

Forschungsbericht 2004

Abteilungsname: Physiologische Chemie / Biochemie

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

I. Forschungsprofil der Abteilung

Innerhalb des Instituts werden Signaltransduktionsmechanismen, welche für Krebsentstehung und Entzündung 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 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 post-transkriptionellen 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.

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.1. Ein ausgewähltes Forschungsprojekt

Identifizierung und Charakterisierung des ERK3-MK5-Signalmoduls

Die Signalübertragung *downstream* zu den MAP-Kinasen (MAPKs) wird bisher nur unvollständig verstanden. Eine durch andere Arbeitsgruppen vorgeschlagene Aktivierung der MAPK-aktivierten Proteinkinase 5 (MK5, MAPKAPK 5 oder PRAK) durch die p38 MAPK wurde durch Generierung und Analyse von MK5-defizienten Mäusen in unserer Arbeitsgruppe in Frage gestellt (Shi et al., 2003). Deshalb wurde nach anderen Aktivatoren der Proteinkinase MK5 gesucht. Im Rahmen eines Y2H-screenings konnte die atypische MAPK ERK3 als spezifischer Wechselwirkungspartner für MK5 ermittelt werden (Abb.1A). Interessanterweise bedingt Überexpression von ERK3 in lebenden Säugerzellen eine Translokation von normalerweise im Kern befindlicher MK5 in das Zytoplasma. Diese Translokation ist für MK5 spezifisch und erfolgt nicht für die verwandte, p38 MAPK-aktivierte Proteinkinase MK2 (Abb. 1 B).

