

**Die Rolle des “Protein Associated with Myc” (PAM) bei der
Regulation des “mammalian Target Of Rapamycin” (mTOR) Signalweges**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main



von
Christian Mäurer
aus Andernach

Frankfurt am Main 2007

(D30)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan:	Prof. Dr. Harald Schwalbe
Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Gerd Geisslinger Prof. Dr. Rolf Marschalek Prof. Dr. Theo Dingermann Prof. Dr. Robert Tampé
Datum der Disputation:	17.Dezember 2007

meiner Familie

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Struktur von PAM und seine physiologische Rolle	1
1.1.1. Regulation der cAMP Signaltransduktion durch PAM	3
1.2. Der TSC2 / mTOR Weg	6
1.2.1. mTOR	6
1.2.2. Regulierung der mTOR Aktivität durch Rheb und TSC2	8
1.3. Ubiquitinierung als regulatorischer Mechanismus	10
1.3.1. PAM als potentielle Ubiquitinligase	10
1.3.2. Mechanismus der Ubiquitinierung	10
1.3.3. Spezifität der Ubiquitinierung	13
1.3.4. RING Finger E3 Ligasen	13
1.4. Zielsetzung der Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Chemikalien	16
2.2. Puffer und Lösungen	19
2.3. Molekularbiologische Methoden	21
2.3.1. Plasmidisolierung	21
2.3.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	21
2.3.3. Agarose Gelelektrophorese	22
2.3.4. Ligation von DNA Fragmenten	22
2.3.5. Herstellung kompetenter E.coli Bakterien	22
2.3.6. Transformation von E.coli Bakterien	22
2.3.7. Klonierung des C-Terminus' von PAM	23
2.3.8. Klonierung der RCC1-Domäne	23
2.4. Zellbiologische Methoden	23
2.4.1. Kultivierung von Zelllinien	23
2.4.2. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	24
2.4.3. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	24
2.4.4. Immunzytochemie	25
2.5. Proteinbiochemische Methoden	25
2.5.1. Herstellung von Proteinlysaten	25
2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.5.3. Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.5.4. Coomassie Färbung von Proteingelen	26
2.6. Immunologische Methoden	26
2.6.1. Immunoblot-Analyse (Western Blot)	26
2.6.2. Immunopräzipitation	27
2.6.3. Proteintransfektion mit BioPorter	28
2.7. Proteinexpression und Aufreinigung	28
2.7.1. Expression rekombinanter Proteine in E.coli	28
2.7.2. Affinitätsaufreinigung von Histidin-Fusionsproteinen	29

Inhaltsverzeichnis

2.7.3.	Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen	29
2.7.4.	Aufreinigung von PAM aus HeLa Zellen mittels FPLC	30
2.8.	Biochemische Methoden	31
2.8.1.	Zellbasierte Versuche	31
2.8.2.	In vitro Ubiquitinierung von Proteinen	32
2.8.3.	Stationärer (steady state) GTPase Versuch	32
2.8.4.	GTP γ - ³⁵ S Bindung an Rheb	33
2.8.5.	[³ H]GDP Dissoziation von Rheb	33
2.9.	Nozizeptive Tiermodelle	34
2.10.	Statistik	34
3.	ERGEBNISSE	35
3.1.	PAM ist eine E3-Ubiquitinligase	35
3.1.1.	Aufgereinigtes PAM besitzt E2 Subtyp spezifische Auto-Ubiquitinierungsaktivität	35
3.1.2.	Die RING Finger Region ist die katalytisch aktive Domäne	37
3.2.	PAM ist eine Ubiquitinligase für TSC2	39
3.2.1.	PAM und TSC2 bilden einen Komplex in HeLa Zellen	39
3.2.2.	PAM kann TSC2 ubiquitinieren	40
3.3.	Der TSC2 Status wird nicht durch S1P beeinflusst	43
3.3.1.	S1P führt nicht zum Abbau oder Phosphorylierung von TSC2	43
3.3.2.	S1P verhindert die PAM-TSC2 Interaktion nicht	45
3.4.	S1P aktiviert den mTOR Signalweg über PAM	47
3.4.1.	S1P führt zur Phosphorylierung von mTOR an Serin 2448	47
3.4.2.	Die Phosphorylierung von mTOR führt zu dessen Aktivierung	49
3.4.3.	Die Phosphorylierung von mTOR nach S1P ist ERK AKT und PI3K unabhängig	50
3.4.4.	Inhibitoren der S1P vermittelten PAM Aktivierung verhindern auch eine mTOR Aktivierung	52
3.4.5.	Erhöhung der intrazellulären PAM Konzentration führt zu einer verstärkten mTOR Phosphorylierung nach S1P Stimulation	53
3.5.	PAM übt GEF (Guanine-Nucleotide-Exchange-Faktor) Aktivität auf Rheb aus	54
3.5.1.	PAM verhindert nicht die TSC2 GAP Aktivität auf Rheb	54
3.5.2.	PAM erhöht den Nukleotid Austausch an Rheb	56
3.5.3.	Die Phosphorylierung von mTOR nach S1P ist TSC2 unabhängig	59
3.5.4.	Rheb ist in den S1P-mTOR Signalweg involviert	60
3.6.	Rapamycin erhöht tendenziell die nozizeptiven Reaktionen im „Formalin-Test“	62
3.6.1.	Hot Plate Test	63
3.6.2.	Formalin Test	64
4.	DISKUSSION	65
4.1.	PAM als Ubiquitinligase	65
4.2.	S1P vermittelte mTOR Aktivierung	68
4.3.	PAM als potentieller GEF von Rheb	70

Inhaltsverzeichnis

4.4.	Duale Rolle von PAM als Ubiquitinligase und Guanin-Nukleotid Austauschfaktor	72
4.5.	Ausblick	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
8.	PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	82
9.	LITERATURVERZEICHNIS	83
10.	LEBENS LAUF	94
11.	DANKSAGUNG	95

1. Einleitung

Das humane Genom besitzt circa 25000 proteincodierende Gene, anhand derer durch verschiedene Prozesse (RNA-Splicing, alternativer Translationsbeginn) über 100000 Proteine gebildet werden ¹. Die Aufschlüsselung der Funktionsweise dieser Proteine kann zu einem besseren Verständnis von Signaltransduktionswegen führen oder gar völlig neue Mechanismen offen legen. Oftmals wird die Bedeutung eines Proteins erst durch einen auffälligen Phänotyp offensichtlich, der durch eine Mutation des entsprechenden Gens verursacht wird. Ein Beispiel für einen solchen Fall ist das Protein **Protein Associated with Myc (PAM)**, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

1.1. Die Struktur von PAM und seine physiologische Rolle

PAM wurde ursprünglich als Interaktionspartner des Proto-Onkogens Myc identifiziert ². Mit seinem postulierten Molekulargewicht von 510 kDa übersteigt es die durchschnittliche Proteingröße um ein Vielfaches und zählt zu den größten Proteinen des Säugetiergenoms. Aufgrund seiner enormen Größe ist eine Wechselwirkung mit einer Vielzahl anderer Proteine wahrscheinlich. Bislang wurden für humanes PAM jedoch neben dem Myc Protein nur Interaktionen mit dem Tumorsuppressor TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2 vormals Tuberin) ³ und verschiedenen Isoformen der Adenylyl-Zyklase beschrieben ^{4, 5}. Lediglich für Letztere konnte eine Relevanz der Proteinwechselwirkung nachgewiesen werden (siehe 1.1.1) ⁶, für TSC2 und Myc ist noch unklar, ob und wenn ja welche biochemischen oder physiologischen Konsequenzen diese Protein-Protein Wechselwirkung hat. Die PAM-Aminosäuresequenz weist einige hochkonservierte Bereiche auf. Dabei handelt es sich um Domänen, deren enzymatische Aktivität bereits beschrieben wurde. Besonders stark konserviert sind die so genannte RCC1-ähnliche Domäne (**R**egulator of **C**hromatine **C**ondensation **1**) und die RING (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene) Finger.

Die RCC1-ähnliche Domäne dient häufig zur Ausbildung einer Interaktion mit anderen Proteinen ². Außerdem stellt sie in einigen Guanin-Nukleotid Austausch Faktoren (**G**uaninenucleotide **E**xchange **F**actor - **GEF**) den enzymatisch aktiven Teil dar ⁷⁻¹⁰. GEF's

katalysieren den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an kleinen G-Proteinen (Guanin Nukleotid bindende Proteine). Dieser Wechsel geht mit einer Konformationsänderung der G-Proteine einher, die in diesem aktivierten Zustand mit ihrem Zielprotein interagieren können ¹¹.

Die RING-Struktur, auch als RING Finger bezeichnet, ist die katalytisch aktive Domäne in E3-RING Ubiquitin Ligasen ¹²⁻¹⁴. Diese Enzyme katalysieren den letzten Schritt einer Ubiquitinierung von Proteinen, die daran anschließend proteasomal degradiert werden (siehe 1.3). Die Ähnlichkeit von PAM zu Proteinen dieser beiden Enzymklassen führte zu der Spekulation, dass es Rolle als GEF oder als Ubiquitinligase ausübt ^{3, 15-19}.

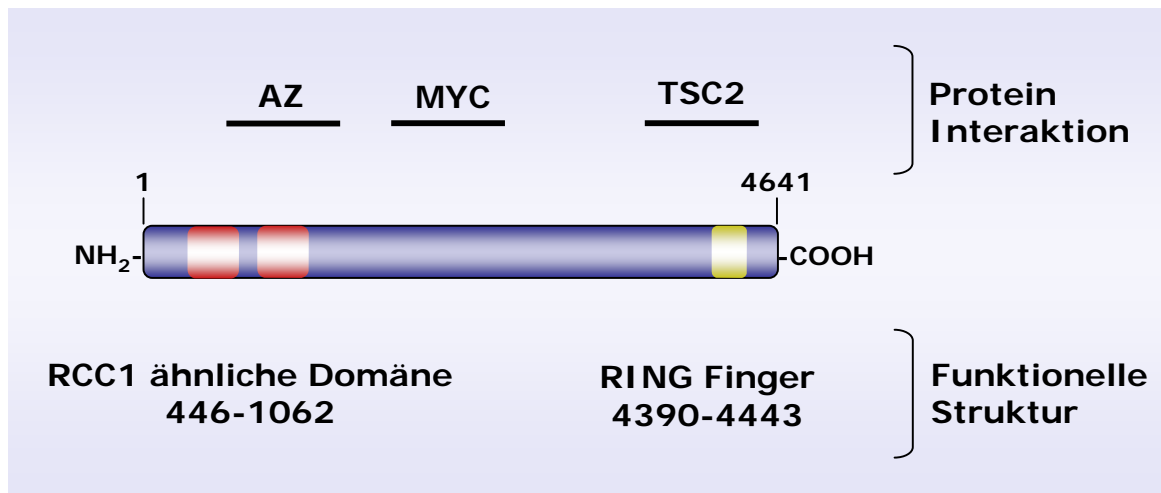


Abbildung 1-1 Schematische Struktur von PAM

Bekannte Bindungsregionen für Interaktionspartner von PAM (Adenylyl-Zyklase - AZ, MYC und TSC2) sowie Bereiche mit konservierten Proteindomänen. Bei diesen Regionen handelt es sich um Strukturen, für die eine enzymatische Aktivität diskutiert wird.

Eine Expression der PAM mRNA lässt sich in nahezu allen Zellen des adulten Organismus nachweisen. Auffällig hohe die Expressionsraten lassen sich im Rückenmark, Thymus und Gehirn detektieren ^{2, 20, 21}. In einigen Geweben werden, in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums, verschiedene Spleißvarianten expremiert, die sich in ihrer Affinität zu Bindungspartnern wie beispielsweise MYC deutlich unterscheiden ^{4, 21, 22}. Es ist daher denkbar, dass PAM in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Funktionen übernehmen kann. Zudem zeigen sich bei einem Vergleich des Expressionsmusters von embryonalem und adultem Gewebe deutliche Unterschiede. In Neuronen des Rückenmarks kommt es

postnatal zu einer Verminderung der PAM-Expression, während im Gehirn ein starker Anstieg detektierbar ist ²¹. Diese Korrelation von gesteigerter Gen Transkription mit den Orten, an denen eine verstärkte Synapsen-Bildung stattfindet, deutet auf eine wichtige Rolle von PAM bei diesem Vorgang hin. Durch Untersuchungen an PAM-defizienten Organismen konnte die These eines Einflusses auf das neuronale Wachstum bzw. die Synaptogenese gestärkt werden. In den Neuronen von *D. melanogaster* bzw. *C. elegans* resultiert ein Knock-out der entsprechenden PAM-Orthologe in einem gesteigerten Längenwachstum und verstärkter Dendritenverzweigung ²³⁻²⁶. Dieses abnorme Wachstum geht mit einer morphologischen Veränderung und eingeschränkter Funktionalität der ausgebildeten Synapsen einher ^{15, 17}. In Säugern sind bislang noch keine PAM Knock-out Tiere beschrieben. Eine chromosomale Deletion, die auch das PAM Gen beinhaltet, hat jedoch in den davon betroffenen Mäusen einen postnatal-letal wirkenden Effekt ²⁷. Diesem liegt die Bildung funktionsunfähiger Synapsen und eine fehlerhafte Innervierung der Lunge zu Grunde. Die weitergehende Charakterisierung physiologischer Auswirkungen einer PAM Defizienz wird aber erst mit der Generierung von vitalen, konditionellen PAM Knock-out Tieren möglich sein.

PAM reguliert zudem direkt oder indirekt verschiedene zellphysiologische Vorgänge. Im Zebrafisch führt eine Mutagenese des entsprechenden PAM Orthologs zu einer Störung des Pteridin Stoffwechsels. Eine fehlende Pigmentierung von Retikulozyten und eine gestörte Tetrahydrobiopterin (BH4) Synthese in neuronalen Vorläuferzellen sind die direkt nachweisbaren physiologischen Konsequenzen ²⁸. Im Rückenmark von Ratten kommt es als Reaktion auf Schmerzreize oder entzündliche Prozesse zu einer Steigerung der PAM mRNA Expression in für die Schmerzverarbeitung relevanten Neuronen ²⁰. Eine Verminderung dieser Expression führt zu einer Steigerung des nozizeptiven Verhaltens und deutet somit auf anti-nozizeptive Eigenschaften von PAM hin.

1.1.1. Regulation der cAMP Signaltransduktion durch PAM

Um die verschiedenen PAM-abhängigen Effekte in den unterschiedlichen Organismen verstehen zu können, ist die Aufklärung der biochemischen Wirkungsweisen nötig. Als bislang einziger Mechanismus ist eine PAM-abhängige Hemmung der cAMP Synthese

beschrieben worden ^{4-6, 20}. Dieser Effekt, der sowohl in HeLa Zellen als auch im Rückenmark und Spinalganglien von Mäusen und Ratten nachweisbar ist, beruht auf einer direkten Interaktion der RCC1-ähnlichen Domäne von PAM mit dem katalytischen Bereich der Adenylyl-Zyklase. Gleichzeitig bietet er auch eine Erklärung für den pronozizeptiven Effekt eines temporären PAM Knock-downs in schmerzphysiologischen Vorgängen. So sind cAMP-abhängige Signalwege in einer Vielzahl von zellulären und physiologischen Prozessen von Bedeutung, wie etwa bei der Modulation der synaptischen Aktivität. Eine Aktivierung der Adenylyl-Zyklase führt über cAMP und Proteinkinase A (PKA) zu einer höheren Erregbarkeit bzw. einer Verminderung der Reizschwelle von Neuronen ^{29, 30}. In schmerzrelevanten Nervenzellen resultiert eine Erhöhung der cAMP Konzentration, die durch verschiedene Mediatoren wie Prostaglandin E2 oder Glutamat vermittelt werden kann, in einer verstärkten Schmerzempfindung und Ausbildung einer Hyperalgesie ³¹. Dagegen hat eine Hemmung der cAMP Synthese, beispielsweise durch μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten, einen analgetischen Effekt zur Folge ^{32, 33}. Für eine PAM-abhängige Adenylyl-Zyklase Inhibition ist also ebenfalls ein die Schmerzempfindung senkender Effekt anzunehmen und erklärt gleichzeitig die pronozizeptiven Auswirkungen einer Verminderung der PAM Expression.

In HeLa Zellen geht der Adenylyl-Zyklase Hemmung eine signalvermittelte Aktivierung von PAM voraus. Als ein Mediator der PAM Aktivierung wurde Sphingosin-1-Phosphat (S1P) identifiziert ⁶. S1P ist ein Phospholipid, das über membranständige Rezeptoren eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflusst. Dazu zählen unter anderem die Regulation des Zytoskelettes ^{34, 35} und die davon abhängige Migrationsfähigkeit von Zellen ^{36, 37}, die Steuerung der Zelldifferenzierung ^{38, 39}, sowie (anti-)apoptotischer Vorgänge ⁴⁰⁻⁴². S1P aktiviert, je nach Zelltyp und Rezeptorpopulation, über Proteinkinasen (ERK ⁴³, AKT ⁴⁴, PI3K ⁴⁵, p38MAPK ⁴⁶, GTPasen (Rho ⁴⁷ Rac ⁴⁸, Ras/Raf ⁴⁹) oder Lipasen (Phospholipase C ⁵⁰ Phospholipase D1/ D2 ⁵¹) ein großes Spektrum intrazellulärer Signalkaskaden. Es ist daher wahrscheinlich, dass neben der Adenylyl-Zyklase Inhibition auch weitere PAM-abhängige Vorgänge durch S1P gesteuert werden.

1.2. Der TSC2 / mTOR Weg

Durch verschiedene Vorarbeiten ist bereits bekannt, dass PAM in primären kortikalen Neuronenkulturen von Mäusen sowie in verschiedenen Zelllinien mit TSC2 ko-lokalisiert ist ^{3, 52}. Des Weiteren konnten d'Souza et al. zeigen, dass im Zebrafisch die Deletion der PAM RING Finger Domäne zu einer Akkumulation von phosphoryliertem TSC2 in retinalen Neuronen führt ¹⁶. Interessanterweise ist die Proteinregion nahe der RING Finger Domäne auch für die Interaktion mit TSC2 verantwortlich ³. Dies führte zu der Spekulation, dass PAM über diesen Bereich Einfluss auf TSC2 nimmt und dadurch auch dem TSC nachgeschaltete Komponenten durch PAM reguliert werden können.

Der TSC2 / mTOR (**m**amalian **T**arget **O**f **R**apamycin) Signaltransduktionsweg steuert die Regulation der Proteintranslation (siehe Abbildung 1-3). So werden schätzungsweise 15% der zellulären mRNA Population in Abhängigkeit von mTOR translatiert ⁵³. Auf diese Weise werden grundlegende Vorgänge wie Zellwachstum und Zellproliferation aber auch eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Transkription, Autophagie oder zytoskelettale Umordnungen reguliert ⁵³⁻⁶⁰. Der Signalweg wird, je nach Gewebe und Zelltyp, durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Aminosäuren oder Neurotransmitter aktiviert ⁶¹⁻⁶³. Im Falle von Mutationen, die negativ regulierende Proteine betreffen, kann es zu einer Hyperaktivität des Signalweges kommen. In besonders ausgeprägten Fällen führt dies zu der so genannten „tuberösen Sklerose“, einem Krankheitsbild das durch das Ausbilden von Hamartomen, vor allem im Gehirn, den Nieren und der Lunge gekennzeichnet ist ⁶⁴⁻⁶⁶. Diese (Fehl)-Steuerung des Zellwachstums durch den TSC2 / mTOR Signalweg steht bislang im Fokus der Forschung. Ein regulatorischer Einfluss von TSC2 und mTOR ist aber auch in anderen Prozessen (inflammatorische Genexpression, Regulation der Immunantwort, neuronale Plastizität) von Bedeutung ⁶⁷⁻⁷².

1.2.1. mTOR

Die Hauptkomponente des TSC2 / mTOR Signalweges ist die circa 300 kDa große Proteinkinase mTOR. Die Aktivität von mTOR kann durch das Makrolid Rapamycin, gehemmt werden, indem dieses nach Komplexierung mit dem Immunophilin FKBP12 an die katalytische Schleife von mTOR bindet ⁷³. Eine Auswirkung der verminderten mTOR

Aktivität ist u.a. die Abschwächung der Interleukin-2 induzierten T-Zell Proliferation ⁷⁴. Dementsprechend wird das als Immunsuppressivum zugelassene Rapamycin (Rapamune[®]) zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen eingesetzt. Weitere Studien legen zudem eine Indikation für weitere (partiell) mTOR-abhängige Erkrankungen (Tuberöse Sklerose ⁷⁵, Tumorwachstum ⁷⁶⁻⁷⁸) nahe.

Von den mTOR Zielproteinen sind die p70S6K (ribosomale p70 S6 Kinase) und das 4E-BP1 (4E-Bindeprotein 1) am besten charakterisiert und scheinen auch die bedeutsamsten zu sein ^{54, 79}. 4E-BP1 bindet an eine Komponente des Translationskomplexes, den Elongationsfaktor 4E (eIF4E). Dieser steuert die Translation eines Großteils der eukaryotischen mRNA Population. Die Proteinsynthese wird durch das Binden von 4E-BP1 an den Elongationsfaktor inhibiert. Kommt es zu einer mTOR-abhängigen Phosphorylierung von 4E-BP1, dissoziiert dieses von dem Elongationsfaktor. Die Proteinsynthese erfolgt wenige Minuten nach der mTOR-Aktivierung, da mit Inaktivierung des 4E-BP1 die entsprechende mRNA sofort translatiert werden kann. ^{80, 81}.

Die p70S6K hingegen ist ein positiver Regulator translationeller Vorgänge. Kommt es zu einer Phosphorylierung durch mTOR, aktiviert die p70S6K die Translation einer bestimmten Subklasse von mRNA's. Diese so genannten TOP (**T**erminal **O**ligo **P**olypyrimidin) mRNA's codieren hauptsächlich für ribosomale Untereinheiten und weitere Elongationsfaktoren ^{82, 83}. Die Wechselwirkung von mTOR mit seinen Zielproteinen 4E-BP1 oder p70S6K, aber auch die rezeptorvermittelte Aktivierung als solche, kann zudem auf bestimmte zelluläre Bereiche beschränkt bleiben ⁸⁴. Morphologisch stark differenzierte Zellen können daher auf extrazelluläre Stimuli mit der schnellen Ausbildung einer lokal begrenzten Proteinsynthese reagieren. So zeigten Takei et al., dass die BDNF-induzierte Proteinsynthese in kortikalen Dendriten durch Applikation eines mTOR Inhibitors verhindert werden kann ⁸⁵. Im Zusammenwirken mit selektivem RNA Transport ⁸⁶ ist es somit zusätzlich möglich, die Translation einer definierten Proteinpopulation zu gewährleisten ⁸⁷. Diese mTOR-abhängigen Prozesse scheinen bei Vorgängen wie der Langzeitpotentierung (LTP) oder Langzeitdepression (LTD), bei der Neurone die Plastizität einzelner Synapsen durch rasche Translation von bestimmten Proteinen modulieren, eine Rolle zu spielen ⁸⁸.

