binz T** and Swaminathan S. Analysis of active site residues of botulinum neurotoxin E by mutational, functional, and structural studies: Glu335Gln is an apoenzyme. *Biochemistry*. 2005;44:8291-302.
2. Agarwal R, **Binz T** and Swaminathan S. Structural analysis of botulinum neurotoxin serotype F light chain: implications on substrate binding and inhibitor design
Analysis of active site residues of botulinum neurotoxin E by mutational, functional, and structural studies: Glu335Gln is an apoenzyme. *Biochemistry*. 2005;44:11758-65.
3. An SS, Pennella CM, Gonnabathula A, Chen J, Wang N, **Gaestel M**, Hassoun PM, Fredberg JJ and Kayyali US. Hypoxia alters biophysical properties of endothelial cells via p38 MAPK- and Rho kinase-dependent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289:C521-30. Epub 2005 Apr 27.

4. **Gowrishankar G, Winzen R**, Bollig F, **Ghebremedhin B, Redich N**, Ritter B, Resch K, Kracht M and **Holtmann H**. Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by ultraviolet light. *Biol Chem*. 2005;386:1287-93.
5. Kardinal C, Dangers M, Kardinal A, **Koch A**, Brandt DT, **Tamura T** and Welte K. Tyrosine phosphorylation modulates binding preference to cyclin-dependent kinases and subcellular localization of p27Kip1 in the acute promyelocytic leukemia cell line NB4. *Blood* 2005;29:29.
6. **Koch A, Mancini A, El Bounkari O and Tamura T**. The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-2 binds to c-Met directly via tyrosine residue 1356 and involves hepatocyte growth factor (HGF)-induced lamellipodium formation, cell scattering and cell spreading. *Oncogene*. 2005;24:3436-47.
7. Li Y, Batra S, Sassano A, Majchrzak B, Levy DE, **Gaestel M**, Fish EN, Davis RJ and Plataniotis LC. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons. *J Biol Chem*. 2005;280:10001-10. Epub 2005 Jan 11.
8. Moisan J, Camateros P, Thuraisingam T, Marion D, Koohsari H, Martin P, Boghdady ML, Ding A, **Gaestel M**, Guiot MC, Martin JG and Radzioch D. TLR7 Ligand Prevents Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness and Eosinophilia in Allergic Asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent Pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;16:16.
9. Rao KN, Kumaran D, **Binz T** and Swaminathan S. Structural analysis of the catalytic domain of tetanus neurotoxin. *Toxicon*. 2005;45:929-39. Epub 2005 Apr 13.
10. Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, **Mielke K**, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T and Hanisch UK. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*. 2005;50:235-46.
11. Wang X, Khaleque MA, Zhao MJ, Zhong R, **Gaestel M** and Calderwood SK. Phosphorylation of HSF1 By MAPKAP kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J Biol Chem* 2005;8:8.
12. Weber HO, Ludwig RL, Morrison D, **Kotlyarov A, Gaestel M** and Vousden KH. HDM2 phosphorylation by MAPKAP kinase 2. *Oncogene*. 2005;24:1965-72.
13. Yelamanchili SV, Reisinger C, Becher A, **Sikorra S**, Bigalke H, **Binz T** and Ahnert-Hilger G. The C-terminal transmembrane region of synaptobrevin binds synaptophysin from adult synaptic vesicles. *Eur J Cell Biol*. 2005;84:467-75.

III.2 Übersichtsartikel in peer-reviewed Zeitschriften

Davletov B, Bajohrs M, **Binz T.** Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. Trends Neurosci 2005; 28:446-52.

III.3 Buchbeiträge

Gaestel M, editor. Molecular Chaperones in Health and Disease. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag, 2005.

Gaestel M. Molecular Chaperones in Signal Transduction. In: Gaestel M, editor. Molecular Chaperones in Health and Disease. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag, 2005, p.93-110.

III.4. Abstracts

2005 wurden 11 Abstracts publiziert.

IV. Promotionen und Diplome

Rummel, Andreas (Dr. rer. nat.): Characterisation of the Cell Binding Domain of Clostridial Neurotoxins.

Gayatri Gowrishankar (Dr. rer. nat.): Characteristics of AU-rich elements and involvement of the poly(A) tail in stress-induced mRNA stabilization

Jesko Köhnke (Dipl.-Biochem.): Etablierung und Anwendung eines durch Ubc9-Proteinfusion gerichteten SUMOylierungs-Systems

Dirk Hoffmann (Dipl.-Biochem.): Aufreinigung der Proteinkinasen ERK3 und MK5 für Kristallisationsstudien

Anette Becker (Dipl.-Biochem.): Der p38-Signalweg bei der posttranskriptionellen Regulation – Suche nach Interaktionspartnern von Tristetraprolin

Omar El Bounkari (Dipl.-Biochem.): Das neue Signalmolekül, Fms-interacting protein (FMIP), wird nach der Stimulation mit dem Nevenwachstumsfaktor NGF von p90 RSK, der ribosomalen S6 kinase, phosphoryliert und hemmt die PC12 Zelldifferenzierung

V. entfällt

VI. Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Teruko Tamura-Niemann: Gutachterin für die German-Israeli Foundation.

Thomas Binz: Gutachter für die Human Frontier Science Organization.

Matthias Gaestel: Sondergutachter der DFG, Gutachter für Deutsche Krebshilfe, EMBO, Wellcome Foundation (UK), Alliance for Cellular Signalling und diverse Zeitschriften, Koordinator des EU-Netzwerks „Modulation of Signalling for the Treatment of Cancer, Diabetes und Inflammation“.

Helmut Holtmann: Sondergutachter der DFG, Gutachter für MINERVA (Max-Planck-Gesellschaft), Medical Research Council (UK), German-Israeli Foundation, Israel Science Foundation und diverse Zeitschriften.