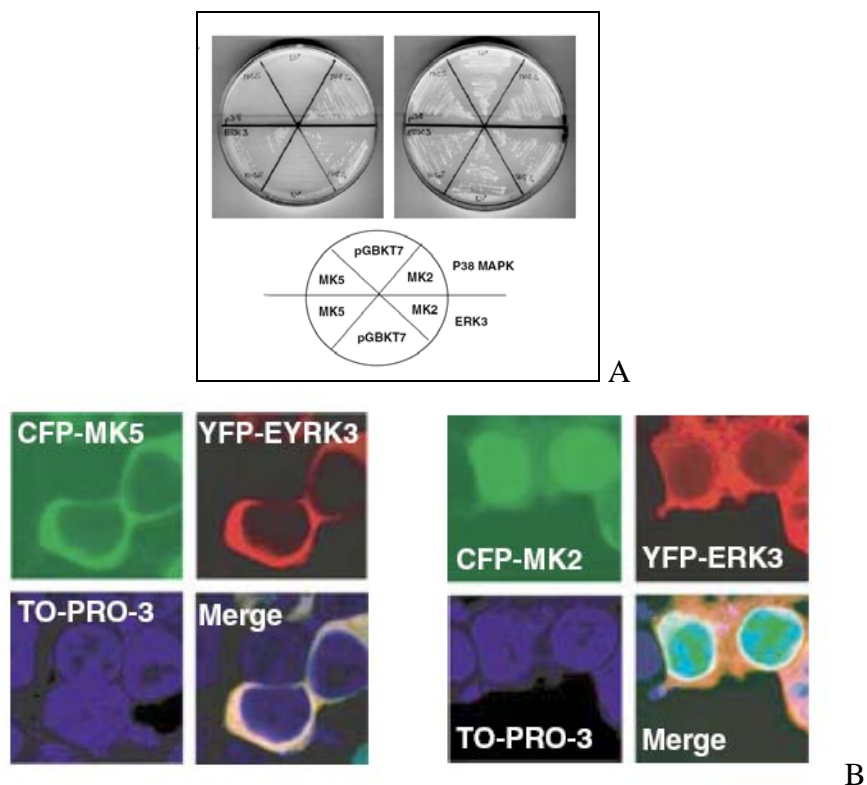


Abb. 1: Funktionell relevante Wechselwirkung zwischen MK5 und ERK3. A) Spezifische Interaktion von MK5 mit ERK3 aber nicht mit p38 MAPK im Y2H-System. Als Kontrolle fungiert MK2, welche sehr stark mit p38 MAPK und schwächer mit ERK3 wechselwirkt. B) Subzelluläre Lokalisation von CFP-Fusionen von MK5 oder MK2 und YFP-ERK3-Fusionsproteinen. Normalerweise im Kern lokalisierte CFP-MK5 wird bei Koexpression von YFP-ERK3 ins Zytoplasma transloziert (linkes Panel). CFP-MK2 dagegen verbleibt auch bei Koexpression von YFP-ERK3 im Zellkern (rechtes Panel).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Koexpression von ERK3 und Translokation von MK5 zu einer deutlichen Aktivierung der katalytischen Aktivität von MK5 führen, welche keiner zusätzlichen Stresstimulation unterliegt und nicht durch Inhibitoren der p38 MAPK unterdrückt werden kann (Schumacher et al., 2004). Damit handelt es sich hier offensichtlich um ein p38 MAPK unabhängiges Signalmodul. Von ERK3 war bereits bekannt, dass dieses Protein wahrscheinlich nicht durch Phosphorylierung sondern durch veränderte Stabilität und Abbau entwicklungs- und proliferationspezifisch reguliert wird (Coulombe et al., 2003). Es liegt deshalb nahe, dass die ERK3-abhängige Aktivierung von MK5 ebenfalls entwicklungs- und proliferationsabhängig erfolgt. Der inkomplette embryonal-lethale Phänotyp der MK5 knockout-Maus unterstützt diese Vermutung.

Unerwarteter Weise ist für die Aktivierung der MK5 durch ERK3 keine katalytische Aktivität von ERK3 notwendig. Es scheint also so, dass einzig und allein die zytoplasmatische Expression von ERK3 und deren MK5-Bindung als sogenanntes *Scaffolding*-protein eine Aktivierung von MK5 bedingt (vgl. Abb.2).

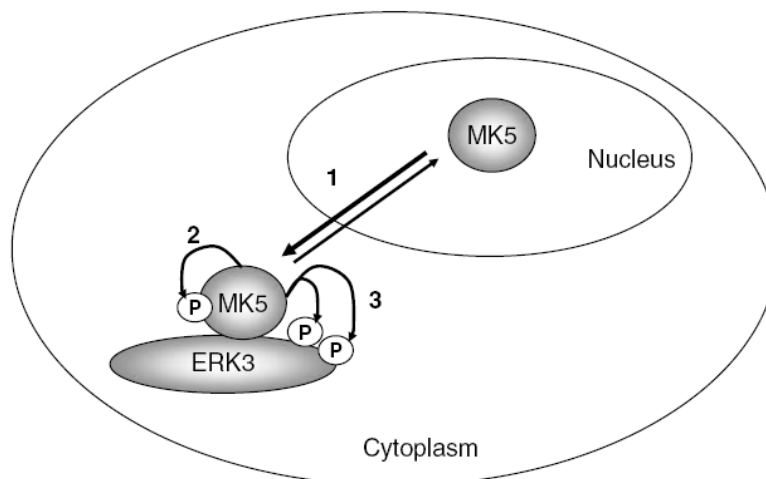


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von MK5. Durch Bindung an zytoplasmatisch lokalisierte ERK3 wird MK5 aus dem Zellkern transloziert (1). Durch Bindung an ERK3 und möglicherweise weitere Komponenten des Zytoplasmas wird MK5 zur Autophosphorylierung stimuliert und damit katalytisch aktiviert (2). Aktive MK5 phosphoryliert anschließend ERK3 und möglicherweise weitere physiologisch-relevante Substrate (3).