1.2.2. Regulierung der mTOR Aktivität durch Rheb und TSC2

Die Aktivierung von mTOR selbst erfolgt über zwei Wege.: Durch AKT Kinase vermittelte, direkte Phosphorylierung^{89,90} oder durch das Binden der kleinen GTPase (**GTP-Hydrolase**) Rheb (**Ras Homolog Enriched in Brain**)^{91,92}.

Rheb liegt in der Zelle in Guanin-Nukleotid-haltiger Form vor. In GTP gebundener Form steigert Rheb die Kinaseaktivität von mTOR. Durch seine intrinsische GTPase Aktivität hydrolysiert Rheb gebundenes GTP zu GDP wodurch sein stimulatorischer Effekt auf mTOR aufgehoben wird^{91, 93}. Der Rheb GTP/GDP-Beladungszustand kann durch eine Interaktion mit TSC2 entscheidend beeinflusst werden. TSC2 besitzt am C-Terminus eine Proteindomäne, die eine GAP (**GTPase Aktivierungs- Protein**) Funktion auf Rheb ausübt^{92, 94}. Durch diese kann es die intrinsische GTPase Aktivität von Rheb um ein Vielfaches verstärken⁹⁵. Eine TSC2-Rheb Wechselwirkung führt somit zu einer Verschiebung des Rheb-Nukleotid Verhältnis' hin zu Rheb-GDP und in der Konsequenz zu einer mTOR Hemmung. Wie die Überführung von Rheb-GDP zurück zu Rheb-GTP erfolgt, ist bislang noch nicht geklärt. Überlicherweise wird eine solche Reaktion durch ein Guanidinnukleotid-Austauschfaktor (GEF) katalysiert. Trotz intensiver Bemühungen ist ein solcher GEF für Rheb noch nicht identifiziert worden. Dies führte zu der Spekulation, dass Rheb aufgrund seiner, im Vergleich zu anderen G-Proteinen, relativ hohen GTP Affinität möglicherweise keinen GEF benötigt^{96,97}.

TSC2 ist ein circa 200 kDa großes Protein, das im Komplex mit dem Protein TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1, vormals Hamartin) vorliegt⁹⁸. Zwar übt TSC1 keinen Einfluss auf Rheb aus, allerdings hat eine Dissoziation des TSC1/TSC2 Komplexes, die durch eine Phosphorylierung von TSC2 eingeleitet wird, eine Verminderung der TSC2-GAP Aktivität auf Rheb zur Folge⁹⁹. In der Konsequenz führt eine Hemmung von TSC2 also zu einer Steigerung der mTOR Aktivität. Eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen nutzt den Weg einer Inaktivierung von TSC2, um mTOR zu aktivieren. Dabei spielen die Kinasen ERK und AKT die wichtigste Rolle¹⁰⁰⁻¹⁰². Da eine Phosphorylierung von solche Modifikation von TSC2 zudem auch als Erkennungssignal für eine Ubiquitinierung diskutiert wird¹⁰³, kommt diesem Modifizierungsmechanismus eine bedeutende Stellung zu.

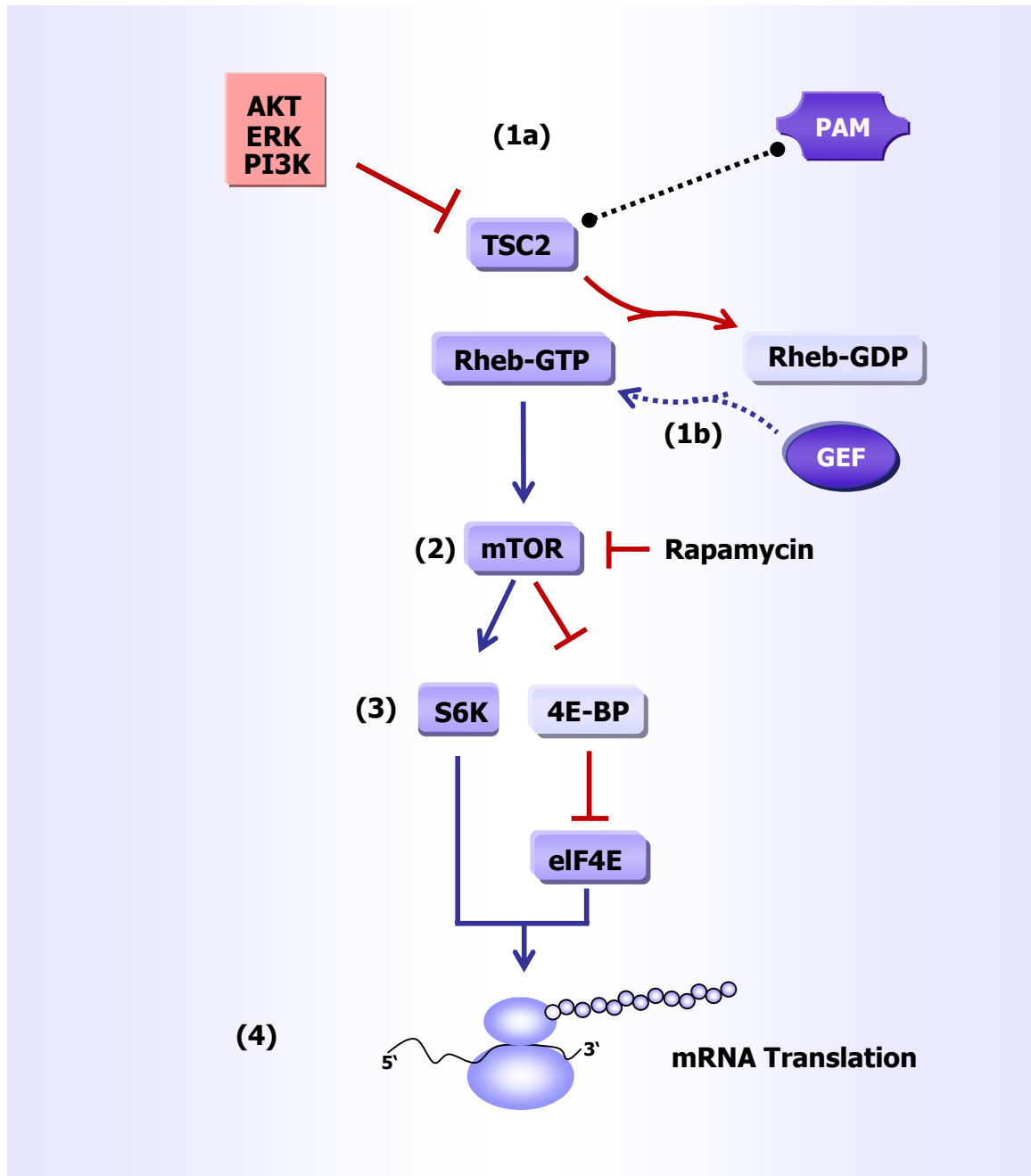


Abbildung 1-3 Steuerung der Proteintranslation durch den TSC2 / mTOR Signalweg

(1a) TSC2 verstärkt die Inaktivierung von Rheb indem es dessen intrinsische GTPase Aktivität verstärkt. TSC2 kann durch eine Reihe von Proteinkinasen phosphoryliert und dadurch gehemmt werden. Welche Funktion PAM, das mit TSC2 interagiert, ausübt ist noch nicht geklärt. **(1b)** Für die Rücküberführung von Rheb-GDP in Rheb-GTP wird möglicherweise ein GEF benötigt. **(2)** Rheb-GTP aktiviert mTOR, das **(3)** seinerseits die zytosolische p70 S6 Kinase (p70S6K) und das Bindeprotein (4E-BP) des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4E (eIF-4E) phosphoryliert. **(4)** Die Phosphorylierung dieser beiden Proteine führt in der Konsequenz zu einer gesteigerten Ribosomenbiogenese und Proteintranslation.

1.3. Ubiquitinierung als regulatorischer Mechanismus

1.3.1. PAM als potentielle Ubiquitinligase

Die Aufklärung der PAM Aminosäuresequenz ermöglichte die Identifizierung seiner RING Finger Domäne an seinem C-Terminus. Für viele dieser RING Finger Proteine wurde mittlerweile eine Aktivität als Ubiquitinligase nachgewiesen. Dementsprechend wird auch für PAM eine solche enzymatische Funktion diskutiert. Da Ubiquitinligasen den proteasomalen Abbau von Proteinen regulieren (siehe 1.3.2), spricht eine Reihe von Beobachtungen für die Einordnung von PAM in diese Enzymklasse. Wie erwähnt kommt es zu einer Akkumulation von phosphoryliertem TSC2 in Retikulozyten von PAM defizienten Zebrafischen¹⁶. In *C. elegans*. wurde eine Korrelation zwischen PAM Knock-out und erhöhten Konzentrationen des Proteins DLK-1 (Dual Leucinezipper Kinase-1) nachgewiesen, die auf einen fehlenden Abbau des Proteins hindeutet¹⁹. Zusätzlich beschrieben Liaoh et al. eine Interaktion des PAM Homologes aus *C. elegans* mit dem F-Box Protein FSN-1¹⁸. F-Box Proteine sind in vielen Ubiquitinierungsreaktionen für eine effiziente Bindung des Substrates an die Ubiquitinligase notwendig¹⁰⁴. Ein direkter biochemischer Nachweis, dass PAM tatsächlich Ubiquitinligaseaktivität besitzt, konnte jedoch bislang noch nicht erbracht werden.

1.3.2. Mechanismus der Ubiquitinierung

Es ist für die Zelle von entscheidender Bedeutung, das dynamische System des Proteoms durch zielgerichtete und koordinierte Degradation funktionsfähig zu halten. Extrazelluläre und membranständige Proteine werden gleichmäßig durch Pino- oder rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und nach Fusion mit primären Lysosomen proteolysiert. Dagegen wird der Großteil zytosolischer Proteine hoch selektiv durch den Mechanismus der Ubiquitinierung abgebaut. Die Initiierung dieses Abbauprozesses (siehe Abbildung 1-4) erfolgt durch Markierung der zu degradierenden Proteine mit einem 8,5 kDa großen Protein, das aufgrund seines ubiquitären Vorkommens als Ubiquitin bezeichnet wurde¹⁰⁵. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird ein einzelnes Ubiquitinprotein kovalent an einen Lysin-

Rest des Zielproteins gebunden. An dieses Monomer werden sukzessiv mindestens drei weitere Ubiquitinproteine über eine Peptidbindung geknüpft. Die Ubiquitinierungsreaktion wird durch 3 hintereinander geschaltete Enzyme (Ubiquitin aktivierendes Enzym - **E1**; Ubiquitin konjugierendes Enzym - **E2**; Ubiquitinligase - **E3**) katalysiert¹⁰⁶. Oftmals ist eine Reaktion nur möglich, wenn zusätzlich Adaptoren wie so genannte F-Box und / oder Cullin Proteine den Enzym-Substrat Komplex stabilisieren^{107, 108}. Damit das Zielprotein von der Degradationsmaschinerie erkannt werden kann, muss die Ubiquitinkette eine Länge von vier Einheiten erreichen¹⁰⁹. Die eigentliche Proteolyse erfolgt im Proteasom, ein multikatalytischer Komplex mit Endopeptidase-Aktivität. Das Zielprotein bindet über die Ubiquitinkette an das Proteasom und wird von diesem in Peptide von 3 bis 20 Aminosäuren gespalten. Diese werden anschließend ins Zytosol freigesetzt und abschließend durch Peptidasen in freie Aminosäuren hydrolysiert¹¹⁰. Die gebundene Polyubiquitinkette ist von diesem Degradationsprozess nicht betroffen, sondern wird durch deubiquitinierende Enzyme (DUB's) in monomeres Ubiquitin gespalten, welches dann für neue Reaktionen zur Verfügung steht^{111, 112}. Sowohl quantitativ als auch qualitativ, ist die Ubiquitinierung von Proteinen der bedeutendste proteolytische Weg den eukaryontische Zellen nutzen¹¹³. Dies erklärt sich neben der Menge an Substraten (circa 90% aller zytosolischen Proteine) auch anhand der Funktion der Zielproteine. So zählen sowohl Transkriptionsfaktoren (NF- κ B¹¹⁴ und I κ B¹¹⁵), als auch Zellzyklus Proteine (Cycline¹¹⁶ und Cyclinabhängige-Kinase Inhibitoren¹¹⁷) und Onco- und Tumorsuppressorgene (c-MYC¹¹⁸, c-FOS¹¹⁹, p53¹²⁰) zu den Substraten des Ubiquitin-Proteasom Weges. Der Mechanismus der Ubiquitinierung koordiniert somit eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Dementsprechend kann eine Fehlfunktion einzelner Ligasen, die sich in einer verstärkten / verminderten Degradation des Zielproteins manifestiert, in einer Reihe von Erkrankungen münden. Bei der Pathogenese bestimmter Krebserkrankungen¹²¹⁻¹²³ aber auch verschiedenen neurodegenerativen Prozessen¹²⁴ ist eine exponierte Stellung des Ubiquitin-Proteasom Weges besonders offensichtlich.

Eine Proteinubiquitinierung führt allerdings nicht zwangsläufig zu dessen Degradation. Durch Mono-Ubiquitinierung wird Einfluss auf die Lokalisation aber auch die Aktivität von Proteinen genommen. Auf diese Weise werden unter anderem transkriptionelle Vorgänge^{125, 126}, DNA Reparaturmechanismen¹²⁷ und die Ribosomenbiogenese¹²⁸ reguliert. Zudem spielt die Mono-Ubiquitinierung eine entscheidende Rolle bei der Desensibilisierung von

Signaltransduktionsmechanismen. Sie ist das Initiierungssignal für eine Internalisierung von membranständigen Rezeptoren. Diese können danach entweder „recycelt“, d.h. wieder in die Membran inseriert oder aber durch lysosomale Proteolyse degradiert werden¹²⁹. Durch diesen Mechanismus kann die Zelle die Dichte einer Rezeptorpopulation kurzfristig modulieren und dadurch die Intensität der intrazellulären Antwort auf extrazelluläre Stimuli regulieren.

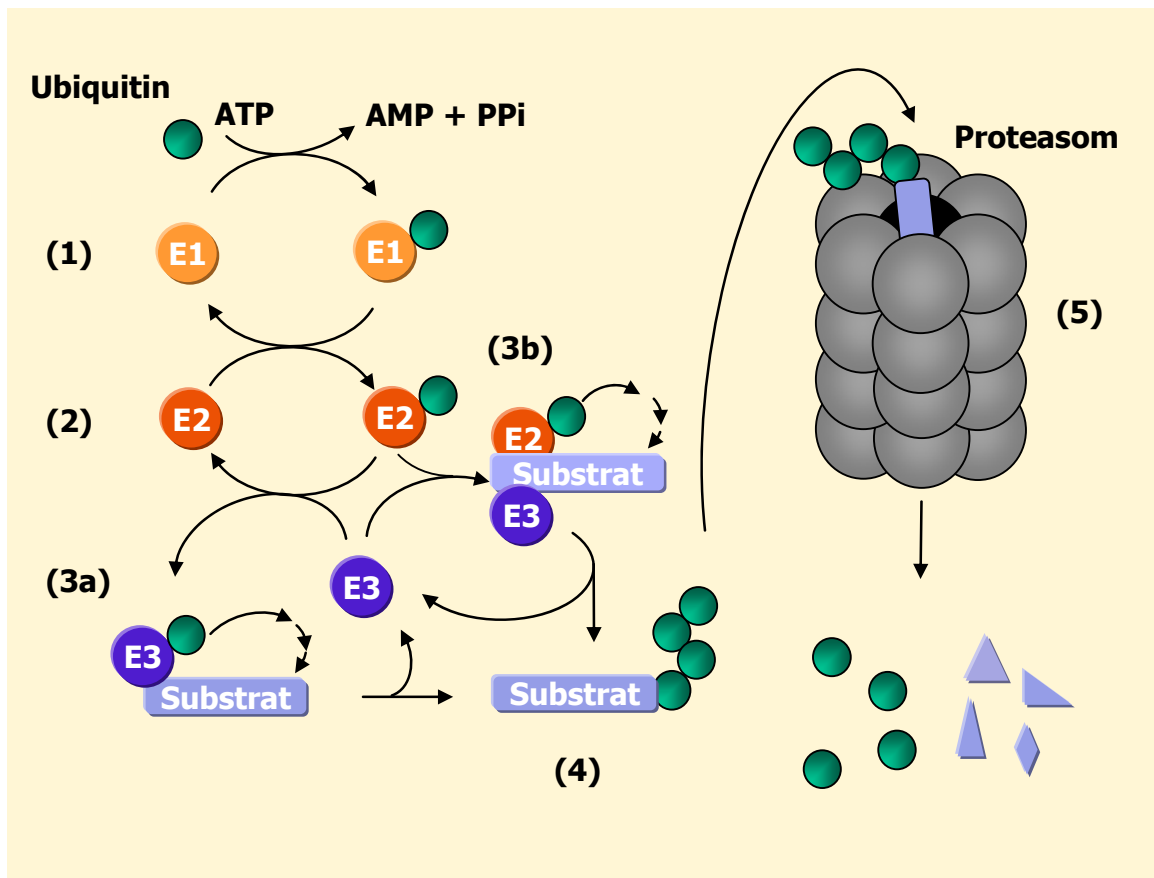


Abbildung 1-4 Der Ubiquitin – Proteasom Signalweg

In einer ATP-abhängigen Reaktion wird das Ubiquitin Protein über einen Thioester an das E1 Enzym gebunden (1). Von diesem erfolgt eine Übertragung an ein E2 Enzym (2). Dieses kann das aktivierte Ubiquitin zunächst auf eine Substrat-spezifische E3 Ligase übertragen (3a) oder direkt mit dieser und dem Zielprotein einen Komplex bilden (3b). In beiden Fällen erfolgt anschließend eine Polyubiquitinierung des Zielproteins (4). Anhand der Polyubiquitinkette wird das zu degradierende Protein vom Proteasom erkannt und in kleinere Peptide gespalten. Das Ubiquitin wird dabei nicht proteolysiert, sondern in Monomere gespalten und für einen neuen Zyklus zur Verfügung gestellt (5).

1.3.3. Spezifität der Ubiquitinierung

Das Säugetiergenom codiert lediglich für ein E1-Enzym, das für alle Reaktionen die notwendige Aktivierung des Ubiquitins katalysiert. Die Anzahl von circa 30 E2 Enzymen¹³⁰ und hunderten von E3 Ligasen¹³¹ ermöglicht allerdings eine extrem große Diversität von E2-E3-Zielprotein Komplexen. Diese Vielfalt ermöglicht es der Zelle, die Ubiquitin vermittelte Proteolyse oder Monoubiquitin-abhängige Signaltransduktionswege auf komplexe Weise zu regulieren. Um die Spezifität und Häufigkeit der Reaktionen zu steuern, kommen im Wesentlichen folgende Mechanismen zum Tragen:

- a) Funktionelle Interaktionen sind nur zwischen bestimmten E2 und E3 Enzymen möglich¹².
- b) Durch Begrenzung von E2- und E3 Enzymen auf bestimmte zelluläre Kompartimente wie Endoplasmatisches Retikulum, Peroxisomen oder Nukleus kann der Abbau eines Zielproteins lokal begrenzt bleiben bzw. nur an / in diesen Organellen stattfinden^{132, 133}.
- c) Ein funktionelles E2-E3 Enzym Paar kann durch Lokalisation an bzw. in verschiedenen Zellorganellen/ Kompartimenten räumlich voneinander getrennt sein. Die Ko-Lokalisierung beider Proteine wird durch ein „Degradationssignal“ eingeleitet¹³⁴.
- d) Eine Interaktion von E3 und Substrat wird erst durch eine Modifikation (zumeist Phosphorylierung) eines der beiden Proteine möglich¹⁰⁷.
- e) Die Interaktion zwischen E3 und Substrat wird erst durch ein akzessorisches F-Box oder cullinartiges Adaptorprotein vermittelt. Dieses kann seinerseits wiederum durch eine andere E3-Ligase reguliert sein^{135, 136}.

1.3.4. RING Finger E3 Ligasen

Bei der RING Finger Domäne am C-Terminus von PAM handelt es sich um eine hoch konservierte Anordnung von Cysteinen und Histidinen, die eine koordinative Bindung mit Zink-Ionen eingehen können¹³⁷ (siehe Abbildung 1-5). Innerhalb der Enzymklasse der Ubiquitinligasen, zu der auch die so genannten „N-Ende Regel“-E3 Ligasen und HECT (Homology to E6AP C-Terminus) zählen, stellen die RING Finger Proteine die mit Abstand größte und damit auch bedeutendste Gruppe dar¹⁰⁷. Die RING Finger Domäne vermittelt, in

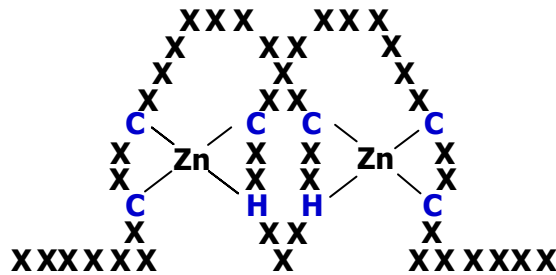
Abhängigkeit der Aminosäuresequenz, die Interaktion mit einem spezifischen E2-Enzym ¹⁴. Die Wechselwirkung der E3-Ligase mit dem zu ubiquitinierenden Protein erfolgt entweder durch direktes Binden an selbiges („single protein RING Finger E3 Ligase“) oder wird über Adaptorproteine bzw. multimere Proteinkomplexe vermittelt ¹⁰⁷. Die enzymatische Aktivität von RING Finger E3 Ligasen lässt sich *in vitro* auch in Abwesenheit eines Zielproteins nachweisen. Dies ist möglich, da sich in Anwesenheit von Ubiquitin und ATP die Synthese von Ubiquitinpolymeren sowie eine Autoubiquitinierung bereits durch Zugabe des E1-Enzyms und eines passenden E2-Enzyms starten lässt. Diese Besonderheit der RING Finger E3 Ligasen ermöglicht es, die Aktivität eines solchen Proteins als E3-Ligase zu überprüfen ¹³⁸. Ob diese Ubiquitinpolymerbildung und Autoubiquitinierung auch *in vivo* eine Rolle spielen ist noch unklar.

