

Forschungsbericht 2003 - Institut für Physiologische Chemie / Biochemie

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

I. Forschungsprofil der Abteilung

Die Forschung des Instituts wird von derzeit sieben unabhängigen Arbeitsgruppen getragen. Eine weitere Arbeitsgruppe wird nach Besetzung der Juniorprofessur „Struktur und Funktion von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen“ dazukommen. 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.

Innerhalb des Instituts werden Signaltransduktionsmechanismen, welche für Krebsentstehung und Entzündung relevant sind, auf verschiedenen Ebenen untersucht. Ziel ist es, 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 *Signalings* von Rezeptortyrosinkinasen erfolgen in den Gruppen von PD Dr. Tamura und Dr. Niedenthal (C1), wobei eine thematische Ergänzung zwischen den Gruppen insbesondere hinsichtlich Rezeptoraktivierung (Tamura) und Deaktivierung (Niedenthal) besteht. Die Signalmechanismen von intrazellulären Serin/Threonin-Kinasen stehen im Mittelpunkt der Arbeiten der Gruppen Prof. Gaestel/Dr. Kotlyarov, Dr. Mielke, Prof. Holtmann und Prof. Müller. 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 posttranskriptionellen Genregulation. In den Gruppen Prof. Müller und Dr. Mielke steht die Rolle von Proteinkinasen bei Differenzierung in verschiedenen relevanten zellulären Systemen, wie z.B. 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.

Die aktive Forschungsarbeit des Instituts hat dazu geführt, dass das Institut ab 2004 mit 4 Teilprojekten in Sonderforschungsbereichen der MHH vertreten ist (Gaestel/Kotlyarov SFB566 und SFB 621, Holtmann SFB 566, Tamura SFB 566). Alle Arbeitsgruppen des Instituts haben erfolgreich Drittmittel eingeworben. Beachtenswert ist ebenfalls die maßgebliche Beteiligung an international geförderten Projekten der EU (Koordination des Research Training Netzwerks „Modulation of Signalling“, Gaestel) und des International Human Frontier Science Programms (2 Teilprojekte, Tamura und Binz).

II. Forschungsprojekte

II.1. Ein ausgewähltes Forschungsprojekt

Regulation der Expression entzündungsrelevanter Proteine durch Änderungen der mRNA-Stabilität

Unser Organismus ist vielfältigen schädlichen Einflüssen wie Verletzungen oder Infektionen ausgesetzt. Die Reaktion des Körpers äußert sich als Entzündung. In den beteiligten Zellen wird dabei durch äußere Faktoren wie der Kontakt mit Krankheitserregern die rasche und

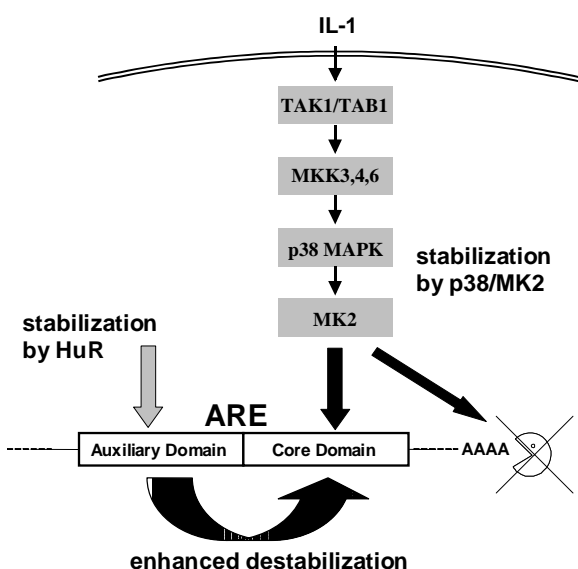
massive Synthese von Proteinen ausgelöst, die für die Abwehr- und Heilungsvorgänge benötigt werden, bei unkontrollierter Synthese aber selbst schädlich sind. Dazu gehören sogenannte Cytokine wie Interleukin 1 (IL-1) oder Tumor-Nekrose-Faktor (TNF). Diese Botenstoffe signalisieren Zellen in der Umgebung das Vorliegen einer Infektion oder Gewebeschädigung. Sie induzieren die Synthese weiterer für die Abwehr essentieller Proteine (z. B. Enzyme, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, weitere Cytokine). Wegen der pathogenetischen Bedeutung dieser Proteine sind Mechanismen, die Stärke und Dauer ihrer Produktion kontrollieren, von zentralem medizinischem Interesse.