Dieser Aktivierungsmechanismus ähnelt dem der mit dem Peutz-Jeghers Syndrom assoziierten Proteinkinase LKB1, welche durch Bindung an das katalytisch-inaktive zytoplasmatische Protein STRAD stimuliert wird und zur Herausbildung von Zellpolarität beiträgt (Baas et al., 2004). Möglicherweise handelt es sich um einen allgemeinen Regulationsmechanismus, der von der Zelle dazu genutzt wird, um bestimmte Proteinkinasen durch spezifische Bindung an Pseudokinasen und entsprechender Translokation längerfristig zu aktivieren. Dieser Mechanismus wäre unterschiedlich zur kurzfristigen Aktivierung von Signalwegen durch

reversible Phosphorylierung und würde den mehr als 50 katalytisch inaktiven Pseudokinasen des menschlichen Kinoms zumindest teilweise eine generelle funktionelle Bedeutung zuordnen.

Projekttitle: Biologische Funktion der MAPKAP Kinasen: Aktivierung, Scaffolding und Substrattargetting des ERK3-MK5-Signalmoduls.

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

Literatur:

Baas, A. F., Kuipers, J., van der Wel, N. N., Battle, E., Koerten, H. K., Peters, P. J., and Clevers, H. C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457-466.

Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S. (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 4542-4558.

Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A. D., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2004). Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo J* 23, 4770-4779. Epub 2004 Nov 4711.

Shi, Y., Kotlyarov, A., Laaß, K., Gruber, A. D., Butt, E., Marcus, K., Meyer, H. E., Friedrich, A., Volk, H. D., and Gaestel, M. (2003). Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* 23, 7732-7741.

II. 2. Weitere Forschungsprojekte

Titel: 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

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

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

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

Projektleiter: Dr. R. Niedenthal, Förderung: DFG

Titel: Untersuchungen zur Interferon/LPS induzierten ISG15 Konjugation

Projektleiter: Dr. R. Niedenthal, Förderung durch HILFII

Titel: Untersuchungen zur Funktion der SUMOylierung und ISGylierung von STAT1.

Dr. R. Niedenthal und Jesko Köhnke, ohne externe Förderung.

Titel: 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

Titel: Rolle der stress-aktivierten Proteinkinasen MK2 und MK5 bei entzündlichen Darmerkrankungen der Maus

Projektleiter: M. Gaestel, A. Kotlyarov, Förderung: SFB 621

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

Projektleiter: M. Gaestel, Förderung: Europäische Gemeinschaft

Titel: Weitere Analyse der physiologischen Funktion der Proteinkinase MK5/PRAK

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

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

Projektleiter: H. Holtmann, Förderung: SFB 566

Titel: 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

Titel: Die Analyse der Signaltransduktionswege der MAP-Kinasen (ERK, p38, JNK) in der Differenzierung und Apoptose primärer neuronaler Stammzellen im Zentralnervensystem von Säugetieren.

Projektleiterin Dr. K. Mielke, Förderung durch die DFG beantragt

Titel: Nervenzellrezeptoren clostridieller Neurotoxine

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

Titel: Protease/Substrat-Interaktionen clostridieller Neurotoxin L-Ketten

Projektleiter: T. Binz; Kollaboration: T. Galli, Institut du Fer-à-Moulin, Paris, F; S. Swaminathan, Brookhaven National Laboratory, Upton, USA; Förderung: Human Frontier Science Program.

Titel: Untersuchung der Funktion der SNARE-Proteine im vesikulären Transport

Projektleiter: T. Binz; Kollaboration: T. Galli, Institut du Fer-à-Moulin, Paris, F; B. Davletov, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, GB; Förderung: Human Frontier Science Program.

Originalpublikationen in peer-reviewed Zeitschriften

Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A.D., Kotlyarov, A. and Gaestel, M. (2004) Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J*, **23**, 4770-4779.

Winzen, R., Gowrishankar, G., Bollig, F., Redich, N., Resch, K. and Holtmann, H. (2004) Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR. *Mol Cell Biol*, **24**, 4835-4847.

Mancini, A., Koch, A., Whetton, A.D. and Tamura, T. (2004) The M-CSF receptor substrate and interacting protein FMIP is governed in its subcellular localization by protein kinase C-mediated phosphorylation, and thereby potentiates M-CSF-mediated differentiation. *Oncogene*, **23**, 6581-6589.