A

RING Konsensussequenz: CX₂CX₍₉₋₃₉₎CX₍₁₋₃₎HX₍₂₋₃₎HX₂CX₍₄₋₄₈₎CX₂C

PAM: C M I C F T E A L S A A P A I Q L D C S H I F H L Q C R R V L E N R W L G P R I T F G F I S C P I C

B



C

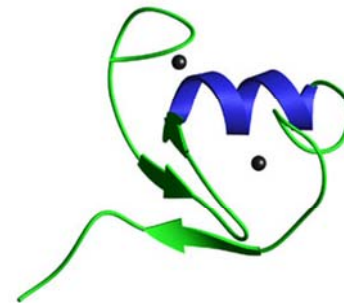


Abbildung 1-5 Modelle der RING Finger Domäne von RING E3 Ubiquitinligasen

(A) Die PAM Aminosäuresequenz erfüllt die Bedingungen der RING Finger Konsensussequenz. Koordinative Cysteine (C) / Histidine (H) sind in Blau hervorgehoben. (B) Koordination der Zink-Atome in 2 Dimensionaler Ansicht. X : beliebige Aminosäure C: Cystein; H: Histidin (C) 3-Dimensionale Ansicht einer RING Finger Domäne am Beispiel der Ubiquitinligase c-CBL ¹³⁹. Die koordinativen Aminosäuren binden die Zinkatome (schwarz) durch Ausbildung einer β-Faltblatt (Grün) und α-Helix Struktur (blau).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

PAM nimmt in vielen regulatorischen und physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle ein. Aufgrund seiner enormen Größe und Komplexität ist es unwahrscheinlich, dass PAM diese verschiedenartigen Funktionen über einen einzigen Mechanismus steuert. Bisherige Arbeiten gingen hauptsächlich den Weg einer deskriptiven Untersuchung von PAM defizienten Organismen. Welche Signaltransduktionswege durch PAM beeinflusst werden und welche biochemischen Vorgänge dafür von Bedeutung sind, ist jedoch nur unzureichend aufgeklärt. Um die PAM-abhängigen Effekte auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde die strukturelle Ähnlichkeit von PAM zu einer Subklasse von Ubiquitinligasen sowie die Interaktion mit dem TSC2 Protein als Ausgangspunkt herangezogen. Im Einzelnen sollte im Rahmen dieser Arbeit daher untersucht werden ob

- PAM tatsächlich die postulierte Aktivität als E3-Ubiquitinligase aufweist,
- die Interaktion mit TSC2 von funktioneller Bedeutung ist,
- neben der bereits beschriebenen Hemmung der cAMP Synthese, weitere Signaltransduktionswege durch PAM reguliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Substanz:	Hersteller:
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
[32P]- γ -ATP	MP Biomedicals, Heidelberg
Aceton	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Aktivkohle	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ampicillin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Aprotinin	Boehringer, Mannheim
APS	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Coomassie brilliant blue G-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Cycloheximid	Calbiochem, La Jolla, CA
DAPI	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
DMSO	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolute	JT Baker Deventer, Holland
Ethanol 70%	Apotheke, Universitätsklinik Frankfurt

Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
GST-Ubiquitin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
[3H]-GDP	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
GTP γ [35S]	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Hefeextrakt	Gibco, Paisley, Schottland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Isopropanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Lactacystin	Biomol, Hamburg
Luria Broth	Gibco, Paisley, Schottland
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol 100%	JT Baker Deventer, Holland
MG132	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Mineralöl	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natrium Orthovanadat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Nonidet NP40	Boehringer, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin G/Streptomycin	Gibco, Paisley, Schottland
Pepstatin	Boehringer, Mannheim
Pertussistoxin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Phenol	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphorsäure 85%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Pipes	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
PMSF	Perbio Science, Bonn
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
RNase A	Carl Roth, Karlsruhe
Ro 31-8220	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe
Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	Tocris, Ellisville, USA
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypton	Gibco, Paisley, Schottland
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
U0126	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
UbcH5c	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Ubiquitin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Wortmannin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

Aktivierung von Natrium Orthovanadat:

Vanadat bildet Polymere aus. Um die inhibitorische Potenz von Vanadat auf Phosphatasen zu verstärken, kann es durch Aufkochen mit HCl depolymerisiert werden. Dazu wurde eine 200 mM Lösung auf pH 10 eingestellt, je höher der Anteil an polymerisiertem Vanadat desto intensiver die Gelbfärbung bei pH 10. Die Lösung wurde anschließend abwechselnd erhitzt und mit HCl adjustiert, bis sie auch bei pH 10 farblos blieb.

2.2.Puffer und Lösungen

Bakterien Lysispuffer

50mM Tris pH 7.4

2.5mM DTT

0,2mg/ml Lysozym

1mM PMSF

40µg/ml Trypsininhibitor

Coomassie Färbelösung

40% Methanol

0,2 % Coomassie brilliant blue

Coomassie Entfärbelösung

10% Methanol

5% Eisessig

Co-IP Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

50 mM NaCl

0,5% Nonidet P-40

2 mM EDTA

1 mM Phenylmethylsulphonylfluorid

5 mM Benzamidin

5 µg/ml Aprotinin / Leupeptin

10 µg/ml Trypsininhibitor

Optional: 5 mM Natrium Fluorid

Optional: 1 mM aktiviertes Orthovanadat

DNase Puffer

50mM Tris pH 7.4

10mM MgCl₂

3 units /ml DNase I

0,5 % Tween 20

GTP Beladungs Puffer

20mM Tris pH 8

1mM DTT

5mM EDTA

0,1 mg/ml BSA

GDP Beladungs Puffer

25mM Tris pH 7.4

1mM DTT

10mM EDTA

50mM NaCl

0,1 mg/ml BSA

GTPase Puffer

20mM Tris pH 8
10mM MgCl₂
5mM DTT

GTPase Stopp Puffer

20mM Tris pH 8
25mM MgCl₂
100mM NaCl

6x Laemmli-Puffer für Phospho-Protein

360mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0
10 mM NaF
5 mM aktiviertes Na-Ortho-Vanadat
5 mM Na-Pyrophosphat
12% SDS
60% Glycerol
0,06 % Bromphenolblau
50mM DTT (jeweils frisch zu 1x Lämmli geben)

Lysispuffer für eukaryontische Zellen

50mM Tris pH 7.4
1mM Phenylmethylsulphonylfluorid
5mM Benzamidin
5µg/ml Aprotinin
5µg/ml Leupeptin
10µg/ml Trypsininhibitor
1mM DTT

Ponceau Färbelösung

0,5% w/v Ponceau S
3% Eisessig

RIPA Puffer

50mM Tris pH 7.4
150mM NaCl
0,25% Na-Deoxycholat
1% Nonidet P-40
1mM EDTA
1mM Phenylmethylsulphonylfluorid
5mM Benzamidin
5µg/ml Aprotinin
5µg/ml Leupeptin
10µg/ml Trypsininhibitor

TB Puffer

10mM Pipes
15mM CaCl₂

TN Puffer

50mM Tris pH 7.4
100mM NaCl

250mM KCl
pH auf 6.7 mit KOH
danach Zugabe von 55mM MgCl₂

TNT Puffer

50mM Tris pH 7.4
100mM NaCl
0,1% Tween 20

TNT Puffer

50mM Tris pH 7.4
100mM NaCl
0,1% Tween 20

SDS PAGE Laufpuffer

25mM Tris pH 8.3
200mM Glyzin
0,1 % (w/v) SDS

SDS PAGE Transferpuffer

50mM Tris pH 8.3
190mM Glyzin
20 % (v/v) Methanol

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte mittels des Peqlab MiniPrep Kit (peqlab, Erlangen) nach Anleitung des Herstellers. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde durch photometrische Untersuchung bestimmt, wobei eine gemessene Absorption von 1 bei $\lambda=260$ einer Konzentration von 50 μ g DNA / ml entspricht.

2.3.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen von DNA erfolgten unter Verwendung der vom Hersteller für die jeweilige Nuklease angegebenen Puffer- und BSA-Konzentration in einem Volumen von 20 μ l.

2.3.3. Agarose Gelelektrophorese

Abhängig von der Größe der DNA Fragmente wurden 0,8% - 2,5%ige TAE Agarose Gele gegossen und die aufgetragenen DNA Proben bei 5V/cm aufgetrennt. Die DNA Banden wurden durch Interkalation von Ethidiumbromid und Bestrahlung mit UV Licht (365 nm) sichtbar gemacht und digital aufgenommen. Sollte DNA Fragmenten für Folgeexperimente genutzt werden wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem „Qiagen Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers eluiert

2.3.4. Ligation von DNA Fragmenten

Der Zielvektor wurde zunächst durch Restriktionsverdau linearisiert und bei einer blunt-end Ligation durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (0,2 U/μl; 1 Stunde RT) dephosphoryliert. Zu dem Vektor (100-200 ng) wurde 3fach molarer Überschuss an DNA-Insert gegeben und nach Zugabe von Ligationsbuffer und 0,2 U/μl U T4 Ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA) der Ansatz bei 16°C über Nacht inkubiert.

2.3.5. Herstellung kompetenter E.coli Bakterien

Um transformierbare Bakterien zu erhalten wurde eine stationäre Kultur des jeweiligen *E. coli* Stammes 1:500 in 250 ml SOB-Medium verdünnt und bei 18-25°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde für 10 Minuten auf Eis platziert, bei 1000g für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 20ml TB Puffer vorsichtig gewaschen. Nach Wiederholung dieses Schrittes wurde zum dem in 20ml TB Puffer suspendierten Pellet tropfenweise 1,4ml DMSO pipettiert, die Suspension für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert, 100μl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.6. Transformation von E.coli Bakterien

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit Fremd-DNA vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein 60 sekündiger „Hitzeschock“ bei 42°C und Zugabe von 800μl LB-Flüssigmedium. Anschließend wurde

der Ansatz 45 Minuten bei 37°C inkubiert, die Zellen per Zentrifugation pelletiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen.

2.3.7. Klonierung des C-Terminus' von PAM

Aus einem Plasmid mit der PAM c-DNA ⁴ wurden durch PCR die Nukleotide 9191-13923 amplifiziert, aufgereinigt und in den pCR-XL-TOPO Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) ligiert. Das durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* (Promega, Madison, USA) erhaltene Fragment wurde anschließend in den bakteriellen Histidinaffinitätstag-Expressionvektor pTrcHisB (Invitrogen, Carlsbad, CA) kloniert. Die Insert-Integrität wurde durch Sequenzierung (MWG Biotech, Martinsried, Deutschland) bestätigt. Das Fragment codiert für die 339 C-terminalen Aminosäuren von PAM und beinhaltet auch die RING Finger Domäne. Das entsprechende Peptid codiert wurde als „C-PAM“ bezeichnet.

2.3.8. Klonierung der RCC1-Domäne

Der bakterielle GST-Tag-Expressionsvektor pGEX4T3 wurde mit *SmaI* restringiert und anschließend für 2 Stunden mit alkalischer Phosphatase (1µl 1U/µl, Roche) dephosphoryliert. Aus einem Plasmid mit der PAM c-DNA wurde durch Verdau mit *SspI* und *DraI* (beide Promega, Madison, USA) ein Fragment bestehend aus den Nukleotiden 1241-3183 isoliert und in den Expressionsvektor ligiert. Die Insert-Integrität und der Leserahmen wurden durch Sequenzierung überprüft. Da das Fragment für die RCC1-ähnliche Domäne von PAM codiert, wurde das entsprechende Protein als „GST-RCC1“ bezeichnet.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung von Zelllinien

Adhärente Zelllinien (HeLa, PC12) wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und den Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C, 5% CO₂

und 100% Luftfeuchtigkeit (Hera cell Zellkulturinkubator, Heraeus, Hanau) in Kulturschalen variabler Größe kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte vor Erreichen der Konfluenz, Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, durch Zugabe von PBS/ 1 mM EDTA von der Kulturschale gelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 auf neuen Kulturschalen plattiert. Sollte eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät werden wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.4.2. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Logarithmisch auf einer 150mm Schale wachsende Zellen wurden geerntet, mit Medium gewaschen und durch Zentrifugation (1000g; 5 Minuten) sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in Einfriermedium (RPMI 1640; 50% FCS; 20% DMSO) suspendiert, gedrittelt, in Kryogefäße überführt und in einer Gefrierkammer mit Isopropanol sukzessive auf -80°C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung der Kryogefäße erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C, die Zellsuspension wurde in Standardmedium 1:15 verdünnt und auf ein 100mm Zellkulturschalen plattiert.

2.4.3. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für Transfektionen wurden HeLa Zellen in einer Dichte von 300000 Zellen/35mm Schale in Vollmedium ausplattiert und am nächsten Tag auf serumfreies Medium gesetzt. Die zu transfizierende DNA (3 µM Antisense-Oligonukleotide oder 2µg Plasmid DNA) wurde mit 750µl serumfreiem Medium gemischt. Es folgte die Zugabe von Transfektionsreagenz (TFX-20 Promega, Madison, USA) in einem Verhältnis von 3µl TFX-20 pro µg DNA. Dieser Ansatz wurde 15Minute bei RT inkubiert und zu den Zellen pipettiert. Nach 2 Stunden wurden 1,5ml Vollmedium zu den Zellen gegeben und nach weiteren 5 das Medium komplett ausgetauscht. 24 Stunden (Antisense-Oligonukleotide) bzw. 48h (Plasmid-DNA) posttransfunktional wurden dann die Zellen für Versuche verwendet.

2.4.4. Immunzytochemie

Die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle bzw. ihre Ko-Lokalisation wurde mittels Immunzytochemie ermittelt. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit einer Dichte von 100000 Zellen pro 35mm Schale auf Deckgläschen im jeweiligen Wachstumsmedium ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert. Sollte die Translokation von Proteinen nach SIP Stimulation nachgewiesen werden, wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium belassen um sie für die Stimulation zu sensitivieren. Zur Immunzytochemie wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten mit 10% PFA in PBS für 5 Minuten fixiert und danach mit 0,1% Triton X-100 in TNT Puffer behandelt um die Zellmembran zu permeabilisieren. Die Deckgläschen wurden anschließend mit 3% BSA in TNT für 1 Stunde blockiert, bevor sie mit Primärantikörper für eine weitere Stunde inkubiert wurden. Nach 3maligem Waschen mit PBS erfolgte die Detektion des gebundenen Primärantikörpers mit einem fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper. Die Signale wurden mit einem Kappa DX20H Kamera (Kappa, Gleichen) an einem Nikon Eclipse 600 (Nikon, Düsseldorf) Mikroskop aufgenommen und dokumentiert.

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Herstellung von Proteinlysaten

Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit PBS-1mM EDTA geerntet und in einer Kühlzentrifuge für 3 Minuten bei 4°C und 1000g pelletiert. Das Pellet wurde in Zell-Lysispuffer durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Gewebeproben wurden direkt nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in Zell-Lysispuffer homogenisiert. Gewebs- oder Zelltrümmer wurden anschließend durch 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000g pelletiert und der Proteinüberstand abgenommen. Für die Herstellung von S100 Überstand wurde das Proteinlysat in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und für weitere 60 Minuten bei 4°C und 100000g zentrifugiert.

2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden mit dem „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad, München) bestimmt. Die Messung der Absorption erfolgte 5 Minuten nach Zugabe des Bradfordreagens zur Proteinprobe in einem „Microplate-Reader“ Modell 550 (BioRad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Referenz wurde eine Proteineichreihe mit BSA verwendet.

2.5.3. Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteinanalyse mittels Western Blot wurden Zellen in kochendem 1x Lämmli geerntet oder Zelllysate mit einer entsprechenden Menge an 6x Lämmli versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 100°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS PAGE. Nach Gießen von Trenngel (7% - 15% Acrylamid) und Sammelgel (4%) wurden 15-30µg Protein pro Tasche sowie ein Molekulargewichtsmarker (Peqlab Erlangen) aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 10-20V/cm für 90 Minuten in Laufpuffer durchgeführt.

2.5.4. Coomassie Färbung von Proteingelen

Sollten die aufgetrennten Proteine nur visualisiert werden, wurde das Polyacrylamid Gel nach der Elektrophorese für 5 Minuten bei RT in Coomassie Lösung gefärbt und anschließend durch mehrmaliges Waschen in anschließend in 25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure entfärbt und digital dokumentiert.

2.6. Immunologische Methoden

2.6.1. Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Einzelne Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer in einer „Wet-Blotting“ Apparatur (BioRad, München) bei konstanter Spannung von 100V für 75 Minuten oder 15V für 16 Stunden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die

Membran wurde anschließend für 1h in TN Puffer mit 5% Milchpulver oder 3% BSA blockiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu minimieren. Der für das Zielprotein spezifische Erstantikörper wurde in TNT + 1% BSA verdünnt und für 2 Stunden bei RT oder 12 Stunden bei 4°C zusammen mit der Membran in Polyvinyl Folie eingeschweißt. Nach 3maligen Waschen für jeweils 5 Minuten in TNT folgte eine einstündige Inkubation bei RT mit dem in TNT + 3% Milchpulver verdünnten HRP-Peroxidase gekoppelten sekundär Antikörper. Ungebundener sekundär Antikörper wurde durch 5maliges waschen mit TNT entfernt und die Membran mit HRP-Substratlösung Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA) inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte mittels Exposition gegen einen Röntgenfilm. Um die Ergebnisse eines Westernblots zu validieren, wurde jeder Versuch mindestens 3fach wiederholt. Sollte eine Membran noch auf ein anderes Protein untersucht werden, so wurde sie zunächst für 30 Minuten in auf 50°C erwärmtem Stripping-Puffer inkubiert und in TN Puffer gewaschen bevor ein erneuter Immunoblot wie beschrieben durchgeführt wurde.

2.6.2. Immunopräzipitation

Für eine Immunopräzipitation wurden zwei 80% konfluente 150mm Schalen mit HeLa Zellen über Nacht in serumfreiem RPMI 1640 Medium inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 1 mM EDTA in PBS geerntet und durch Zentrifugation bei 1000g für 5 Minuten pelletiert. Das resultierende Pellet wurde bei 4°C für 15 Minuten in 2 ml RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) Puffer oder 2 ml Co-IP (Co-Immunopräzipitation) Puffer inkubiert und gegebenenfalls noch durch Ultraschallbehandlung weiter homogenisiert. Das erhaltene Lysat wurde für 15 Minuten bei 4°C, 12000g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für 15 Minuten mit 30 µl A/G plus Agarose (Santa Cruz, CA, USA) versetzt (so genanntes „preclearing“), um unspezifisch an die Matrix bindende Proteine zu entfernen. Nach Entfernen der Agarose wurde der Überstand halbiert, 3 µg des jeweiligen Antikörpers zu einer Hälfte gegeben und beide Hälften für 2 Stunden auf einem Drehrotor bei 4°C inkubiert. Danach wurden 50µl A/G Agarose für 1 Stunde zu beiden Ansätzen gegeben und die Agarose anschließend durch Zentrifugation bei 200g sedimentiert. Das Pellet wurde abschließend 3x mit 5 ml RIPA oder Co-IP Puffer und 3x mit 5 ml 50 mM Tris

pH 7.4 gewaschen und danach mit 60 μ l 1x Lämmli Puffer für 10 Minuten bei 90°C erhitzt. Der erhaltene Überstand wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt und per Western Blot analysiert.

2.6.3. Proteintransfektion mit BioPorter

Die Proteintransfektion mittels der BioPorter Reagenz (Gene Therapy Systems, San Diego USA) ist eine Lipid-basierte Methode, Proteine oder Peptide in das Zytosol von Zellen zu „liefern“. Das Prinzip ähnelt dem der liposomalen DNA Transfektion. Die Lipid-Protein-Komplexe verschmelzen mit der Zellmembran und setzen das Protein im Zytosol frei. Für die Versuche wurden HeLa Zellen \dot{a} 150000 Zellen / 35mm Schale ausplattiert, und nach 24 Stunden für weitere 16 Stunden auf serumfreiem Medium ohne Antibiotika inkubiert. Jeweils 175 μ l der Proteinlösung (100 μ g/ml GST bzw. GST-Rheb oder 50 μ g/ml PAM jeweils in 10 mM Tris -HCL pH 7.4) wurden zur Rehydrierung von 10 μ L BioPorter Reagenz verwendet. Die Ansatz wurde für 5 Minuten bei RT inkubiert, mit 815 μ L serumfreiem Medium gemischt und der komplette Ansatz für 4 Stunden auf die Zellen gegeben.

2.7. Proteinexpression und Aufreinigung

2.7.1. Expression rekombinanter Proteine in E.coli

Die Plasmide mit den codierenden DNA Sequenzen des zu exprimierenden Proteins wurden per Hitzeschock in kompetente *E.coli* BL21 Stamm transformiert und über Nacht in Selektionsmedium (NZ Amin + 40mg/ml Ampicillin) inkubiert. Diese Starterkultur wurde 1:100 in Selektionsmedium verdünnt und bei 30°C bis zur einer optischen Dichte von 0,6 im Inkubator angezogen. Die Induktion von der Proteinexpression wurde durch Zugabe von 100 μ M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) gestartet, die Kultur für weitere 3 Stunden inkubiert und das resultierende Bakterienpellet bis zur Proteinaufreinigung bei -80°C eingefroren.

2.7.2. Affinitätsaufreinigung von Histidin-Fusionsproteinen

Bakterienpellets der „C-PAM“ Induktion wurden in 3fachem Pelletvolumen Bakterienlysispuffer suspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Sonifikation für 3x10sec wurde das Lysat für 10 Minuten zentrifugiert (18000g; 4°C) und der Überstand mit Nickel-Agarose (Ni-NTA; Qiagen, Hilden, Deutschland) für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Agarose 3x mit 20 Säulenvolumen Bakterienlysispuffer und 3x mit 20 Säulenvolumen 50mM Tris im Batch-Verfahren gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit 50mM Tris pH 8, 150mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde auf eine MonoQ Säule (Amersham Bioscience, Uppsala Schweden) geladen und durch Fast Protein Liquid Chromatography (ÄKTA FPLC, Amersham Bioscience, Uppsala Schweden) mittels eines NaCl Gradienten (150mM-500mM in 45 Minuten, Flussrate 0,5ml/min) aufgetrennt. C-PAM positive Fraktionen wurden durch Immunoblot mit dem anti-Xpress Antikörper identifiziert, gesammelt und wie für PAM unter 2.7.4 beschrieben aufkonzentriert, entsalzen und bei -80°C gelagert.

2.7.3. Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Bakterienpellets der GST, GST-Rheb und GST-RCC1 Induktion wurden, wie in 2.7.2 beschrieben, aufgeschlossen. Das nach der Zentrifugation erhaltene Lysat wurde mit DNase Puffer versetzt und für 60 Minuten bei 4°C zusammen mit 2ml GST-Bind Resin (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend in Chromatographiesäulen (Poly Prep Biorad, München) überführt und nacheinander mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer (50mM Tris pH 7.6; 10mM MgCl₂-ATP; 1mM DTT) und Nukleotid-Dissoziierungspuffer (50mM Tris-HCl, pH 7.6, 100mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM DTT) gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer (50mM Tris pH 8; 10mM reduziertes Glutathion), das Eluat wurde mit Vivaspin 10kDA (Vivascience, Stockhouse Großbritannien) Filtrationsröhrchen auf 50µL Volumen konzentriert und 4mal mit 500µl 50mM Tris pH 8; 1mM DTT gewaschen. Das erhaltene Protein wurde danach aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Im Falle von GST-RCC1 kam es während der Proteininduktion zu starken Degradationen, die sich trotz Variationen der Induktionsbedingungen nicht verhindern ließen. Diese Degradation setzte sich auch während der Aufreinigung fort, so dass das Protein nur in fragmentierter Form isoliert werden konnte, was spätere Versuche möglicherweise beeinträchtigt haben könnte.