Änderungen der Produktion von Proteinen basieren auf Änderungen der Expression ihrer Gene. Die Expression von entzündungsrelevanten Genen wird durch eine Abfolge von Ereignissen in der Zelle gesteuert, die von membranständigen Rezeptoren (z. B. für Krankheitserreger oder für Zytokine) ausgehen. Rezeptor-aktivierte intrazelluläre Signalwege, darunter die MAP-Kinasekaskaden sowie der NF-kappaB-Weg, kontrollieren die Genexpression durch Aktivierung der Boten-RNA(mRNA)-Synthese (Transkription) sowie durch Beeinflussung des weiteren Schicksals der RNA (Reifung, Transport, Translation in Protein, Abbau der RNA).

Mechanismen, die die Genexpression "post-transkriptionell" auf der Ebene der mRNA regulieren, werden in der Arbeitsgruppe vorwiegend am Modell der durch IL-1 induzierten Synthese von IL-8 untersucht, einem Zytokin aus der Gruppe der Chemokine, das für die Anlockung und Aktivierung von Neutrophilen verantwortlich ist. Die IL-8 mRNA wird nach unseren Befunden basal rasch degradiert. Das pro-entzündliche Zytokin IL-1 induziert durch Aktivierung der p38 MAP-Kinase und der "downstream" gelegenen MAPKAP-Kinase 2 (MK2) eine Stabilisierung dieser mRNA.

Als für die Regulation der Stabilität entscheidender Bereich in der IL-8 mRNA wurde eine Adenosin- und Uridin-reiche Region identifiziert. Ähnliche Regionen (AU-reiche Elemente, ARE) finden sich in den mRNAs zahlreicher Zytokine und anderer rasch induzierter Proteine. Sie sind für die kurze Halbwertszeit dieser mRNAs verantwortlich. Für einige von ihnen konnte ebenfalls eine Stabilisierung durch den p38/MK2 Signalweg gezeigt werden. So kann dieser Signalweg durch Hemmung der mRNA-Degradation ihre Menge massiv erhöhen und damit die Voraussetzung für die Synthese großer Mengen des betreffenden Proteins schaffen. Generell geht man davon aus, daß die basal rasche Degradation ARE-enthaltender mRNAs und die durch den p38/MK2-Signalweg induzierte Stabilisierung auf der Interaktion des ARE mit selektiv bindenden regulatorischen Proteinen beruht. Die Analyse der mRNA-Stabilisierung beinhaltet daher die Charakterisierung regulatorischer mRNA-Elemente, mit ihnen wechselwirkender Proteine und ihrer Funktion.

Wichtige Aufschlüsse über Struktur-Funktionsbeziehungen von AREs lieferte die genaue Charakterisierung der regulatorischen Region der IL-8 mRNA. Dazu wurden Sequenzen der



IL-8 mRNA in eine stabile mRNA eingefügt (β -Globin mRNA, $t_{1/2} > 10$ h). Die so entstandenen chimären "Reporter" mRNAs wurden in HeLa-Zellen auf ihre basale Degradationsrate und auf Stabilisierung durch Aktivierung des p38 MAP-Kinaseweges geprüft. Um Aufschlüsse über die entscheidenden Merkmale dieser Sequenzen zu erhalten, wurden Deletionen und Punktmutationen eingefügt.

Abbildung 1. Kontrolle der Stabilität von mRNAs durch funktionell unterschiedliche Domänen in AU-reichen mRNA-Elementen (ARE). Erklärung siehe Text.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine funktionell zweiteilige Struktur des IL-8 AREs: eine Kerndomäne ruft nur eine begrenzte Destabilisierung hervor, ermöglicht aber bereits eine Stabilisierung durch Aktivierung der p38/MK2 Kinasekaskade. Zur basal raschen Degradation trägt eine direkt angrenzende Hilfsdomäne wesentlich bei. Der funktionelle Vergleich mit dem ARE des Cytokins GM-CSF deutet daraufhin, daß diese Struktur ein generelles Merkmal einer bestimmten Gruppe von AREs ist.