Ohrt, T., Mancini, A., Tamura, T. and Niedenthal, R. (2004) c-Cbl binds to tyrosine-phosphorylated neurotrophin receptor p75 and induces its ubiquitination. *Cell Signal*, **16**, 1291-1298.

Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H. and Binz, T. (2004a) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem*, **279**, 30865-30870.

Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H. and Binz, T. (2004b) The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol*, **51**, 631-643.

Bade, S., Rummel, A., Reisinger, C., Karnath, T., Ahnert-Hilger, G., Bigalke, H. and Binz, T. (2004) Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *J Neurochem*, **91**, 1461-1472.

Wu, Y., Hannigan, M.O., **Kotlyarov, A., Gaestel, M.**, Wu, D. and Huang, C.K. (2004) A requirement of MAPKAPK2 in the uropod localization of PTEN during FMLP-induced

neutrophil chemotaxis.

Biochem Biophys Res Commun, **316**, 666-672.

Bajohrs, M., Rickman, C., **Binz, T.** and Davletov, B. (2004) A molecular basis underlying differences in the toxicity of botulinum serotypes A and E.

EMBO Rep, **5**, 1090-1095.

Nagy, G., Reim, K., **Matti, U.**, Brose, N., **Binz, T.**, Rettig, J., Neher, E. and Sorensen, J.B. (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25.

Neuron, **41**, 417-429.

An, S.S., Fabry, B., Mellema, M., Bursac, P., Gerthoffer, W.T., Kayyali, U.S., **Gaestel, M.**, Shore, S.A. and Fredberg, J.J. (2004) Role of heat shock protein 27 in cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell.

J Appl Physiol, **96**, 1701-1713.

Agarwal, R., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D., **Binz, T.** and Swaminathan, S. (2004) Structural analysis of botulinum neurotoxin type E catalytic domain and its mutant Glu212-->Gln reveals the pivotal role of the Glu212 carboxylate in the catalytic pathway.

Biochemistry, **43**, 6637-6644.

Li, Y., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D.K., Levy, D.E., **Gaestel, M.**, Nebreda, A.R., Fish, E.N. and Plataniias, L.C. (2004) Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling.

J Biol Chem, **279**, 970-979.

Rickman, C., Meunier, F.A., **Binz, T.** and Davletov, B. (2004) High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E.

J Biol Chem, **279**, 644-651.

Sawitzki, B., Kieselbach, B., Fisser, M., Meisel, C., Vogt, K., **Gaestel, M.**, Lehmann, M., Risch, K., Grutz, G. and Volk, H.D. (2004) IFN-gamma regulation in anti-CD4 antibody-induced T cell unresponsiveness.

J Am Soc Nephrol, **15**, 695-703.

Yannoni, Y.M., **Gaestel, M.** and Lin, L.L. (2004) P66(ShcA) interacts with MAPKAP kinase 2 and regulates its activity.

FEBS Lett, **564**, 205-211.

Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, **Mielke K**, Brecht S, Lucius R, Hanisch U-K, Herdegen T. (2004) c-Jun N-terminal kinases mediate the inflammatory activation of microglia.

Glia, in press.

III.3. Buchbeiträge

Kracht M, Holtmann H. Cytokines. In: Ganten D, Ruckpaul K, editors. Encyclopedic references Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; in press.

III.4. Abstracts

2004 wurden 11 Abstracts publiziert.

IV. Promotionen

Beniam Ghebremedhin (Dr. med.): "Post-transkriptionelle Modulation der Genexpression von Cytokinen durch UV-Strahlung"

Frank Bollig (Dr. rer. nat.): "Analysis of mechanisms involved in mRNA stabilization induced by inflammatory stimuli"

Stefan Mahrhold (Dipl.-Biochem.): „Untersuchung zur Funktion der H_{CC}-Domäne clostridieller Neurotoxine beim intrazellulären Transport“

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.