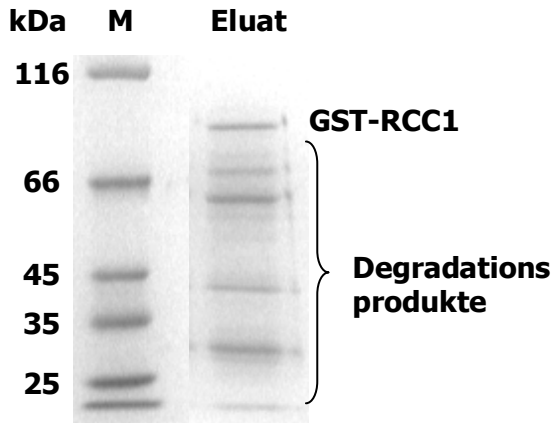


Abbildung 2-1 Coomassie Gel der GST-RCC1 Aufreinigung

2µg des GST-RCC1 Eluates wurden unmittelbar nach der Aufreinigung in einer SDS-PAGE aufgetrennt, und die Reinheit durch Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue überprüft. Im Vergleich zur der Aufreinigung von GST oder GST-Rheb (siehe Abbildung 3-15) war die Ausbeute sehr viel geringer und das Protein bereits unmittelbar nach der Aufreinigung degradiert.

2.7.4. Aufreinigung von PAM aus HeLa Zellen mittels FPLC

Natives PAM wurde modifiziert nach dem Protokoll von Scholich et al. ⁴ aus HeLa Zellen mittels Fast Protein Liquid Chromatography aufgereinigt. Die Zellen wurden von konfluenten Schalen mit PBS-1mM EDTA geerntet und bei -80°C gelagert. Für die Aufreinigung wurde das Pellet von circa 50 Schalen in 10ml Lysispuffer aufgenommen und die Zellen durch Ultraschall (3x10sec 50% Leistung; Sonoplus Bandelin, Berlin) aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 18000g zentrifugiert (Eppendorf 5810 R), der Überstand abgenommen, das Pellet erneut in 10ml Lysispuffer suspendiert und sonifiziert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 5x wiederholt. Der gesammelte Überstand wurde danach auf eine mit Tris-NaCl Puffer (50mM Tris pH 7.4 9mM NaCl) voräquilibrierte DEAE Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) aufgetragen

und die gebundenen Proteine mit einem steigenden NaCl Gradienten (9mM - 60mM in 50mM Tris HCl- pH 7.4 in 45 Minuten , Flussrate 2 ml/min) eluiert. PAM positive Fraktionen wurden durch Western Blot identifiziert, vereinigt und mit 4M NaCl schrittweise unter Rühren auf 1,9M NaCl eingestellt. Die Lösung wurde auf eine mit 1,9M NaCl - 50 mM Tris pH 7.4 äquilibrierte Phenylsepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) aufgetragen und gebundene Proteine durch schrittweises Absenken der NaCl Konzentration auf 1,3M – 0,6M - 0M NaCl eluiert. Die PAM enthaltenden Fraktionen wurden mit Vivaspin 100 kDa (Sartorius, Göttingen) Filtrationsröhrchen auf ca. 200µl aufkonzentriert und mit 1ml 50 mM Tris verdünnt um den NaCl Gehalt zu verringern. Dieser Schritt wurde 3 wiederholt, die Probe anschließend auf eine mit 50mM Tris voräquilibrierte MonoQ Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) geladen und mit steigender NaCl Konzentration (0-0,6 M 45 Minuten, Flussrate 1ml/min Minuten) eluiert. PAM positive Fraktionen wurden erneut aufkonzentriert, auf eine mit 90mM NaCl – 50 mM Tris-HCL pH 7.4 voräquilibrierte Superdex 200pg Gel Filtrationssäule (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) geladen und mit 50mM Tris (Flussrate 0,25ml/min) separiert. Die PAM positive Fraktion wurde mit erneut Vivaspin 100 kDa Filtrationsröhrchen auf ein Volumen von 50µl konzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.8. Biochemische Methoden

2.8.1. Zellbasierte Versuche

Das in der Zellkultur verwendete fötale Rinderserum enthält eine Reihe von Bestandteilen, die bei den kultivierten Zellen eine Vielzahl von regulatorischen Prozessen beeinflussen. Um diese Einflüsse zu minimieren, bzw. Effekte von zugegebenen Substanzen besser erkennen zu können, wurden für die Zellen falls möglich über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Erfolgte das Ansetzen der Testsubstanzen nicht in Wasser, wurde bei den Versuchen der Kontrollgruppe eine entsprechende Menge des jeweiligen Lösungsmittels zugesetzt.

2.8.2. In vitro Ubiquitinierung von Proteinen

Der Nachweis einer Ubiquitinierung erfolgt entweder indirekt über den nachgewiesenen proteasomalen Abbau des Zielproteins oder direkt über die Detektion von Ubiquitinketten am Zielprotein. Für eine Ubiquitinierungsreaktion wurden 0,15µg/µl GST-Ubiquitin, 500 nM E1 Enzym, 500 nM E2 Enzym, 100 nM PAM bzw. 200 nM C-PAM in Reaktionspuffer gemischt. Dem Ansatz wurden gegebenenfalls aufgereinigte oder immunopräzipitierte Proteine oder frisches Zell-Lysat zugesetzt. Zell-Lysat enthält auch den Enzymkomplex des Proteasoms, der für den Abbau der ubiquitinierten Proteinen verantwortlich ist., Sollte diese Degradation verhindert werden, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich 50 µM des Proteasom Inhibitors MG132 zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 75 Minuten bei 27°C und wurde durch Zugabe des entsprechenden Volumens 6x Lämmli Puffer abgestoppt. Der Nachweis einer Ubiquitinierung erfolgte entweder über Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper auf das Zielprotein oder auf das Ubiquitin selbst.

2.8.3. Stationärer (steady state) GTPase Versuch

G Proteine inaktivieren sich selbst durch die Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP unter der Freisetzung von Phosphat. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion lässt sich durch Ermittlung des freigesetzten ortho-Phosphates pro Zeit bestimmen. Durch Versetzen des Reaktionsansatzes mit Aktivkohle werden Proteine und Nukleotide gebunden, das bei der Hydrolyse von GTP zu GDP freigesetzte Phosphat hingegen bleibt in Lösung und kann quantifiziert werden ¹⁴⁰. Für den GTPase Versuch wurde das G-Protein Rheb(10 µM) zunächst in GTP-Ladepuffer und mit 1.5 mCi/ml [γ -³²P]GTP für 15 Minuten bei RT inkubiert. Mögliche Effektor Proteine (TSC2; PAM) wurden in GTPase Reaktionspuffer für 5 Minuten bei 25°C voräquilibriert und die Reaktion durch Zugabe von 500 nM Rheb (Finalkonzentration) gestartet. Nach 30 Minuten wurden die Ansätze mit 1ml eiskaltem Stoppuffer gemischt und für 10 Minuten bei 14000 RPM bei 4°C in einer Tischzentrifuge (Biofuge Pico, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint, C.Roth KG, Karlsruhe) vermischt und im

Szintillationszähler gemessen. Zur Quantifizierung der erhaltenen Werte wurde bei jeder Zählung eine definierte Menge [γ - ^{32}P]GTP in die Messung mit einbezogen.

2.8.4. $\text{GTP-}\gamma$ - ^{35}S Bindung an Rheb

Der Austausch von GDP gegen GTP an G-Proteinen kann nicht-enzymatisch erfolgen, zumeist wird er aber durch Proteine mit GEF (Guanine-Nukleotid-Exchange-Faktor) Aktivität katalysiert. Um ein mögliches GEF Protein zu identifizieren bzw. seine Aktivität zu validieren, wird das G-Protein zusammen mit $\text{GTP-}\gamma$ - ^{35}S inkubiert und die Menge an aufgenommenen Nukleotid nach der Schnell-Filtrations Methode ¹⁴¹ bestimmt. 100nM Rheb, 100 nM $\text{GTP-}\gamma$ - ^{35}S (100Ci/mmol) wurden in GTPase Puffer mit variablen PAM Konzentrationen für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Der Ansatz wurde danach auf Nitrozellulose Filter (Whattmann GmbH, Dassel) pipettiert, diese auf den Fritten einer Vakuumpumpe (Whattmann GmbH, Dassel) fixiert und 6mal mit 3ml Stopppuffer gewaschen. Die Filter wurden anschließend getrocknet, in 2ml Methoxy-Ethanol gelöst, mit 5ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und gemessen. Zur Quantifizierung der Radioaktivität wurde eine Probe mit bekannter $\text{GTP-}\gamma$ - ^{35}S Konzentration gemessen.

2.8.5. [^3H]GDP Dissoziation von Rheb

Neben der verstärkten Bindung von $\text{GTP-}\gamma$ - ^{35}S an ein G-Protein kann auch die Dissoziation von GDP als Messkriterium herangezogen werden. 2 μM Rheb wurden für 30 Minuten bei 25°C mit 2 μM ^3H -GDP (12.4 mCi/mmol; Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) in GDP-Ladepuffer inkubiert. Das beladene Protein wurde danach in GTPase Puffer auf 150 nM (Finalkonzentration) verdünnt und zusammen 1 μM GTP und variierenden PAM Konzentrationen für weitere 30 Minuten inkubiert. Die Quantifizierung des am G-Protein verbliebenen [^3H]-GDP's erfolgte wie in 2.8.4 nach der Schnellfiltrationsmethode.

2.9. Nozizeptive Tiermodelle

Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Tierexperimente wurden, wie in Ehnert et al.²⁰ beschrieben, von Dr.med.Ovidiu Coste durchgeführt und ausgewertet.

Im “Formalin-Test”¹⁴² wird sowohl die direkte Reizung von Nozizeptoren durch die Formalin-Injektion (Phase I) als auch die später einsetzende Sensibilisierung der betroffenen Neurone im Dorsal Horn des Rückenmarks (Phase II) erfasst. Dazu wurden den Mäusen jeweils 15 µl einer 5%igen Formaldehydlösung subkutan in eine der Hinterpfoten injiziert. Als nozizeptive Antwort, wurde das Lecken der Pfote über einen Zeitraum von 45 Minuten in 5minütigen Intervallen dokumentiert. Der “Formalin-Test” kann in zwei Phasen unterteilt werden.

Der “Hotplate Test” ist ein Schmerzmodell bei dem es nicht zu Gewebsschädigungen kommt. Mit ihm lässt sich die akute, thermische Nozizeption erfassen. Zur Durchführung wurden die Mäuse auf eine 55 °C warme Platte gesetzt und die Zeit bis zum Eintreten eines nozifensiven Verhaltens (Lecken, Springen) alle 30 Minuten über einen Zeitraum von 2 Stunden gemessen.

2.10. Statistik

Signalstärken der per Western Blot analysierten Proben wurden durch digitalisieren der Blots mit anschließender Bestimmung der Intensität analysiert. Für diese densitometrische Auswertung wurde das Programm Image J benutzt. Die Bandenstärke des untersuchten Proteins wurde in Relation zur entsprechenden Ladekontrolle gesetzt. Die ermittelten Werte wurden mittels 2 seitigen t-Test nach Student auf Signifikanz analysiert. Bei den Tierexperimenten erfolgte die Auswertung der Daten mit einer univarianten Varianzanalyse (Anova) und Bonferroni Post-Hoc-Test ($\alpha = 0,05$)

3. Ergebnisse

3.1. PAM ist eine E3-Ubiquitinligase

3.1.1. Aufgereinigtes PAM besitzt E2 Subtyp spezifische Auto-Ubiquitinierungsaktivität

PAM zählt zu den RING Finger Proteinen, von denen eine Vielzahl Ubiquitinligaseaktivität besitzen. Werden sie zusammen mit den akzessorischen Hilfsproteinen E1 und E2 unter geeigneten Bedingungen inkubiert, kommt es zur Selbstubiquitinierung und zur Katalyse von Polyubiquitinketten^{135, 143}. Die *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion kann daher genutzt werden, um eine Aktivität von RING Finger Proteinen als E3 Ligase anhand der Bildung ubiquitinerter Produkte nachzuweisen (siehe 1.3.4).

Um die Ubiquitinligaseaktivität von humanem PAM aufzuklären, wurde es aus HeLa Zellen unter nativen Bedingungen aufgereinigt (Abbildung 3-1). Die Aufreinigung erfolgte mittels FPLC unter Nutzung verschiedener Chromatographiesäulen, die eine Trennung der Proteine anhand ihrer spezifischen Eigenschaften wie Ladung, Hydrophilie oder Größe ermöglichen (siehe 2.7.4). Die Reinheit der Aufreinigung wurde nach Konzentrierung und Pufferaustausch der finalen PAM-Probe auf einem SDS-Gel analysiert. In einem Coomassie-gefärbten Gel ließen sich bei einem Auftrag von 0,5 µg Protein des letzten Aufreinigungsschrittes keine weiteren Protein Banden neben PAM erkennen. Die Verunreinigung mit anderen Proteinen konnte daher als sehr gering angesehen werden.

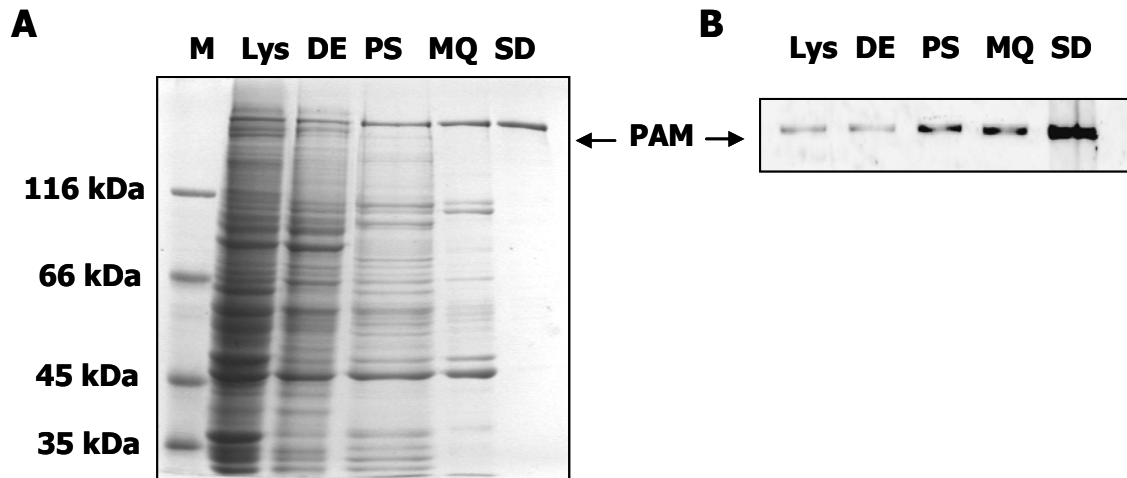


Abbildung 3-1 Native PAM Aufreinigung aus HeLa Zellen

(A) Native PAM Aufreinigung aus HeLa Zellen. Nach jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot für die Auftrennung auf einem 5 % - 10 % SDS-PAGE Gradientengel abgenommen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit „Coomassie-brilliant blue“ gefärbt, um die Reinheit der Aufreinigung zu überprüfen. M: Protein Größenstandard; Lys: Zell-Lysat (30 µg Protein); DE: DEAE Säule (15 µg); PS: Phenylsepharose Säule (5 µg); MQ: MonoQ Säule (2.5 µg); SD: SuperDex200 Säule (0,5 µg) (B) Western Blot mit Fraktionen aus den verschiedenen Aufreinigungsschritten. Lys: 20 µg ; DE: 10 µg; PS: 10 µg; MQ: 2.5 µg; SD: 1.5 µg . Nach dem Lauf wurde das Gel per Immunoblot auf das PAM Protein analysiert.

Das aufgereinigte PAM wurde für die *in vitro* Ubiquitinierungsversuche zusammen mit GST-Ubiquitin, dem E1 Enzym und verschiedenen E2 Enzymen in Reaktionspuffer inkubiert. In der Reaktion wurde GST-markiertes Ubiquitin verwendet, da es aufgrund der Größenunterschiede (GST-Ubiquitin 36 kDa; Ubiquitin 8.5 kDa) zu einer besseren Auftrennung von polyubiquitinierten Produkten in einer SDS-PAGE kommt. Die Analyse der Proben per Immunoblot auf GST-Ubiquitin-haltige Proteine zeigte eine deutliche Zunahme der Signalintensität durch Zugabe von PAM zum Reaktionsansatz (Abbildung 3-2). Die von den E2 Enzymen unter den gewählten Bedingungen bereits schwach stattfindende Ubiquitinkettenbildung¹⁴⁴ wird also durch Zugabe von PAM deutlich verstärkt. In einigen Ansätzen, denen PAM hinzugefügt wurde, konnte ein in den hochmolekularen Bereich hinein verwischendes Signal detektiert werden. Da RING Finger Proteine oftmals eine Auto-Ubiquitinierungsaktivität besitzen¹³, handelt es sich dabei wahrscheinlich um polyubiquitiniertes PAM. Die Daten bestätigen auf *in vitro* Ebene die Theorie, dass PAM Ubiquitinligaseaktivität besitzt. Die Reaktion wurde mit unterschiedlichen E2-Enzym Subtypen durchgeführt, dadurch ließ sich eine mögliche E2-Spezifität von PAM untersuchen. Die Aktivität war mit den E2 Enzymen E2-UbcH2; E2-

UbcH5a; E2-UbcH5c und E2-UbcH6 am ausgeprägtesten, während es mit den anderen E2 Enzymen zu keiner oder nur einer leichten Bildung von ubiquitinmarkierten Produkten kam.

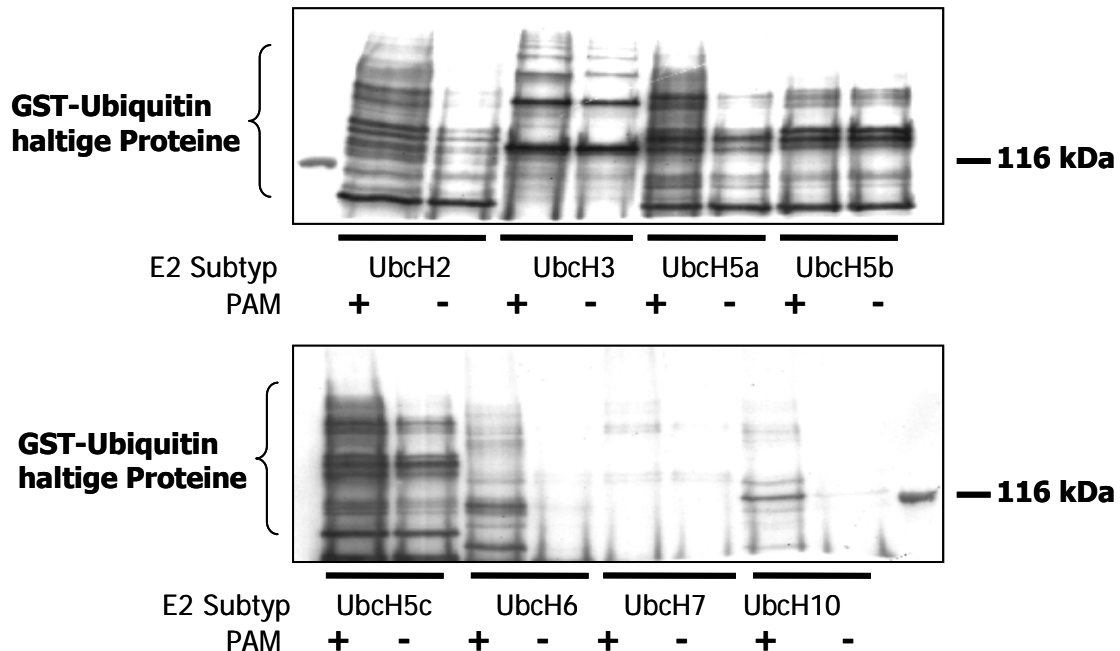


Abbildung 3-2 PAM Autoubiquitinierung

Für die Ubiquitinierungsreaktion wurden 100 nM PAM, 50 nM rabbit E1 Enzym, 500 nM des jeweiligen E2 Enzyms mit 0,15 µg/µl GST-Ubiquitin für 70 Minuten in Reaktionspuffer inkubiert. Die GST-Ubiquitin markierten Proteine wurden nach Western Blot mit einem Anti-GST Antikörper detektiert.

3.1.2. Die RING Finger Region ist die katalytisch aktive Domäne

Die Versuche mit dem vollständigen, nativ aufgereinigtem PAM zeigen, dass PAM *in vitro* E3 Ubiquitinligaseaktivität besitzt. Zum anderen deuten sie darauf hin, dass PAM auch seine eigene Ubiquitinierung bewirken kann. In anderen Ubiquitinligasen wird diese Eigenschaft von der RING Finger Domäne vermittelt^{13, 135}. Um dies auch für PAM zu überprüfen, wurde der C-terminale Teil, der die RING Finger Region (im Folgenden als C-PAM bezeichnet) enthält, in den pTrcHisB Vector kloniert (siehe 2.3.7) und in E.coli überexprimiert. Die Expression des Proteins wurde per Immunoblot überprüft und C-PAM mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.7.2 und Abbildung 3-3 A+B). Nach Inkubation von C-PAM mit E1-Enzym und dem E2-UbcH5c in Reaktionspuffer zeigte sich

eine deutliche Mehrfachubiquitinierung von C-PAM (Abbildung 3-3 C). Um größere Abstände zwischen den einzelnen Ubiquitinierungsstufen zu ermöglichen, wurde wiederum GST-Ubiquitin verwendet. Da es nur in Anwesenheit aller 3 enzymatischen Komponenten (E1, E2-UbcH5c und C-PAM als E3 RING Finger Domäne) zur einer Autoubiquitinierung kam, können unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden. Analog zu den Versuchen mit endogenem PAM, wurde eine selektive E2 Subtypaffinität bestätigt. So war eine Auto-Ubiquitinierungsaktivität nach Austausch von E2-UbcH5c gegen E2-UbcH10 nicht mehr nachweisbar.