Eine wichtige Frage betrifft die Selektivität von Stabilisierungsmechanismen. Bisher ermöglichten alle geprüften AREs und deren Mutanten, die eine Destabilisierung zeigten, immer auch eine Stabilisierung durch p38/MK2. Dagegen erfordert das mRNA-stabilisierende Protein HuR davon abgrenzbare Strukturen, die dem ARE von IL-8 gänzlich fehlen und bei den AREs von GM-CSF und c-fos in der Hilfsdomäne lokalisiert sind. Dieser Befund impliziert, daß der p38/MK2 Signalweg und HuR unabhängig voneinander mRNAs stabilisieren und sich dabei in ihrer Spezifität unterscheiden.

Proteine, die selektiv mit AREs interagieren, wurden durch Affinitätschromatographie mit immobilisierter ARE-enthaltender RNA isoliert und massenspektrometrisch identifiziert. Da die Aktivierung der Proteinkinase MK2 eine Stabilisierung ARE-enthaltender mRNAs induziert, dient die Phosphorylierung durch MK2 als ein weiteres Kriterium für die Identifizierung relevanter Proteine. Unter den von uns identifizierten selektiv an ARE-RNA bindenden Proteinen wird vor allem PABP1 durch MK2 *in vitro* phosphoryliert. PABP1 bindet allgemein im Zytoplasma an den poly(A) Schwanz von mRNAs (poly(A)-binding protein 1), könnte aber darüber hinaus nach unseren Ergebnissen eine spezielle regulatorische Funktion bei ARE-enthaltenden mRNAs ausüben. Ein Modell zur Funktion von PABP1 und anderen ARE-bindenden Proteinen ist in Abbildung 2 skizziert:

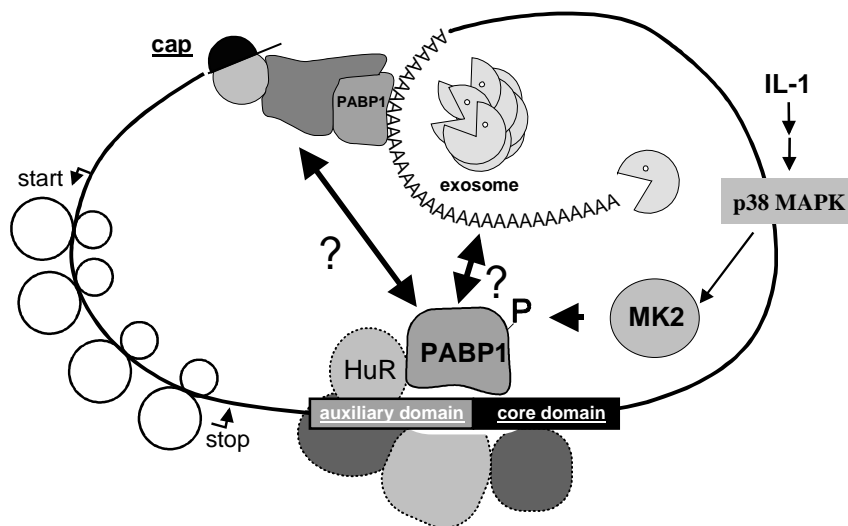


Abbildung 2.

Modell einer mRNA mit Interaktion von 5' und 3' Ende über eIF4E, eIF4G und PABP1, sowie Assoziation von Proteinen an das AU-reiche Element. Mögliche destabilisierende Interaktionen und ihre Modifikation nach Phosphorylierung von PABP1 durch MK2 sind mit Fragezeichen gekennzeichnet.

Generell kann eine zytoplasmatische mRNA eine geschlossene Struktur bilden, bei der das 5'-Ende und der poly(A)-Schwanz über eine Protein-Brücke unter Beteiligung von PABP1 interagieren. Diese Struktur kann die Enden der mRNA vor degradierenden Enzymen schützen. Am ARE bindendes PABP1 und weitere dort befindliche Proteine könnten diese stabilisierende Interaktion stören. Diese Störfunktion würde durch den p38/MK2 Signalweg aufgehoben.