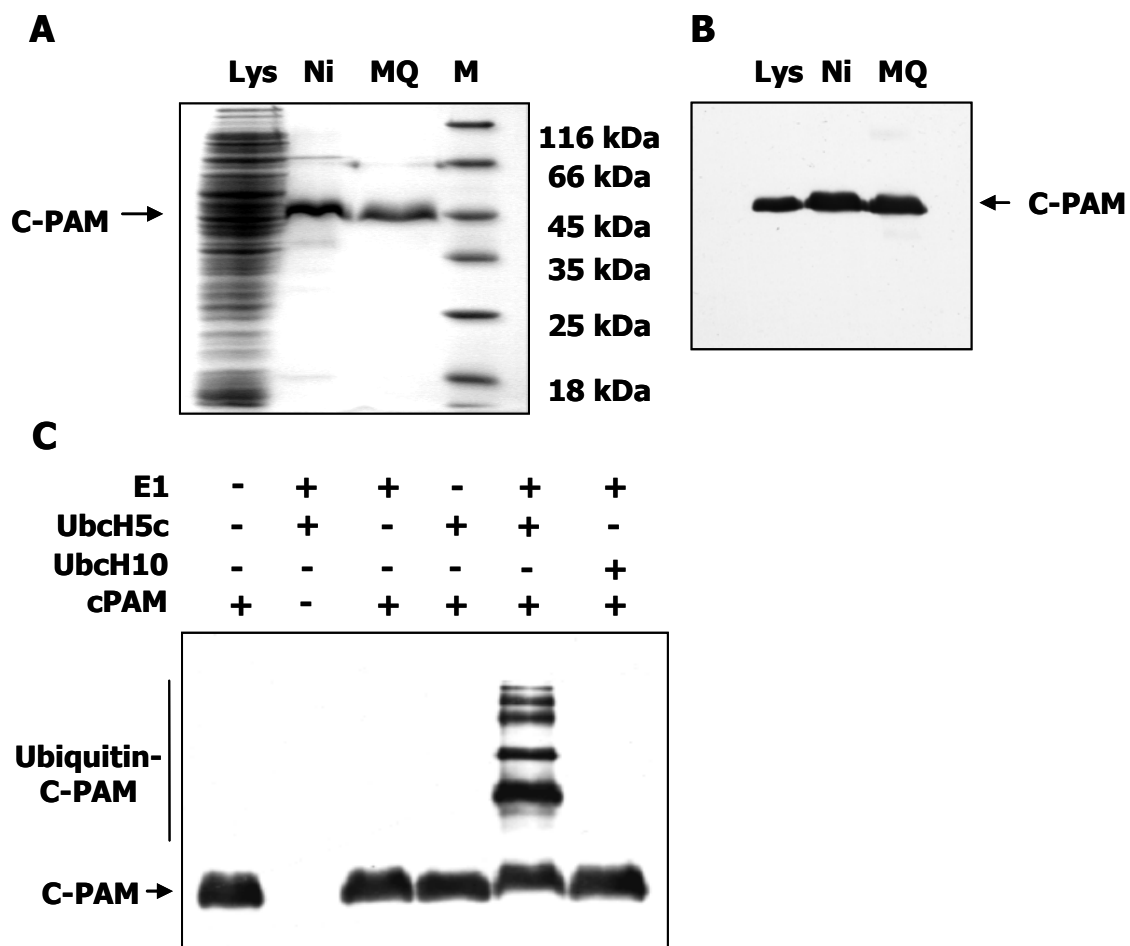


Abbildung 3-3 C-PAM besitzt Auto-Ubiquitinierungsaktivität

(A) Coomassie Bild der C-PAM Aufreinigung. Lys: Bakterienlysat (30 µg); Ni: Eluat der Ni-NTA Agarose; MQ konzentriertes Eluat der MonoQ Säule (2 µg) Zur besseren Orientierung ist ein Proteingrößenstandard aufgetragen (B) Wie (A), nur Immunoblot mit dem anti-Xpress Antikörper, der das Penta-Histidin-TAG von C-PAM detektiert (C) Für die Auto-Ubiquitinierungsreaktion wurden 200 nM C-PAM, 50 nM rabbit E1 Enzym, 500 nM des jeweiligen E2 Enzyms mit 0,15 µg/µl GST-Ubiquitin in Reaktionspuffer inkubiert. Die Proteine wurden nach Western Blot mit dem Anti-Xpress Antikörper detektiert

3.2. PAM ist eine Ubiquitinligase für TSC2

TSC2 zählt zu den möglichen Zielproteinen von PAM. In Neuronen und PC12 Zellen sind beide Proteine ko-lokalisiert und bilden einen immunopräzipitierbaren Komplex³. Ein Knock-out des PAM Homologs im Zebrafisch führt zu einer Akkumulation von phosphoryliertem TSC2 in Retikolozyten^{16, 78}. Dies ist insofern bedeutend, als dass die Phosphorylierung von TSC2 als Erkennungssignal für einen proteasomalen Abbau diskutiert wird¹⁰³. Ohne PAM-Expression kommt es also möglicherweise zu einer Störung der TSC2 Degradation.

3.2.1. PAM und TSC2 bilden einen Komplex in HeLa Zellen

Um nachzuweisen, dass PAM und TSC2 auch in dem verwendeten Model System einen stabilen Komplex bilden, wurden HeLa Zellen zunächst in Co-IP Puffer aufgeschlossen. Anschließend wurde mit einem TSC2-spezifischen Antikörper endogenes TSC2 samt assoziierten Proteinen aus dem Lysat immunopräzipitiert und das Präzipitat per Immunoblot analysiert. TSC2 präzipitierte nur in Anwesenheit des spezifischen Antikörpers (Abbildung 3-4 Spur +AK). Ein unspezifisches Binden an die den Antikörper bindende A/G Agarose wurde nicht beobachtet (Spur –AK). Eine Analyse derselben Membran mit dem anti-PAM Antikörper wies Ko-immunopräzipitiertes PAM auf Höhe des als Kontrolle aufgetragenen aufgereinigten PAM's nach. Zusätzlich wird von dem PAM-Antikörper eine langsamer migrierende Bande detektiert. Hier handelt es sich möglicherweise um eine modifizierte Variante (Glykosilierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung) von PAM, deren Binden an TSC2 nicht beeinträchtigt ist. Wurde die Immunopräzipitation mit stringenterem RIPA Puffer durchgeführt, konnte eine Ko-Präzipitation von PAM mit TSC2 nicht mehr nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies war von Bedeutung für spätere Experimente, in denen immunopräzipitiertes TSC2 ohne assoziiertes PAM verwendet werden sollte.

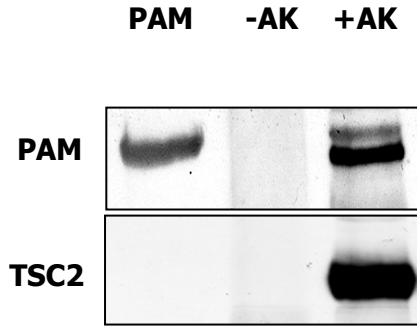


Abbildung 3-4 PAM Ko-Immunopräzipitiert mit TSC2 aus HeLa Lysat

HeLa Zellen wurden mit Co-IP Puffer lysiert, das Lysat mit einem TSC2 Antikörper inkubiert und dieser mit Protein A/G Agarose immunopräzipitiert. Aus dem Lysat präzipitierte Proteine wurden per Western Blot auf TSC2 analysiert, die Membran mit Stripping Puffer inkubiert und anschließend auf ko-präzipitiertes PAM analysiert. Als Kontrolle wurde eine Immunopräzipitation ohne TSC2 Antikörper durchgeführt. Zusätzlich wurde bei der Gelelektrophorese aufgereinigtes PAM aufgetragen, um PAM in dem Immunopräzipitat leichter identifizieren zu können.

3.2.2. PAM kann TSC2 ubiquitinieren

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob PAM seinen Interaktionspartner TSC2 ubiquitinieren kann. Dazu wurde TSC2 aus HeLa Zellen unter stringenten Bedingungen mit RIPA Puffer immunopräzipitiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit PAM, E1 und E2-UbcH5 in Ubiquitinierungspuffer inkubiert und die Proben im Western Blot analysiert. Die Zugabe von PAM zu der Reaktion führte jedoch nicht zu einer Änderung der TSC2 Signal-Intensität. Eine Abnahme der Signalstärke, die auf einen Abbau von TSC2 hingedeutet hätte, wurde nicht erwartet, da in dem Reaktionsansatz das Proteasom als Abbaukomplex für ubiquitinierte Proteine nicht vorhanden war. Bei einer Ubiquitinierung von TSC2 hätte sich jedoch eine typische TSC-Ubiquitin-Leiter bzw. Akkumulation von hochmolekularen TSC2-Produkten zeigen müssen.

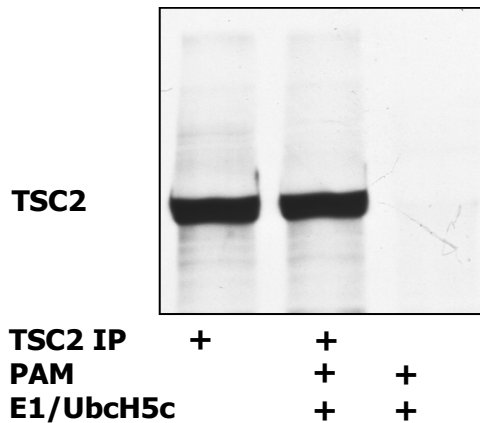


Abbildung 3-5 Immunopräzipitiertes TSC2 wird nicht durch PAM ubiquitiniert

Immunopräzipitiertes TSC2 wurde mit 100 nM PAM, 50 nM E1-Enzym, 500 nM E2 Enzym UbcH5c und 0,15 µg/µl GST-Ubiquitin in Reaktionspuffer inkubiert und anschließend in Lämmli aufgeköcht. Das Präzipitat wurde nach Western Blot mit dem TSC2 Antikörper analysiert.

Als mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer Ubiquitinierung kommt eine Besonderheit Eigenschaft einiger RING E3-Ligasen in Frage: Sie benötigen zusätzliche Adaptor Proteine um ihr Ziel-Protein effizient ubiquitinieren können¹⁴⁵. Daher wurde im nächsten Schritt HeLa Zell Lysat anstelle von immunopräzipitiertem TSC2 verwendet. Im Lysat sollten alle weiteren benötigten Komponenten und Ko-Faktoren für eine PAM-abhängige Ubiquitinierung vorliegen. Unter diesen Bedingungen konnte per Western Blot Analyse eine Abnahme des TSC2 Signals durch Zugabe von aufgereinigtem PAM nachgewiesen werden (Abbildung 3-6 A). In den Kontrollspuren blieb die Signal Intensität unverändert, so dass von einem PAM-abhängigen Abbaumechanismus ausgegangen werden kann. Die PAM-vermittelte Degradation von TSC2 alleine ist jedoch noch kein Beweis für eine Ubiquitinierung von TSC2. Um einen Abbau durch Proteasen auszuschließen bzw. um die Ubiquitin-vermittelte Degradation über das Proteasom nachzuweisen, wurde der Versuch unter Zugabe von MG132 wiederholt. Das Tripeptid-Aldehyd MG132 hemmt die enzymatische Aktivität des Proteasoms¹⁴⁶. In Folge dieser Blockade kommt es zu einer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen. Tatsächlich zeigte die Analyse des Lysates mit dem anti-TSC2 Antikörper, dass der Abbau des Proteins durch Zugabe von MG132 verhindert werden kann (Abbildung 3-6 B). Gleichzeitig ließ sich die PAM-abhängige Polyubiquitinierung von TSC2 durch das Auftreten eines leiterähnliches Verwischen des TSC2-Signals in den hochmolekularen Bereich bestätigen. Die gleichmäßige Verteilung von Proteinlysate auf die verschiedenen Ansätze, vor allem aber die Spezifität der

Ubiquitinierungsreaktion konnte durch einen Immunoblot auf HSP70 nachgewiesen werden. HSP70 wird unter den gewählten Bedingungen weder degradiert noch polyubiquitiniert. Dies ist insofern bedeutend, als dass dieses Protein ebenfalls über das Proteasom degradiert werden kann¹⁴⁷. Eine unspezifische Aktivierung von Ubiquitinligasen ließ sich somit ausschließen. Der Austausch von PAM gegen C-PAM führte unter den gleichen Reaktionsbedingungen nicht mehr zu einer Ubiquitinierung von TSC2 (Abbildung 3-6 C), obwohl C-PAM die katalytische RING Finger Domäne als auch die TSC2 Bindungsstelle besitzt³. An der Ubiquitinierung von TSC2 müssen also auch noch andere Proteindomänen von PAM beteiligt sein.

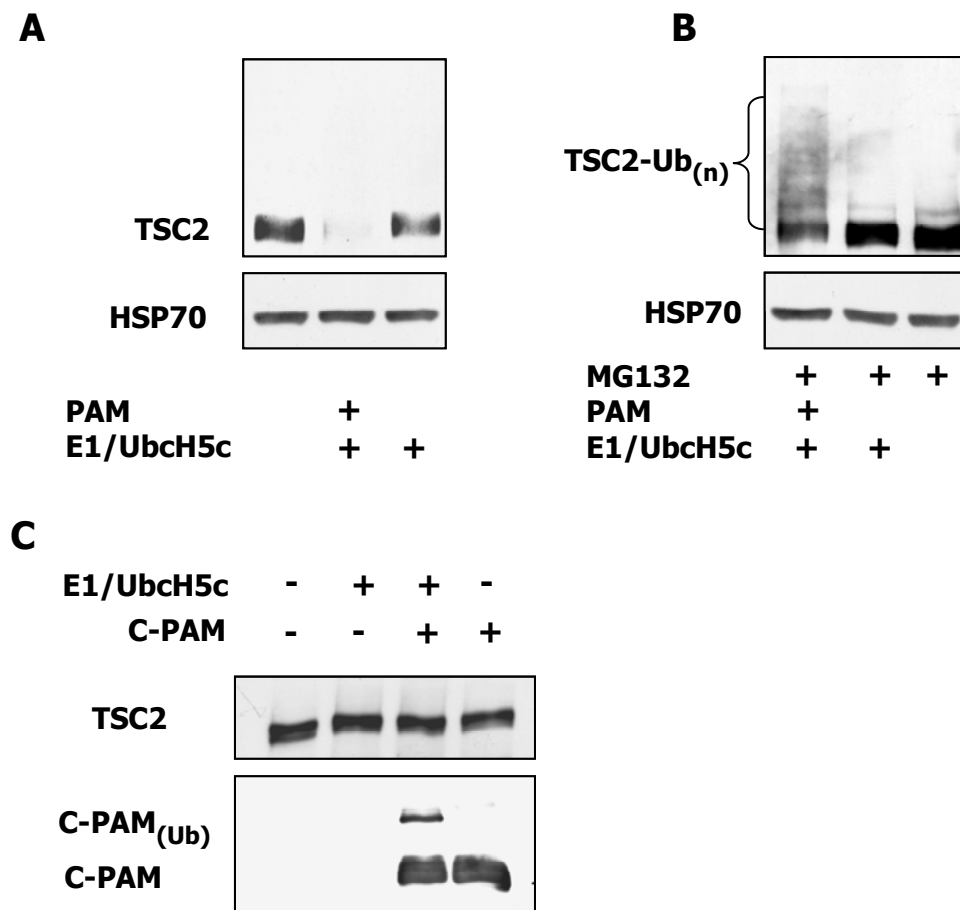


Abbildung 3-6 TSC2 wird PAM-abhängig ubiquitiniert

(A) HeLa Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert, in Lysispuffer durch Ultraschall aufgeschlossen und 20 µg Protein mit 100 nM PAM, 50 nM rabbit E1-Enzym, 500 nM E2 Enzym UbcH5c und 0,15 µg/µl GST-Ubiquitin in Reaktionspuffer inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Lämmli erfolgte eine Analyse des TSC2 Proteingehaltes mittels Immunoblot. Die gleichmäßige Beladung mit Protein wurde durch Immunoblot auf HSP70 bestätigt. (B) Wie (A) nur zusätzlich 50 µM MG132 in Reaktionspuffer um proteasomalen Abbau zu verhindern. (C) Wie (A), statt PAM wurde C-PAM verwendet.

3.3. Der TSC2 Status wird nicht durch S1P beeinflusst

3.3.1. S1P führt nicht zum Abbau oder Phosphorylierung von TSC2

In HeLa Zellen induziert S1P eine Aktivierung von PAM, die sich unter anderem durch eine Translokation an zelluläre Membranen sowie eine Hemmung der Adenylyl-Zyklase Aktivität äußert ⁶. Nachdem eine PAM-abhängige Ubiquitinierung von TSC2 gezeigt werden konnte (3.2.2), sollte überprüft werden ob eine Behandlung mit S1P zu einer proteasomalen Degradation von TSC2 führt. Die HeLa Zellen wurden daher unter verschiedenen Bedingungen mit S1P stimuliert und die Menge an TSC2 Protein per Immuno Blot analysiert. Es zeigte sich jedoch weder eine S1P-abhängige Abnahme des TSC2 Signals, was auf dessen Degradierung hingedeutet hätte, noch konnte nach Blockade des Proteasoms mit MG132 eine Akkumulation von polyubiquitiniertem TSC2 nachgewiesen werden (Abbildung 3-7 **A+B**). Zusätzlich wurde eine Immunopräzipitation von TSC2 aus Proteasom-blockierten Zellen durchgeführt. Der Betrag an ubiquitiniertem TSC2 im Präzipitat wurde mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper analysiert. Im Präzipitat aus den Kontroll- als auch den S1P behandelten Zellen konnten geringe Mengen an TSC2-Ubiquitin Konjugaten nachgewiesen werden. Der Anteil an TSC2-Ubiquitin blieb nach S1P Stimulation jedoch unverändert, es kam zu keiner weiteren TSC Ubiquitinierung über das basale Niveau hinaus (Abbildung 3-7 **C**).

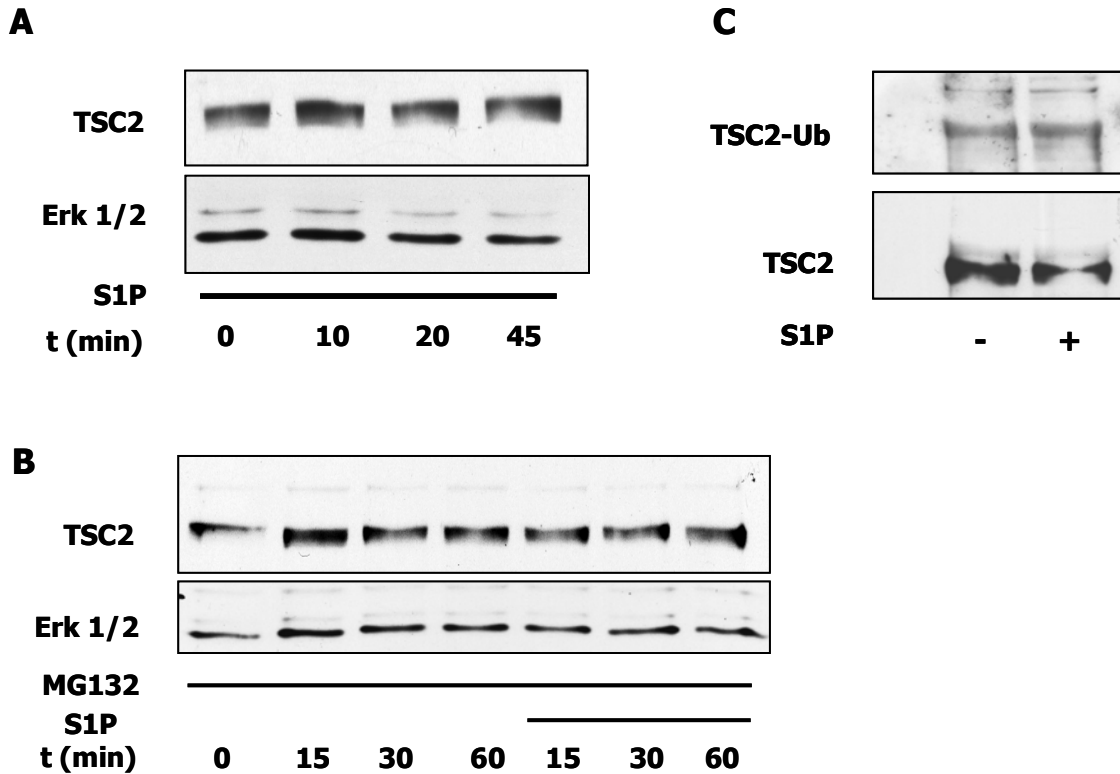


Abbildung 3-7 S1P induziert nicht den Abbau von TSC2

(A) HeLa Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit 0,5 μ M S1P für verschiedene Zeiträume inkubiert, geerntet und per Western Blot auf TSC2 untersucht. Als Kontrolle für gleichmäßige Beladung der verschiedenen Spuren wurde die Western Blot Membran zusätzlich auf die Proteine Erk1/2 untersucht. (B) Wie (A), zusätzlich wurden 3 Schalen mit 50 μ M des Proteasom Inhibitors MG132 inkubiert, um den Abbau von ubiquitinierten Proteinen zu verhindern. (C) Wie (A), die Zellen wurden während der 60 minütigen S1P Stimulation zusätzlich mit 50 μ M MG132 inkubiert um den proteasomalen Abbau von ubiquitinierten Proteinen zu verhindern. Die Zellen wurden anschließend in RIPA Puffer aufgeschlossen und das TSC2 Protein immunopräzipitiert. Das TSC2-Präzipitat wurde per Immunoblot zunächst auf ubiquitinierte Proteine und nach Strippen der Membran auf TSC2 selbst analysiert.

Oftmals sind Proteinmodifikation nötig, damit eine Ubiquitinligase ihr Zielprotein erkennen kann¹⁰⁷. Im Fall von TSC2 gibt wird eine Hyperphosphorylierung des Proteins als eine solche Modifikation diskutiert¹⁰³. Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungsstatus von TSC2 nach S1P Stimulation der HeLa Zellen untersucht. Nach S1P Behandlung war jedoch kein TSC2-Mobilitätsshift von TSC2, der auf eine verstärkte Phosphorylierung hingedeutet hätte, detektierbar. Per se ist diese verlangsamte Migration von TSC2 in einer SDS PAGE¹⁴⁸ jedoch nachweisbar, wie eine Stimulation der Zellen mit dem unspezifischen Kinaseaktivator Pervanadat zeigte (Abbildung 3-8 A). Zusätzlich wurde die spezifische Phosphorylierung von TSC2 an der Aminosäure Thr1462 untersucht. Tee et al. berichteten, dass eine Insulinstimulation in verschiedenen Zelltypen eine Phosphorylierung von TSC2 an

dieser Stelle bewirkt. Die Modifikation dieses regulatorischen Thr1462 korreliert mit einer Inaktivierung von TSC2¹⁴⁹. Der Effekt als solcher ließ sich durch Insulinbehandlung der HeLa Zellen reproduzieren. Eine S1P Stimulation hatte allerdings keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Thr1462 (Abbildung 3-8 B).

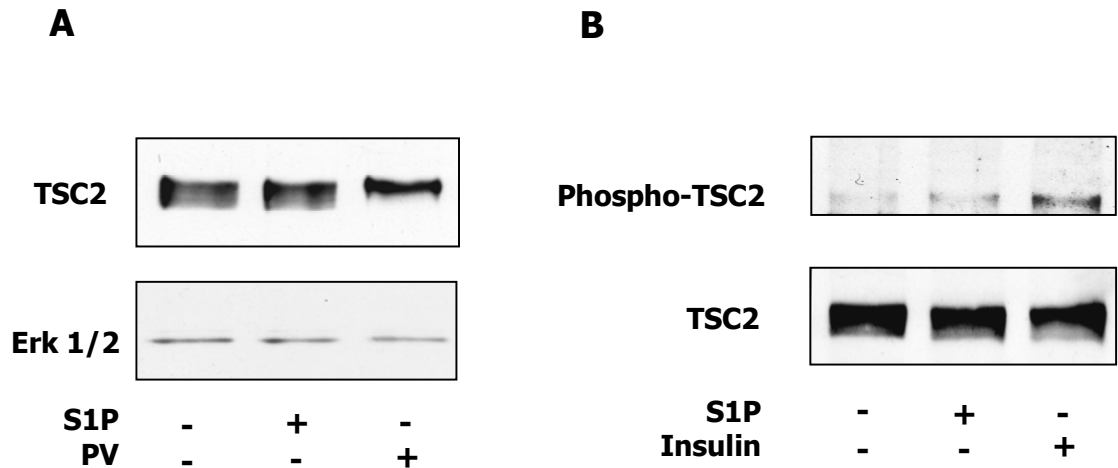


Abbildung 3-8 S1P führt nicht zu einer Phosphorylierung von TSC2

(A) HeLa Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert, für 30 Minuten mit 0,5 μ M S1P oder 50 μ M Pervanadat inkubiert und mit kochendem 1x Lämmli geerntet und nach Western Blot dem Anti-TSC2 Antikörper untersucht. Die langsamere Migration der TSC2 Bande ist indikativ für verstärkte Phosphorylierung. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden durch Detektion von Erk1/2 analysiert. (B) Wie (A) nur zusätzlich Stimulation mit 170 nM Insulin als Positiv-Kontrolle. Die Analyse der Lysate erfolgte per Immunoblot mit einem phospho-spezifischen Antikörper auf Threonin 1462 von TSC2, als Ladekontrolle wurde zusätzlich die Gesamtmenge an TSC2 analysiert

3.3.2. S1P verhindert die PAM-TSC2 Interaktion nicht

Im nächsten Schritt sollte der Effekt einer S1P Behandlung auf den Status einer der PAM-TSC2 Interaktion untersucht werden. Die Analyse durch Immunzytochemie zeigte eine nahezu vollständige Ko-Lokalisation der beiden Proteine. Die Zugabe von S1P führte zu keiner nachweisbaren Dissoziation des Komplexes (Abbildung 3-9 A). Konsequenterweise blieb nach Immunopräzipitation von TSC2 die Menge an ko-präzipitiertem PAM unverändert. (Abbildung 3-9 B).

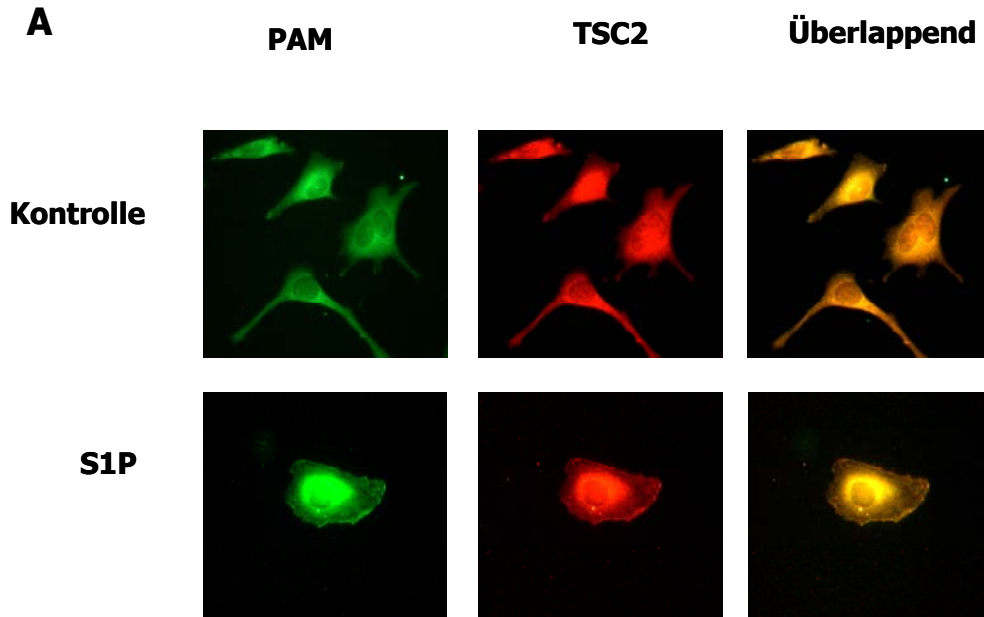
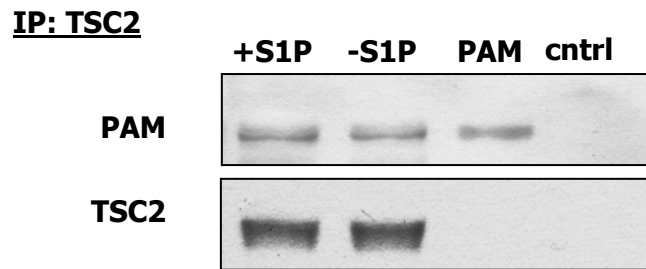
**B**

Abbildung 3-9 S1P vermindert nicht die PAM-TSC2 Interaktion

(A) HeLa Zellen wurden nach 24stündiger Inkubation in serumfreiem Medium vor oder nach Stimulation mit 0,5 μ M S1P fixiert und die TSC2 / PAM Lokalisation untersucht. Der TSC2 Antikörper wurde durch Cy3-markierten Sekundärantikörper detektiert, der verwendete Anti-PAM Antikörper war aufgrund von Markierung mit FITC Molekülen direkt nachweisbar. (B) Immunopräzipitation von TSC2 aus HeLa Zellen, mit oder ohne S1P Behandlung. Als Kontrolle wurde eine IP mit einem unspezifischen rabbit Ig Antikörper durchgeführt. Das Präzipitat wurde zunächst per Western Blot auf PAM analysiert, danach wurde die Membran gestriipt und auf TSC2 getestet.

3.4. S1P aktiviert den mTOR Signalweg über PAM

3.4.1. S1P führt zur Phosphorylierung von mTOR an Serin 2448

TSC2 hat direkten, inhibitorischen Einfluss auf das membranständige kleine G Protein Rheb, welches wiederum die Proteinkinase mTOR aktiviert (siehe 1.2.2). Eine Steigerung der Rheb-Aktivität bzw. eine Hemmung von TSC2 führt daher zu einer Verstärkung der mTOR Kinaseaktivität. Diese Aktivierung geht mit einer Phosphorylierung von mTOR an einem spezifischen Serin (Ser2448) einher. Diese wird daher als ein Erkennungszeichen für eine gesteigerte mTOR Aktivität diskutiert^{100, 150, 151}.

Da ein PAM-abhängiger Abbau von TSC2 nach S1P Behandlung nicht beobachtet werden konnte, wurden mögliche Auswirkungen auf das dem TSC2 nach geschaltete mTOR überprüft. Tatsächlich konnte eine verstärkte Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 nach S1P Gabe nachgewiesen werden. Diese setzte bei Konzentrationen von 100 nM S1P ein und erreichte bei 1 μ M die höchste Intensität (Abbildung 3-10 A). Eine Signal-Verstärkung über Basal-Niveau war nach 10 Minuten nachweisbar und begann sich erst nach über 90 Minuten abzuschwächen (Abbildung 3-10 B). HeLa Zellen exprimieren mRNA für alle 5 beschriebenen S1P-Rezeptor Subtypen⁶. Da nur für die ersten 3 Rezeptortypen ein Agonist bzw. Antagonisten erhältlich sind, konnte eine Rolle der Subtypen S1P₄ und S1P₅ nicht untersucht werden.

Der S1P₁ Agonist SEW-2871 konnte den S1P Effekt nicht imitieren. Die Behandlung der HeLa Zellen mit S1P in Gegenwart des S1P₂ Antagonisten JTE-013 verhinderte die mTOR Phosphorylierung nicht. Die Gabe des S1P₃ Antagonisten Cay-10444 alleine führte bereits zu einer mTOR Phosphorylierung (Abbildung 3-10 C). Dies könnte bedeuten, dass die Signaltransduktion über den S1P₃ Rezeptoren den mTOR Weg konstitutiv hemmt, oder aber dass der Hemmstoff Cay10444 bei der eingesetzten Konzentration (50 μ M) nicht mehr selektiv auf einen S1P-Rezeptor wirkt.

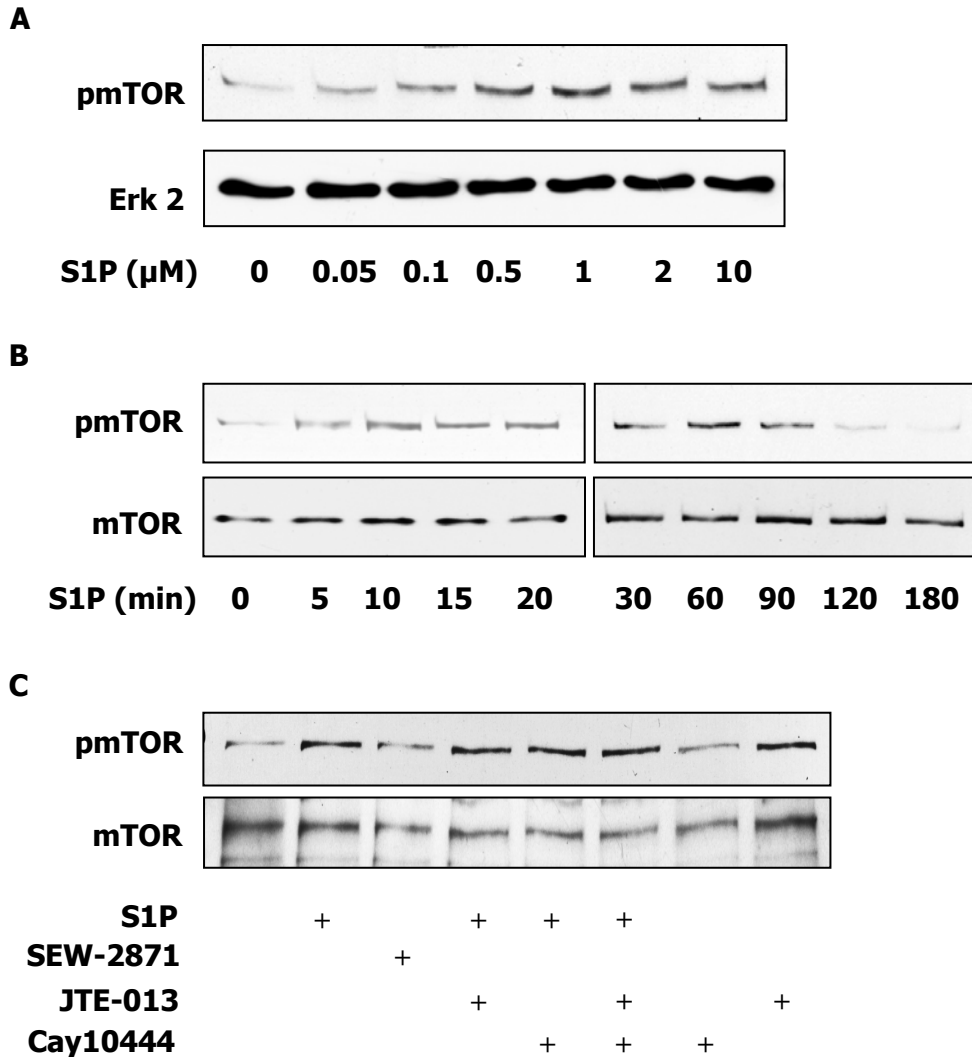


Abbildung 3-10 S1P führt zu einer Phosphorylierung an Serin 2448

(A) HeLa Zellen wurden zunächst für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert, anschließend erfolgte eine Stimulation mit ansteigenden S1P Konzentrationen. Die Zellen wurden nach 30 Minuten in kochendem 1x Lämmli geerntet und das Lysat per Immunoblot auf Phosphorylierung von mTOR an Serin 2448 untersucht. Als Ladekontrolle diente Erk2. (B) Stimulation der HeLa Zellen mit 0,5 μM S1P über einen Zeitraum von 3 Stunden. Immunoblot wie (A), als Ladekontrolle wurde die Gesamtmenge an mTOR detektiert. (C) HeLa Zellen wurden mit vor der Inkubation mit 0,5 μM S1P für 10 Minuten mit dem S1P₂-Rezeptor Antagonist JTE-013 (500 nM), dem S1P₃-Antagonisten Cay10444 (50 μM) oder einer Kombination aus beiden behandelt. Mit Beginn der S1P Stimulation für 30 Minuten wurde auch der S1P₁-Rezeptor Agonist SEW-2871 (20 μM) zu einem Ansatz gegeben. Nach der Detektion von phospho mTOR (pmTOR) wurde die Membran mit Stripping Puffer behandelt und anschließend auf das gesamte mTOR Protein analysiert.

3.4.2. Die Phosphorylierung von mTOR führt zu dessen Aktivierung

Um nachzuweisen, dass die Phosphorylierung von mTOR am regulatorischen Serin 2448 nach S1P Stimulierung tatsächlich mit seiner Aktivierung einhergeht, wurden zwei Zielproteine von mTOR auf eine Phosphorylierung untersucht. Bei diesen beiden Proteinen handelt es sich zum einen um die p70 S6 Kinase (p70S6K), die nach Phosphorylierung durch mTOR translationelle Vorgänge aktiviert und die Ribosomenbiogenese steuert, zum anderen um das 4E-Bindeprotein1 (4E-BP1), das durch mTOR phosphoryliert wird und dadurch seine inhibitorischen Eigenschaften auf die mRNA Translation verliert (siehe Abbildung 1-3).

Nach Stimulierung mit S1P kam es zu einer Phosphorylierung der p70S6K und des 4E-BP1 (Abbildung 3-11 **A+B**). Entscheidend war, neben diesem Effekt, die Beobachtung, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Rapamycin die Phosphorylierungsreaktion verhinderte. Die Tatsache, dass dieser mTOR Inhibitor den S1P Effekt auf die p70S6K und das 4E-BP aufhebt, zeigt also zweifelsfrei die mTOR-Abhängigkeit der Reaktion. Somit konnte bei einem Nachweis der Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 im Folgenden auch von einer Aktivierung der Kinaseaktivität ausgegangen werden.

Interessanterweise ließ sich die S1P induzierte mTOR Phosphorylierung an Ser2448 partiell durch Rapamycin verhindern (Abbildung 3-11 **C**). Möglicherweise ist also mTOR selbst oder eine von mTOR aktivierte Kinase (beispielsweise p70S6K) an dieser Phosphorylierung beteiligt.

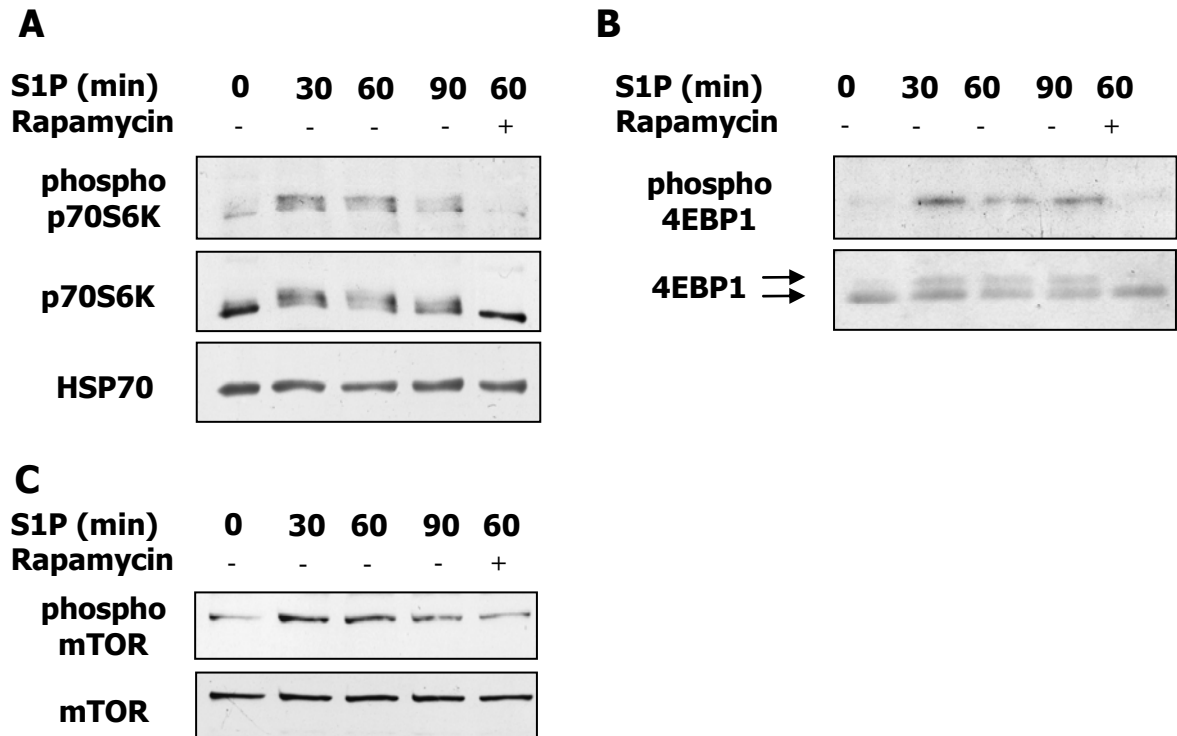


Abbildung 3-11 Zielproteine von mTOR werden nach S1P Stimulation phosphoryliert

(A) HeLa Zellen wurden für 34 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert, anschließend mit 0,5 μ M S1P für 30 Minuten stimuliert und danach in kochendem Lämmli geerntet. Das Zell-Lysat wurde in einer 10%igen SDS PAGE aufgetrennt und per Immunoblot auf phospho p70S6Kinase untersucht. Als Ladekontrolle wurde der Proteingehalt von Erk2 analysiert (B) Wie (A), Analyse von phospho 4E-BP1 und als Ladekontrolle Gesamt 4E-BP1 per Immunoblot. (C) Wie (A), zusätzlich Stimulation mit 20% FCS und Behandlung der Zellen mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin (500 nM).

3.4.3. Die Phosphorylierung von mTOR nach S1P ist ERK AKT und PI3K unabhängig

In vielen Signalwegen ist die Inhibition des negativen Regulators TSC2 der zu Grunde liegende Mechanismus der mTOR Aktivierung. In Abhängigkeit des primären Stimulus erfolgt diese Inhibierung mittels Phosphorylierung durch eine der Proteinkinasen ERK, AKT oder PI3K. Für alle drei Kinasen wurde bereits eine S1P induzierte Aktivierung, unabhängig vom TSC2 / mTOR Weg, beschrieben⁴³⁻⁴⁵. Bei Versuchen mit kinasespezifischen Inhibitoren konnte jedoch weder ein ERK-Inhibitor (U0126), noch ein AKT Inhibitor oder der PI-3Kinase Inhibitor Wortmannin die Phosphorylierung von mTOR nach S1P Stimulation verhindern (Abbildung 3-12). TSC2 wird also weder durch eine der 3

Kinasen inaktiviert, noch sind diese für eine direkte Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 verantwortlich.

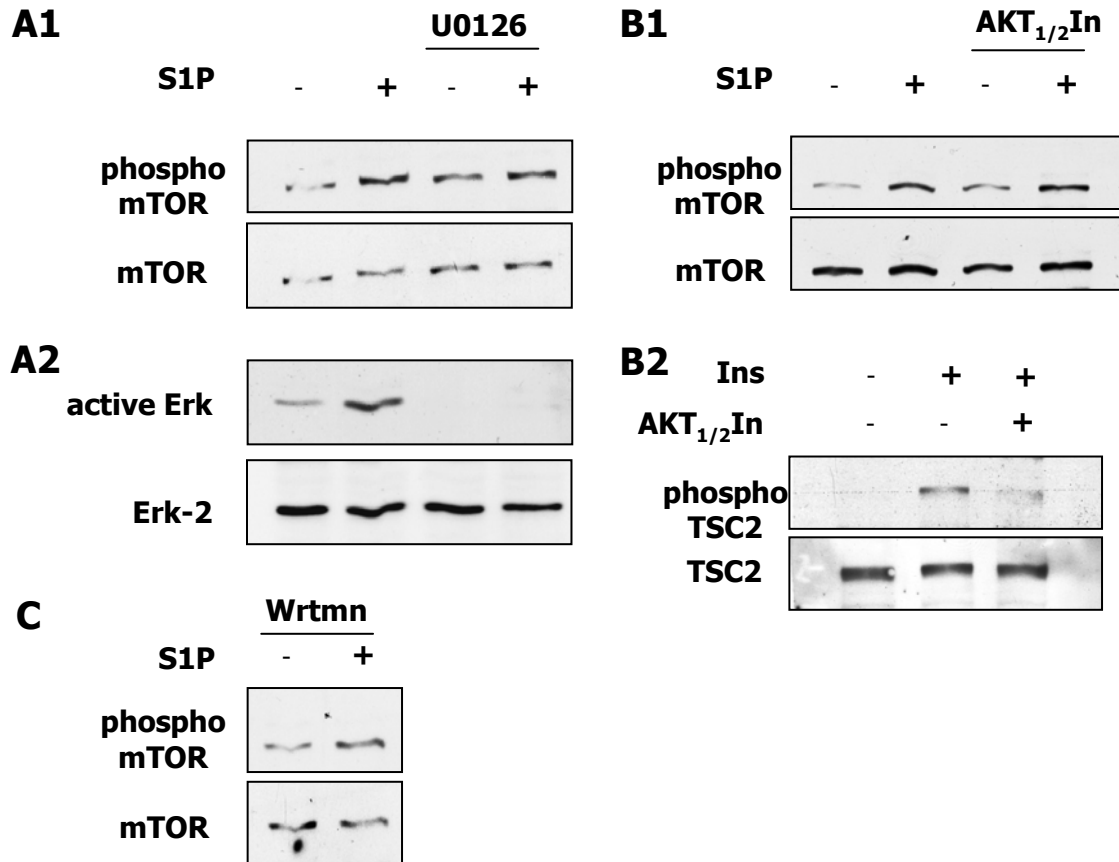


Abbildung 3-12 ERK, AKT und PI3K unabhängige mTOR Phosphorylierung

HeLa Zellen wurden zunächst für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und für 30 Minuten mit dem angegebenen Inhibitor vorinkubiert. Es folgte die Stimulation mit 0,5 μ M S1P in Anwesenheit des Inhibitors für 30 Minuten, anschließend wurden die Zellen in heißem 1x Lämmli geerntet. **(A1)** Immunoblot auf phospho mTOR in An- / Abwesenheit des ERK Inhibitors U0126 (30 μ M). Als Ladekontrolle wurde der mTOR Gehalt analysiert **(A2)** Wie (A), Immunoblot auf active-ERK, um die Hemmung der Kinase nachzuweisen. Als Ladekontrolle wurde die Gesamtmenge von ERK mit dem ERK2 Antikörper detektiert. **(B)** Wie (A), Inhibition der AKT-Kinase durch den „AKT1/2-Inhibitor“ (1 μ M). **(B2)** Um die Wirksamkeit des Inhibitors zu überprüfen wurde als Kontrolle die AKT-abhängige Phosphorylierung von TSC2 nach Insulin überprüft. Gleichmäßige Beladung wurde durch Analyse des TSC2 Gehaltes analysiert. **(C)** Wie (A), Stimulation der Zellen in Anwesenheit des PI3 Kinase – Inhibitors Wortmannin (200 nM).