Gestützt wird dieses Modell ferner durch eigene Beobachtungen zur Rolle des poly(A)-Schwanzes bei der regulatorischen Funktion von AREs. Es zeigte sich, daß der p38/MK2 Signalweg bereits den Abbau des poly(A)-Schwanzes als ersten Schritt der mRNA Degradation verhindert. Ergänzend dazu ist in einer mRNA, die in der Zelle durch eine entsprechende Manipulation ohne poly(A)-Schwanz hergestellt wird, die Regulation durch

das ARE aufgehoben: weder eine Destabilisierung noch eine durch p38/MK2 induzierte Stabilisierung sind feststellbar.

Weitere Analysen zu Struktur und Funktion der am RNA-Abbau beteiligten RNA-Protein-Komplexe und ihrer Kontrolle durch externe Stimuli sollen die Kenntnisse dieser grundlegenden Prozesse verbessern. Damit sollen Faktoren erfaßt werden, die die Stärke und Dauer der Synthese von an Entzündungsreaktionen beteiligten Proteinen bestimmen. Diese Informationen sind wichtig für das Verständnis der Pathogenese von akuten und chronischen Entzündungen und können zur Identifizierung möglicher neuer therapeutischer Zielmoleküle führen.

Verantwortlicher Arbeitsgruppenleiter: Helmut Holtmann; Mitarbeiter: R. Winzen, N. Redich
Förderung: DFG - SFB 566

II.2. Weitere Forschungsprojekte

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

T. Tamura-Niemann, A. Koch, DFG

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

T. Tamura-Niemann, A. Mancini, DFG - SFB 566

Untersuchungen der p75 Neurotrophin-Rezeptor/SUMO-1-Interaktion und ihrer Funktion in der p75^{NTR}-Signaltransduktion

R. Niedenthal, V. Gudi, Z. Czentnar und A. Jakobs, DFG

Untersuchungen zur Interferon/LPS induzierten ISG15 Konjugation

R. Niedenthal, J. Köhnke und A. Jakobs, ohne externe Förderung

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

Mitarbeiter: M. Gaestel, A. Kotlyarov, K. Schewe, K. Laaß, M. Schubert, S. Feldhege, D. Krone, T. Iakovleva; Förderung DFG – SFB 566

Rolle der stress-aktivierten Proteinkinase MK2 und MK5 bei entzündlichen Darmerkrankungen der Maus

Mitarbeiter: M. Gaestel, A. Kotlyarov; C. Prohl, Förderung DFG - SFB 621

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

Mitarbeiter: M. Gaestel, A. Kotlyarov, E. Hitti, N. Ronkina; Förderung: Europäische Gemeinschaft

Weitere Analyse der physiologischen Funktion der Proteinkinase MK5/PRAK

Mitarbeiter: A. Kotlyarov, S. Kant, S. Feldhege, M. Gaestel; Förderung DFG

Kontrolle der Synthese von Interleukin 6 durch posttranskriptionelle Mechanismen: Analyse Signal-induzierter Änderungen der mRNA-Stabilität

H. Holtmann, R. Winzen, G. Gowrishankar, M. Wittig, Förderung: DFG

Regulation von Spleißen und Stabilität der TNF mRNA durch RNA-abhängige Signalwege:
Cross-Talk zwischen PKR und p38 MAP Kinase
H. Holtmann, M. Enge, G. Gowrishankar, Förderung: DFG

Die Rolle der p38 Stresskinasen für die Proliferation und Differenzierung von neuronalen
Stammzellen
K. Mielke, Förderung: MHH HiLF

Retinoid-induzierte Signalkaskaden bei Säugerzellen in Kultur
W. Müller, S. Graß, Kooperation mit R. Scheibe, J. Meißner, Abteilung Physiologie der
MHH. Förderung: MHH HiLF

Penetration clostridieller Neurotoxine in Nervenzellen
T. Binz, T. Henke, S. Mahrhold, A. Rummel; Kollaboration: H. Bigalke, Institut für
Toxikologie der MHH, J. Alves, Institut für Biophysikalische Chemie der MHH.
Förderung: DFG