3.4.4. Inhibitoren der S1P vermittelten PAM Aktivierung verhindern auch eine mTOR Aktivierung

Der Zeitverlauf der S1P induzierten mTOR Phosphorylierung korreliert mit der PAM Aktivierung nach S1P Gabe ⁶. Um zu überprüfen, ob PAM an diesen Vorgängen beteiligt ist, wurden die Auswirkungen von verschiedenen Inhibitoren einer S1P induzierten PAM Aktivierung auf die mTOR Phosphorylierung getestet. Tatsächlich reagierte die S1P → mTOR Kaskade sensitiv auf Pertussis Toxin, U73122 und Ro31-8220 Behandlung (Abbildung 3-13 A), während der Calciumchelator BAPTA-AM keinen Einfluss hatte. Die Signalübermittlung erfolgt also über ein S1P-Rezeptor gekoppeltes Go/i Protein, Phospholipase C und Proteinkinase C, aber unabhängig von den intrazellulären Calcium-Speichern.

Da PAM die cAMP Synthese hemmen kann⁴⁻⁶, musste zudem der Einfluss der intrazellulären cAMP Konzentration auf die beobachtete mTOR Phosphorylierung geklärt werden. Zu diesem Zweck wurden die HeLa Zellen zunächst mit dem direkten Adenylyl-Zyklase Aktivator Forskolin inkubiert. Diese Vorbehandlung übte jedoch keinen Einfluss auf die untersuchten Vorgänge aus (Abbildung 3-13 B). Die Rolle von cAMP bzw. die PAM-abhängige Hemmung seiner Synthese kann also vernachlässigt werden.

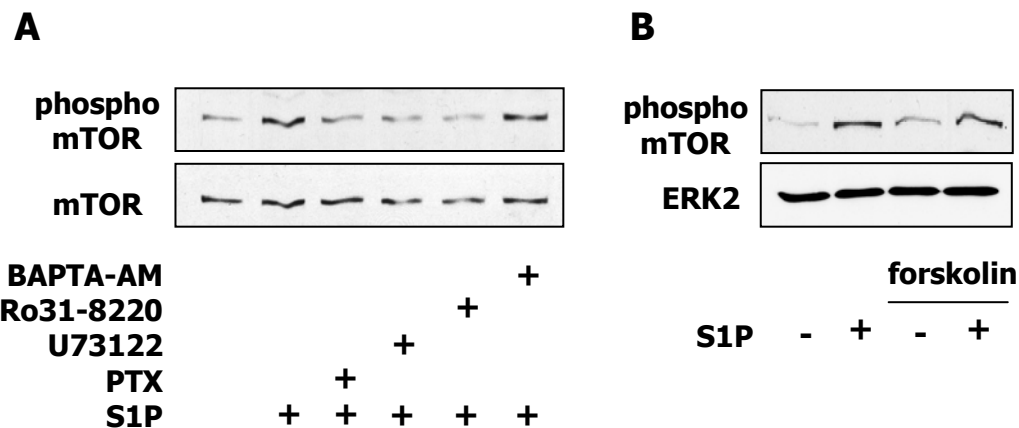


Abbildung 3-13 mTOR wird Go/i, Phospholipase C und PKC- abhängig phosphoryliert

(A) HeLa Zellen wurden vor der Stimulation für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Vor der Zugabe von 0,5µM S1P für 30 Minuten wurden sie mit verschiedenen Inhibitoren vorinkubiert: 24 Stunden mit 1 µg/ml Pertussis Toxin (PTX); 20 Minuten mit 5 µM Ro31-8220, 1 µM U73122 oder 10 µM BAPTA-AM. Die Zellen wurden in heißem 1x Lämmli geerntet und die Phosphorylierung von mTOR durch Immunoblot analysiert. (B) Wie (A) nur 10minütige Vorinkubation mit 10 µM Forskolin. Analyse der Beladung hier mit Erk-2 durchgeführt.

3.4.5. Erhöhung der intrazellulären PAM Konzentration führt zu einer verstärkten mTOR Phosphorylierung nach S1P Stimulation

Um die These eines Einfluss' von PAM auf die mTOR Aktivierung zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt aufgereinigtes PAM in Form von liposomalen Komplexen (siehe 2.6.3) in HeLa Zellen transfiziert. Ziel war es, die intrazelluläre PAM Konzentration zu erhöhen, um einen möglichen PAM-abhängigen Effekt besser erkennen zu können. Die basale mTOR Phosphorylierung wurde durch die erhöhte PAM Konzentration nicht verändert. Nach Stimulierung mit S1P zeigte sich in den PAM transfizierten Zellen aber eine deutlich stärkere Phosphorylierung von mTOR im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 3-14 A und B). Die PAM-abhängigen Effekte werden also erst durch die S1P Behandlung eingeleitet. Die Proteinmenge von TSC2 blieb durch die liposomale Transfektion mit PAM bzw. die folgende S1P Stimulation unverändert. Die per se mögliche Ubiquitinierung von TSC2 durch PAM spielt also keine Rolle.

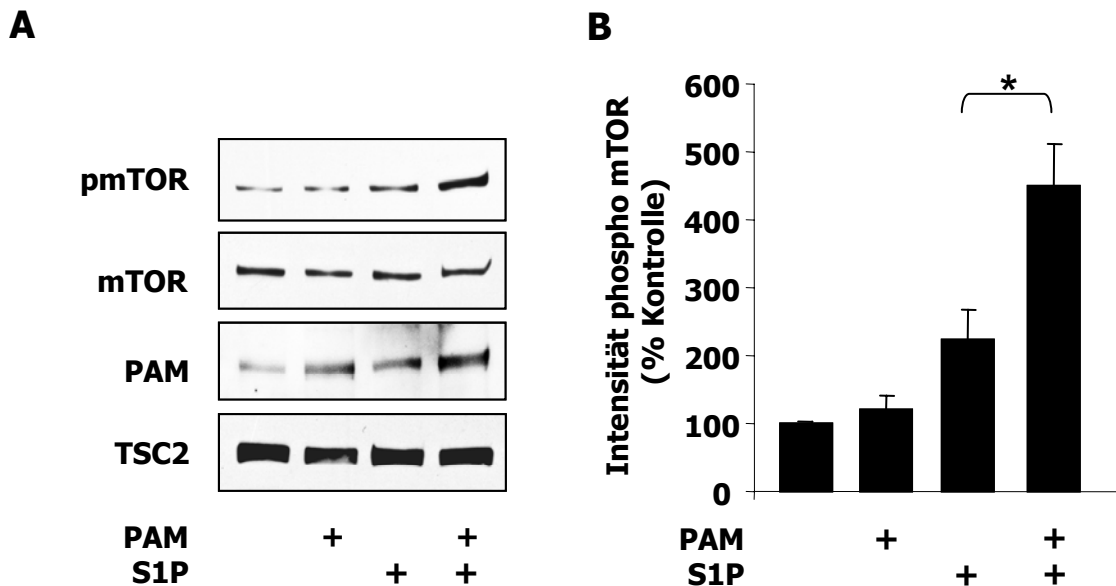


Abbildung 3-14 Erhöhung der intrazellulären PAM Konzentrationen erhöht die Sensitivität der S1P induzierten mTOR Phosphorylierung

(A) Aufgereinigtes PAM wurde mit BioPorter Reagenz vermischt, inkubiert und die Lipo-Proteinkomplexe zu den HeLa Zellen gegeben. Nach 4h wurde die Zellen stimuliert, geerntet und per Western Blot auf phospho mTOR, mTOR, PAM und TSC2 untersucht. Die Proteintransfektion von PAM wurde durch Immunoblot überprüft. (B) Die Intensität der phospho-mTOR Bande wurde in Relation zur mTOR Bande gesetzt, danach wurden alle Werte als Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen aus 4 unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Standardabweichung vom Mittelwert. (*: $p \leq 0,05$).

3.5. PAM übt GEF (Guanine-Nucleotide-Exchange-Faktor) Aktivität auf Rheb aus

3.5.1. PAM verhindert nicht die TSC2 GAP Aktivität auf Rheb

Die bisherigen Daten legen eine PAM vermittelte Aktivierung von mTOR nach Stimulation mit S1P nahe. Zugleich sprechen sie gegen einen Mechanismus, dem ein Ausschalten des mTOR Signalweg-Inhibitors TSC2 durch Phosphorylierung bzw. Ubiquitin-abhängige Degradation zu Grunde liegt. Daher wurde ein möglicher Einfluss eines weiteren regulatorischen Proteins, Rheb (**R**as **H**omolog **E**nriched in **B**rain), untersucht. Ein für Rheb codierendes Plasmid (freundlicherweise von Herrn Prof. Guan, University of Michigan, zur Verfügung gestellt) wurde in E.coli transfiziert, das GST-getaggte Rheb induziert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abbildung 3-15).

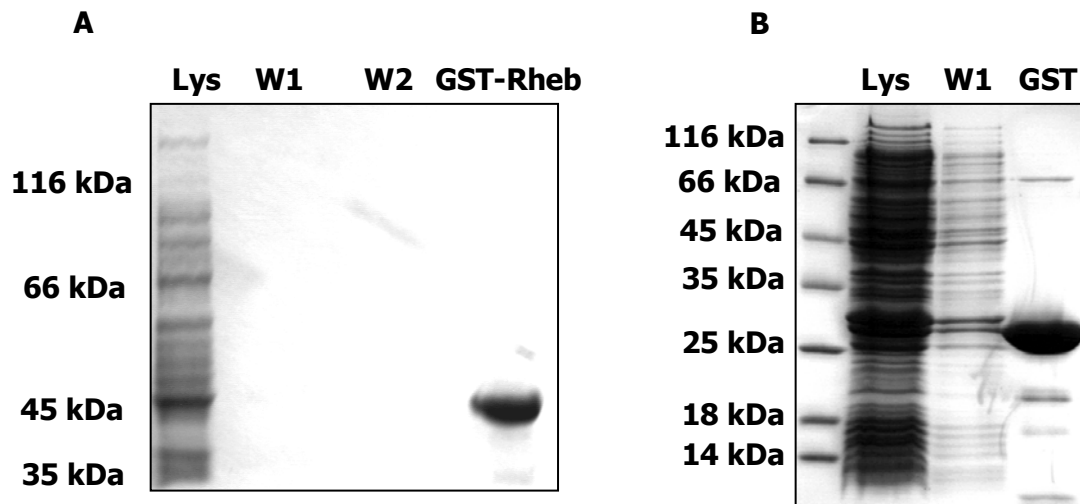


Abbildung 3-15 Aufreinigung von GST-Rheb und GST aus E.coli

(A) Coomassie Bild der GST-Rheb Aufreinigung. Nach Transformation und Induktion in E.coli wurde das Protein wie in 2.7.3 beschrieben mittels GST-Bind Sepharose aufgereinigt. Lys: Bakterienlysate (20 µg); W1: Waschschrift mit ATP-Tris Puffer; W2: Waschschrift mit Nukleotid-Entladungspuffer; GST-Rheb (2 µg) (B) Coomassie Bild der GST Aufreinigung. Transformation und Induktion wie (A) nur mit leerem GST-Expressionsvektor. Lys: Bakterienlysate (30 µg); W1: Waschschrift mit ATP-Tris Puffer, GST (3 µg)

Rheb als ein Guanosinnukleotid bindendes Protein hydrolysiert durch seine intrinsische GTPase Aktivität gebundenes GTP zu GDP und inaktiviert sich dadurch selbst (siehe 1.2.2). Im Gegensatz zu anderen kleinen G Proteinen ist diese GTPase Aktivität bei Rheb sehr

gering, kann allerdings durch Interaktion mit einem GAP (GTPase Activating Protein) gesteigert werden^{96, 97}. Die GTPase Aktivität eines G-Proteins lässt sich in einem „steady-state GTPase“ Versuch (siehe 2.8.3 und Abbildung 3-16) anhand der Menge an freigesetztem Phosphat bestimmen.

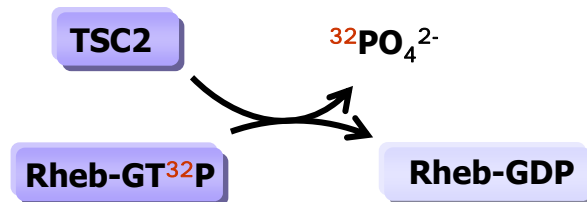


Abbildung 3-16 Schematische Darstellung des steady-state GTPase Versuches

Als GAP für Rheb wurde bereits in verschiedenen Arbeiten TSC2 identifiziert^{92, 95-97}. PAM könnte, durch seine Interaktion mit TSC2, die Deaktivierung von Rheb verhindern und somit indirekt zu einer mTOR Aktivierung beitragen. Im steady-state GTPase Versuch zeigte die Zugabe von PAM zu Rheb jedoch keine Änderung der Phosphat-Freisetzung.

Die Zugabe von immunpräzipitiertem TSC2 verursachte wie erwartet einen starken Anstieg an freiem Phosphat. Eine Inkubation von Rheb, TSC2 und PAM resultierte jedoch nicht zu einer Verminderung, sondern zeigte vielmehr die Tendenz, die Freisetzung von Phosphat weiter zu steigern (Abbildung 3-17).

Daraus konnte geschlossen werden, dass die Interaktion von PAM mit TSC2 zum einen nicht zu einer Inhibierung der GAP Aktivität von TSC2 führt. Außerdem muss der Effekt unabhängig von der Ubiquitinligaseaktivität von PAM zu Stande kommen, da die notwendigen Komponenten (E1, E2, Ubiquitin) nicht im Ansatz vorhanden waren.

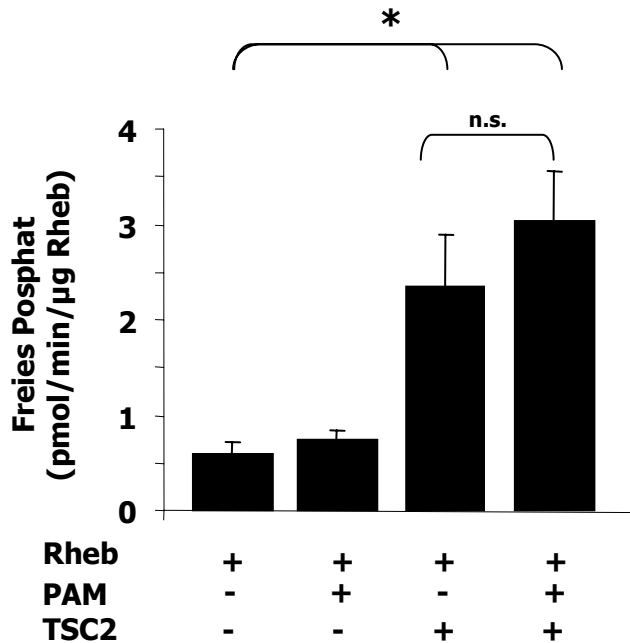


Abbildung 3-17 PAM inhibiert nicht die GAP Aktivität von TSC2 auf Rheb

Aufgereinigtes GST-Rheb (500 nM) wurde mit $GT\gamma^{32}P$ beladen und anschließend zusammen mit 30 nM PAM und stringent immunopräzipitiertem TSC2 in GTPase mit Puffer für 30 Minuten inkubiert. Das freigesetzte Phosphat wurde anschließend per Scintillationsmessung detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen aus 5 unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Standardabweichung vom Mittelwert. (*: $p \leq 0,05$ n.s. nicht signifikant).

3.5.2. PAM erhöht den Nukleotid Austausch an Rheb

Die tendenziell gesteigerte Phosphat-Freisetzung im GTPase Versuch in Anwesenheit von Pam und TSC2 im Vergleich zu Rheb und TSC2 lässt sich auf 2 Wegen erklären:

- (1) PAM könnte die GAP Aktivität von TSC2 weiter steigern. Dies hätte als Konsequenz allerdings eine verstärkte Hemmung von Rheb und somit eine mTOR Inaktivierung zur Folge. Dagegen sprechen allerdings die bisherigen Daten, die eine PAM-abhängige Aktivierung von mTOR zeigen.
- (2) PAM könnte als GEF (Guanine-Nucleotide-Exchange-Faktor) für Rheb fungieren. Im steady-state GTPase Versuch würde PAM dann das Rheb-GDP wieder Rheb-GTP umwandeln, welches dann erneut als Substrat für TSC2 zur Verfügung stünde. In der Summe würde sich dadurch die Menge an freiem Phosphat erhöht (Abbildung 3-18).

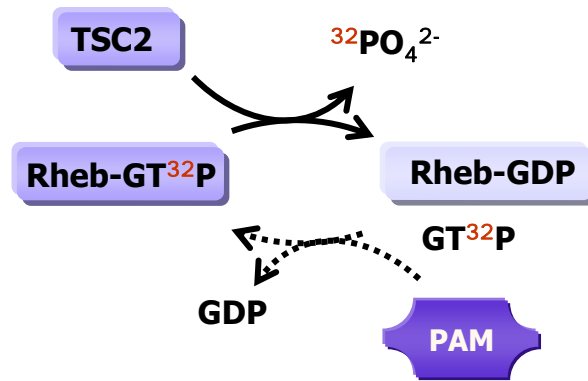


Abbildung 3-18 Schematische Darstellung des steady-state GTPase Versuches in Anwesenheit einer GEF (PAM)

Interessanterweise besitzt PAM eine als „RCC1 like domain“ bezeichnete Region (siehe 1.1). Eine Anzahl anderer Proteine, die eine strukturell ähnliche Domäne besitzen, fungieren als GEF für kleine G Proteine^{9, 10}. Die Möglichkeit einer solchen Funktion wurde daher auch schon für PAM diskutiert¹⁵. Mittels Guanin-Nukleotid Bindungsversuchen sollte daher untersucht werden, ob PAM den GTP Beladungsstatus des kleinen G Proteins Rheb erhöhen kann.

Zu diesem Zweck wurde nukleotidfreies Rheb zusammen mit freiem GTP γ -³⁵S und variablen PAM Konzentrationen in GTPase Puffer inkubiert und anschließend die Menge an gebundenem GTP γ -³⁵S bestimmt. PAM erhöhte signifikant, in einer konzentrationsabhängigen Weise, die Beladung von Rheb mit GTP γ -³⁵S (Abbildung 3-19 A). Die maximale Beladung von Rheb durch PAM konnte nicht ermittelt werden, da aufgrund der enormen Größe von PAM (~516kDa) bei Proteinkonzentrationen >100nM unspezifische Effekte nicht mehr ausgeschlossen werden können. Zusätzlich zum GTP γ -³⁵S Bindungsversuch an Rheb wurde der Austausch von Tritium markiertem GDP gegen GTP ermittelt. Dazu wurde Rheb zunächst mit [³H]-GDP beladen und dann in Anwesenheit von GTP mit variablen PAM Konzentrationen inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde die Menge des an Rheb verbliebenen GDP's quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Zugabe von PAM zu einer signifikant verstärkten Dissoziation von GDP von Rheb bzw. zu einem erhöhten Austausch von GDP gegen GTP führte (Abbildung 3-19 B).

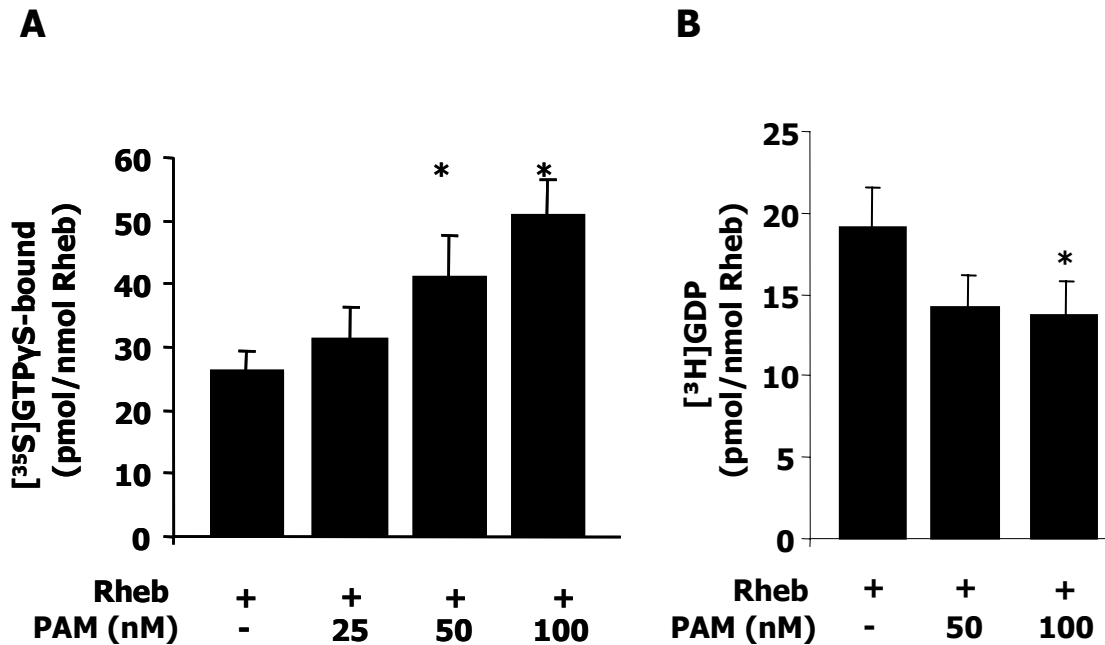


Abbildung 3-19 PAM beeinflusst die Nukleotidbindungseigenschaften von Rheb

(A) Aufgereinigtes und nukleotidfreies GST-Rheb (100nM) wurde in GTPase Puffer zusammen mit PAM und ³⁵S markiertem GTPγS (100 nM) für 30 Minuten inkubiert und das an Rheb gebundene GTPγ-³⁵S nach der "Schnell-Filtrationsmethode" bestimmt. (B) Nukleotidfreies Rheb (150 nM) wurde mit Tritium markiertem GDP beladen und anschließend in Gegenwart von 1μM GTPγS in GTPase Puffer mit steigenden PAM Konzentrationen für 30 Minuten inkubiert. Die an dem Rheb verbliebene Menge [³H]-GDP wurde mittels Scintillationsmessung bestimmt. Dargestellt sind in (A) und (B) die Mittelwerte der Messungen aus 4 unabhängigen Experimenten mit Darstellung der Standardabweichung mit Mittelwert (*: p ≤ 0,05).

Um diese These eines Einflusses der RCC1-Domäne von PAM auf Rheb zu überprüfen wurde der für diesen Bereich codierende Teil der PAM mRNA in einen GST-Expressionsvektor subkloniert und in E.coli transfiziert und das induziert (siehe 2.3.8 und 2.7.3). Das gebildete Protein erwies sich allerdings als äußerst instabil, es konnte nur in sehr geringen Mengen und in stark degradiert Form aufgereinigt werden (siehe Abbildung 2-1). Dies könnte möglicherweise erklären, dass in ersten durchgeführten Probeversuchen das GST-RCC1 Protein sowohl in einem GTPγ-³⁵S als auch in einem [³H]-GDP Versuch keinen Einfluss auf den Nukleotidbeladungszustand von Rheb hatte (Daten nicht gezeigt).