Protease/Substrat-Interaktionen clostridieller Neurotoxin L-Ketten
T. Binz, T. Henke, S. Sikorra; Kollaboration: T. Galli, Institut du Fer-à-Moulin, Paris, F;.
Förderung: Human Frontier Science Program

Untersuchung der Funktion der SNARE-Proteine im vesikulären Transport
T. Binz, T. Henke, T. Karnath; Kollaboration: E. Neher, J. B. Sørensen, Max-Planck-Institut
für Biophysikalische Chemie, Göttingen; T. Galli, Institut du Fer-à-Moulin, Paris, F; B.
Davletov, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, GB;
Förderung: Human Frontier Science Program.

III. Publikationen

Originalpublikationen

Bollig F, **Winzen R**, **Gaestel M**, Kostka S, Resch K, **Holtmann H**. Affinity purification of
ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-
induced mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301:665-70.

Kämpchen K, **Mielke K**, Utermark T, Langmesser S and Hanemann CO. Upregulation of the
Rac1/JNK signaling pathway in primary human schwannoma cells. *Hum Mol Genet* 2003;
12:1211-1221.

Li Y., A. Sassano, B. Majchrzak, D.K. Deb, D.E. Levy, **M. Gaestel**, A.R. Nebreda, E.N. Fish
and L.C. Platanias (2004) Role of p38 alfa map kinase in type I interferon signalling.
J. Biol. Chem., 279, 970-979; online publication date, October 24, 2003.

Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, **Binz T**, Rettig J, Neher E, Sørensen, J B. Regulation of
releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25.
Neuron 41: 417.

Rickman C, Meunier F A, **Binz T**, Davletov B. High affinity interaction of syntaxin and
SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *J Biol Chem* 2004;
279: 644-651; online publication date, October 3, 2003.

Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, Binz T. Two carbohydrate binding sites in the Hcc-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol* 2003; 326: 835-847.

Rummel A, Mahrhold S, Bigalke H, Binz T. The Hcc-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol* 2004; 51: 631-643; online publication date, December 15, 2003.

Shi, Y., A. Kotlyarov, K. Laaß, A. D. Gruber, E. Butt, K. Marcus, H.E. Meyer, A. Friedrich, H.-D. Volk and M. Gaestel (2003) Elimination of Protein Kinase MK5/PRAK Activity by Targeted Homologous Recombination. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7732-7741.

Stromer, T, M. Ehrnsperger, **M. Gaestel** and J. Buchner (2003) Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 18015-18021.

Bücher, Buchbeiträge, Lehrbücher

Kracht M, **Holtmann H.** Cytokines. In: Offermanns S, Rosenthal W, Editors. *Encyclopedic references to molecular pharmacology.* Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2003. p. 286-90.

Tamura T, and Koch A. Application of green fluorescent protein. *Gene Technology Hand Book* ed. M. Muramatsu, T. Yamamoto Yodo-sha Press. pp227-230; 2003

Abstracts

Es wurden 15 Abstracts publiziert.

IV. Habilitationen und Promotionen

Zoltan Czernar (Dipl.-Biochem.): Regulation der Tyrosin-Phosphorylierung des p75 Neurotrophin Rezeptors

Brigitte Haas (Dipl.-Biochem.): Charakterisierung von glialen Calciumwellen im akuten Hirnschnitt.

Thomas Orth (Dipl.-Biochem.): Untersuchungen zur Tyrosinphosphorylierungs-abhängigen Interaktion und Ubiquitinierung von p75^{NTR}

Kristine Schauer (Dipl.-Biochem.): Genetic and Biochemical Study of *Plasmodium gerhei* lecithin:cholesterol acyltransferase

Ulrike Wedemeyer (Dipl.-Biochem.): Untersuchungen der prolinreichen Domäne von MAPKAP Kinase 2. Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen und Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation

V. entfällt

VI. Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Matthias Gaestel: Sondergutachter der DFG, Gutachter für Deutsche Krebshilfe, EMBO, Wellcome Foundation (UK) 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.

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