3.5.3. Die Phosphorylierung von mTOR nach S1P ist TSC2 unabhängig

Durch die zellbasierten Experimente mit den Proteinkinase-Inhibitoren (3.4.3) konnte bereits davon ausgegangen werden, dass es nach S1P Gabe nicht zu einer Phosphorylierung und damit Hemmung von TSC2 kommt. Zudem wurde davor bereits gezeigt, dass PAM zwar TSC2 ubiquitinieren kann, dies nach S1P Stimulierung nicht nachzuweisen ist. Schließlich deuteten die Nukleotid-Bindungsversuche darauf hin, dass Rheb unabhängig von TSC2 durch PAM aktiviert werden kann. Aufgrund dieser Hinweise wurde überprüft, ob TSC2 in dem vorliegenden Signalweg überhaupt eine Rolle spielt

Zu diesem Zweck sollte der TSC2 Proteingehalt durch Transfektion mit siRNA vermindert werden. Ein siRNA dosisabhängiges Absinken des TSC2 Proteingehaltes wurde 48 Stunden nach der Transfektion mittels Immunoblot beobachtet. Allerdings fand die S1P induzierte mTOR Phosphorylierung in den so behandelten Zellen unbeeinflusst statt (Abbildung 3-20). Somit konnte eine regulatorische Rolle von TSC2 in diesem speziellen Signalweg als unwahrscheinlich angesehen werden.

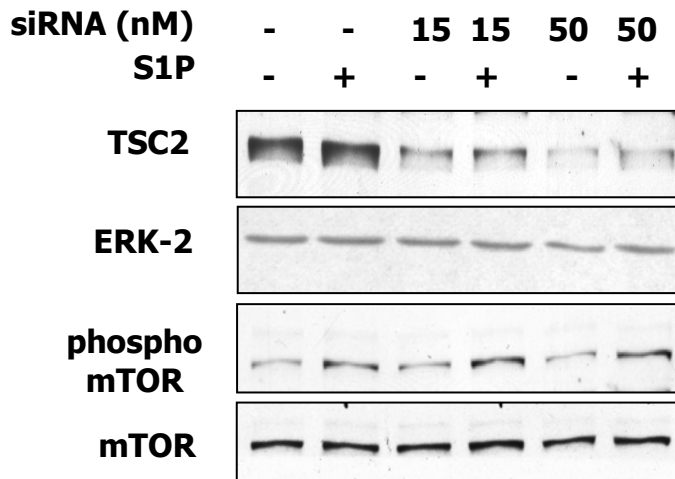


Abbildung 3-20 Die S1P induzierte mTOR Phosphorylierung ist TSC2 unabhängig

HeLa Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von TSC2 spezifischer siRNA transfiziert, nach 24 Stunden in serumfreies Medium überführt und nach weiteren 24 Stunden mit 0,5µM S1P für 30 Minuten stimuliert. Die Zellen wurden in Lämmli geerntet und per Immunoblot auf TSC2 und phospho mTOR. Als Ladekontrollen wurden zudem die Proteinmengen von mTOR und Erk-2 analysiert.

3.5.4. Rheb ist in den S1P-mTOR Signalweg involviert

Die Bioporter- und Inhibitor-Versuche (3.4.4 und 3.4.5) konnten bereits als Anhaltspunkte für eine regulatorische Rolle von PAM in der S1P vermittelten Aktivierung von mTOR gedeutet werden. Des Weiteren deuteten die Ergebnisse des GTP γ -³⁵S Bindungsversuches als auch des GDP Dissoziationsversuches (3.5.2) darauf hin, dass PAM als GEF für Rheb agieren kann. Um nun eine Rolle von Rheb in diesen Signaltransduktionsweg zu bestätigen, wurde die Farnesylierung von Rheb durch Inkubation der Zellen mit dem Farnesyltransferase Inhibitors FTI-277 verhindert. Da die Farnesylierung essentiell für die enzymatische Funktion von Rheb ist ¹⁵², kann dessen Aktivität auf diese Weise blockiert werden. In der Tat führte eine Präinkubation mit FTI-277 zu einem Ausbleiben der mTOR Phosphorylierung nach S1P Gabe (Abbildung 3-21 A). Um zu bestätigen, dass tatsächlich Rheb und nicht ein anders farnesyliertes Protein für diese Beobachtung verantwortlich ist, wurde dessen intrazelluläre Proteinkonzentration durch Transfektion mit GST-Rheb-BioPorter erhöht. Nach Stimulation mit S1P kam in den Rheb-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einem signifikant stärkeren Anstieg der Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 (Abbildung 3-20 B). Da das verwendete GST-Rheb aufgrund der Aufreinigungsbedingungen (siehe 2.7.3) nukleotid-frei und damit inaktiv war, deuten die Daten darauf hin, dass es durch die S1P Stimulation zu einer Aktivierung, d.h. Beladung von Rheb mit GTP gekommen sein muss.

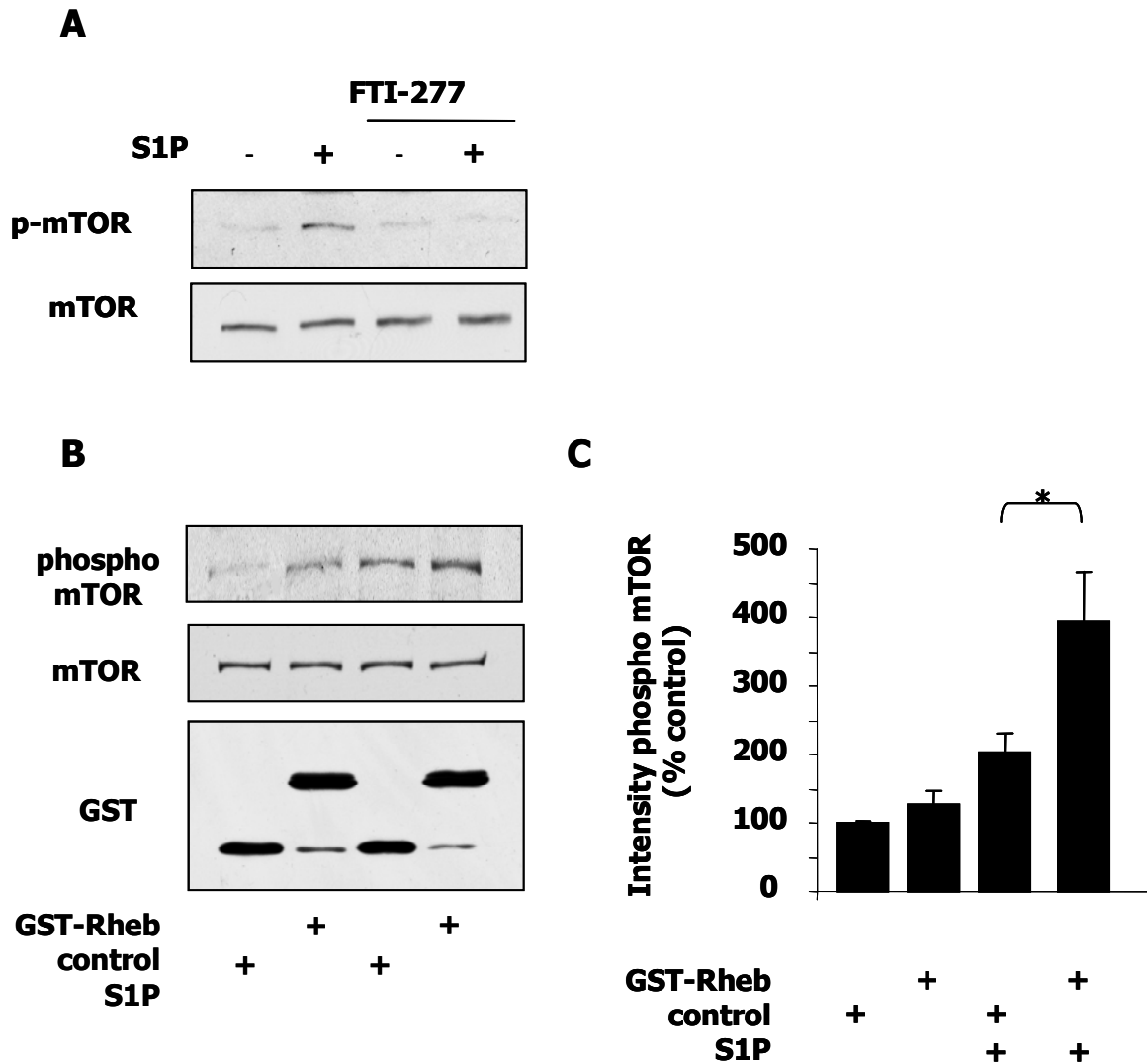


Abbildung 3-21 Die S1P induzierte Aktivierung von mTOR ist Rheb-abhängig

(A) HeLa Zellen wurden in Anwesenheit von 10 μ M FTI-277 ausplattiert und nach 24 Stunden für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium + FTI-277 kultiviert. Die Stimulation erfolgte mit 0,5 μ M S1P für 30 Minuten. Die Zellen wurden in heißem Lämmli geerntet und auf phospho mTOR analysiert. Als Ladekontrolle wurde das Gesamt mTOR Protein untersucht. (B) Aufgereinigtes GST-Rheb wurde mit BioPorter Reagenz vermischt, inkubiert und die Lipo-Proteinkomplexe zu den HeLa Zellen gegeben. Nach 4h wurde die Zellen mit S1P stimuliert, geerntet und per Western Blot auf phospho mTO und mTOR untersucht. Die Proteintransfektion von GST-Rheb bzw. GST wurde durch Immunoblot mit einem GST-spezifischen Antikörper überprüft. (C) Densiometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten. (*: $p \leq 0,05$)

3.6. Rapamycin erhöht tendenziell die nozizeptiven Reaktionen im „Formalin-Test“

Interessanterweise konnte sowohl für S1P¹⁵³ als auch für PAM²⁰ ein Einfluss auf die spinale Nozizeption in dem Schmerzmodell des „Formalin-Tests“ (siehe 2.9) nachgewiesen werden. Mit diesem Schmerzmodell lässt sich sowohl die Phase des Akutschmerzes (Phase I) als auch eine einsetzende Sensibilisierung mit erhöhter nozizeptiver Antwort (Phase II) charakterisieren. Für mTOR oder seinen Inhibitor Rapamycin sind bislang noch keine Daten publiziert, die eine Rolle in der Nozizeption vermuten lassen. Die im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, die eine mTOR Aktivierung über S1P und PAM nahe legen, lassen daher vermuten, dass von mTOR regulierte Vorgänge auch bei der Schmerzverarbeitung eine Rolle spielen könnten.

Um diese These zu überprüfen, sollte der mTOR Inhibitor Rapamycin intrathekal appliziert und anschließend das Schmerzverhalten der Tiere in verschiedenen Versuchen untersucht werden. Nach Transplantationen liegt der Zielwertspiegel von Rapamycin im Serum bei 9 ng/ml¹⁵⁴ was einer Konzentration von circa 10µM entspricht, in Zellkulturexperimenten wird gewöhnlich ein Konzentrationsspektrum von 0-100 nM abgedeckt. Für die Tierexperimente wurde eine Konzentration von 5µM in DMSO gewählt, aufgrund des Verdünnungseffektes durch den Liquor ist eine Endkonzentration von circa 1µM anzunehmen (Schätzwert, kein analytischer Nachweis).

Bei der intrathekalen Applikation erfolgt normalerweise der Zusatz eines Farbstoffes, der es nach dem Versuch ermöglicht, die Injektionsstelle zu identifizieren. Für diese Versuchreihe war dies jedoch nicht möglich, da die üblicherweise verwendeten Farbstoffe entweder mit bekannten Schmerzmediatoren interagieren (Methylenblau / Guanylat Zyklase¹⁵⁵), zytotoxisch wirken (Trypanblau¹⁵⁶) oder wie im Falle von Tusche das Rapamycin binden und inaktivieren (eigener Vorversuch in der Zellkultur; Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Versuche ohne anschließende Validierung einer korrekten Injektion durchgeführt.

3.6.1. Hot Plate Test

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass die intrathekale Gabe von Rapamycin an sich das Schmerzverhalten der Tiere beeinflusst. Daher wurde der Effekt dieser Behandlung auf die nozizeptive Antwort mittels des so genannten „Hotplate“ Tests (siehe 2.9) überprüft. Den Tieren wurde das Rapamycin in artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) 30 Minuten vor Versuchsbeginn intrathekal appliziert. Die Reaktion auf den thermischen Reiz im „Hot Plate Test“ wurde im Abstand von 30 Minuten über einen Zeitraum von 2 Stunden gemessen. Nach Auswertung der Daten zeigten sich keine Unterschiede zwischen Rapamycin-behandelter und Kontrollgruppe. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die intrathekale Gabe von Rapamycin weder die motorischen Funktionen noch die Wahrnehmung des Akut-Schmerzes beeinflusst (Abbildung 3-22).

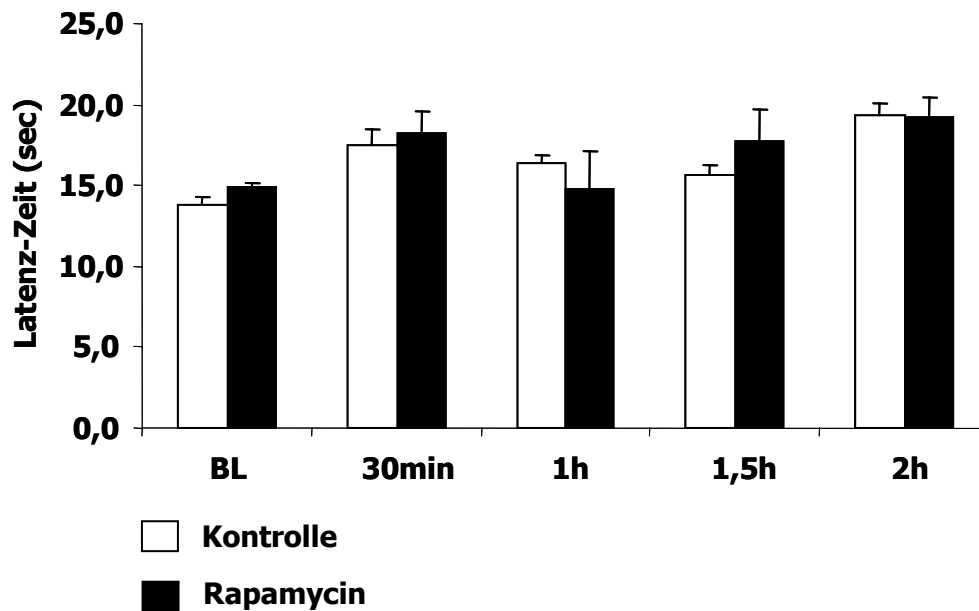


Abbildung 3-22 Hotplate-Test mit Mäusen nach intrathekaler Rapamycin Gabe

45 Minuten nach intrathekaler Gabe von 5 μ M Rapamycin wurden das akute Schmerzverhalten der Tiere in einem Hot Plate Test überprüft. Die Latenz-Zeit bis zum einem nozifensiven Verhalten wurde gemessen. Um eine Gewöhnung der Tiere an die erhöhte Temperatur zu vermeiden, erfolgten die Messungen in 30 minütigen Abständen. (n=7 Tiere)

3.6.2. Formalin Test

Um den Einfluss von Rapamycin bzw. von mTOR in einem Schmerzmodell zu untersuchen, wurde das Schmerzverhalten der Tiere im „Formalin-Test“ (siehe 2.9) untersucht.

30 Minuten vor der Formalininjektion in eine der Hinterpfoten wurde den Tieren Rapamycin in ACSF intrathekal appliziert. Wie beim Hot Plate Test wurde auf Zugabe von Farbstoff verzichtet. Als Maß für den Schmerzreiz wurde die Leckzeit der behandelten Pfote in 5 minütigen Intervallen über einen Zeitraum von 45 Minuten dokumentiert. Zwischen den Rapamycin behandelten Tieren und der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Tendenziell führte eine Inhibition von mTOR durch Rapamycin jedoch zu einer höheren Leckzeit in Phase II des Formalintests (Abbildung 3-23).

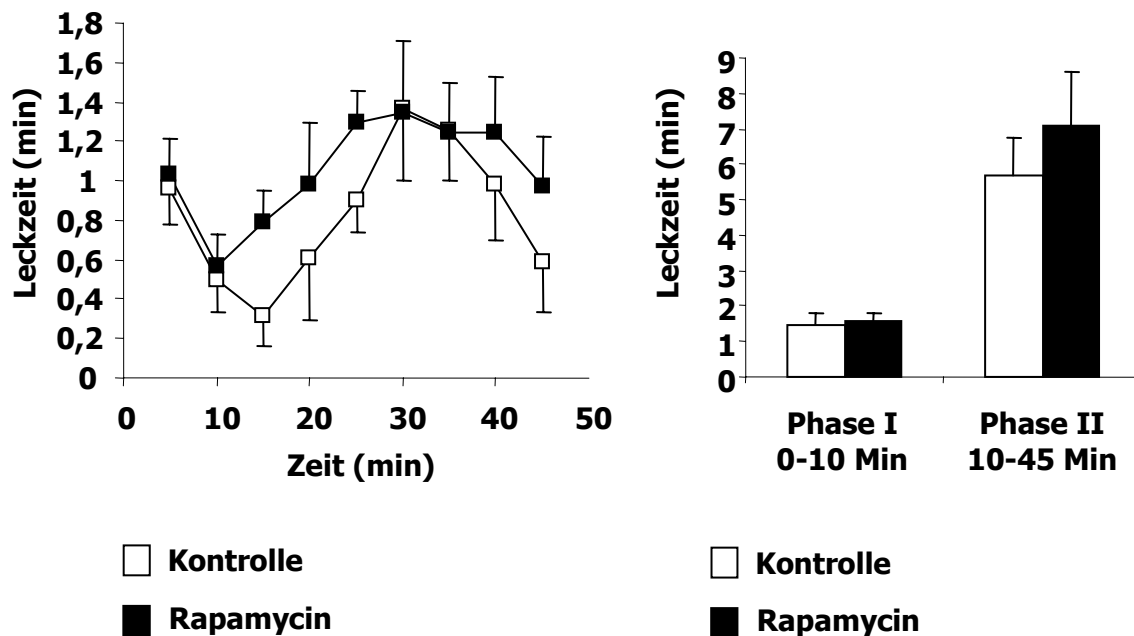


Abbildung 3-23 Formalintest mit Mäusen nach intrathekaler Rapamycin Gabe

(A) 45 Minuten nach intrathekaler Gabe von Rapamycin (5 μ M) wurde Formalin in eine Hinterpfote einer Maus injiziert und das Leckverhalten an der betreffenden Pfote über einen Zeitraum von 45 Minuten aufgezeichnet. (B) Einteilung des Formalin-Tests in 2 Phasen: Phase I Akutschmerz nach der Formalininjektion; Phase II einsetzende periphere und zentrale Sensibilisierung der Nozizeptoren. Dargestellt ist Summe der Leckzeit im jeweiligen Intervall (n=7 Tiere).

4. Diskussion

4.1. PAM als Ubiquitinligase

Eine Rolle von PAM als Ubiquitinligase wird aufgrund seiner RING Finger Proteindomäne, seit längerem diskutiert. Die Untersuchungen der enzymatischen Eigenschaften von PAM sind aber wegen seiner enormen Größe sehr aufwendig. Daher blieb die Charakterisierung in Bezug auf eine Ubiquitinligaseaktivität hauptsächlich auf indirekte Methoden wie die Generierung von PAM-defizienten Organismen beschränkt. Ein tatsächlicher biochemischer Nachweis einer solchen Enzymaktivität oder die Identifikation von Zielproteinen konnte bislang noch nicht erbracht werden.

In dieser Arbeit wurde daher der Ansatzpunkt verfolgt, endogenes PAM unter nativen Bedingungen aufzureinigen und seine Aktivität direkt zu bestimmen. Dadurch war es möglich, ein Wirken als E3 Ubiquitinligase über Nachweis der Autoubiquitinierungsaktivität zweifelsfrei zu bestätigen. Die Fähigkeit von PAM, in Anwesenheit von E1 und E2 Enzym die Bildung von Polyubiquitinketten sowie die eigene Ubiquitinierung zu katalysieren, ist typisch für RING Finger Proteine, die als E3-Ubiquitin Ligase agieren¹³⁸. Ob diese Polyubiquitinkettenbildung bzw. die Autoubiquitinierung auch *in vivo* von Bedeutung ist, steht noch nicht fest. Es wird allerdings diskutiert, dass es sich dabei um eine regulierende Aktivität handelt, mit der Ubiquitinligasen ihren eigenen proteasomalen Abbau einleiten¹³.

E3 Ligasen interagieren zumeist mit einer Vielzahl von E2 Enzymen. Diese unterscheiden sich neben ihrer Struktur auch häufig in ihrer subzellulären Lokalisation voneinander^{132, 133}. Die funktionelle Interaktion der Ubiquitinligasen mit bestimmten E2 Enzymen bietet dadurch eine Möglichkeit, den Abbau von Ziel-Proteinen auf bestimmte Kompartimente zu beschränken, während sie in anderen Bereichen der Zelle nicht degradiert werden. Auch für das nativ aufgereinigte, endogene PAM ließ sich eine klare Spezifität nachweisen, die sich mit der heterolog exprimierten RING Finger Region (C-PAM) bestätigen ließ. Die effektivsten Reaktionen waren mit den E2 Enzymen E2-UbcH5a und E2-UbcH5c zu erreichen, während mit E2-UbcH10 nahezu keine Aktivität nachweisbar war. Dies war

insofern nicht unerwartet, da E2-UbcH10 mit E3 Enzymen interagiert, die auf den Abbau von mitotischen Cyclinen spezialisiert sind^{157, 158}. Die E2-UbcH5er Gruppe hingegen ist keiner bestimmten Proteingruppe zugeordnet. Sie ist am generellen, proteasomalen Proteinabbau beteiligt und wurde bereits mit einer Vielzahl von RING Finger E3 Ligasen und Zielproteinen in Verbindung gebracht^{159, 160}. Es ist daher davon auszugehen, dass PAM nicht auf die Ubiquitinierung einiger weniger Proteine beschränkt ist, sondern möglicherweise ein breites Spektrum von Zielproteinen aufweist. Die Identifikation dieser Proteine ist ein wichtiger Aspekt, der zu einem besseren Verständnis von PAM-abhängigen Vorgängen beitragen kann. Humanes PAM bildete in den Versuchen jedoch keinen aktiven Komplex mit E2-UbcH5b, das mit E2-UbcH5a/c nahe verwandt ist. Interessanterweise beschrieben d'Souza et al. für die heterolog exprimierte RING Finger Region des PAM Orthologs aus dem Zebrafisch jedoch eine solche Interaktion¹⁶. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden PAM Orthologe weist Unterschiede der beiden RING Finger Konsensussequenzen in 3 Aminosäuren auf (Abbildung 4-1). Da die Spezifität der E3-E2 Bindung hauptsächlich über die RING Finger Region vermittelt wird, könnten diese Abweichungen möglicherweise schon die unterschiedlichen Affinitäten zu E2-UbcH5b bewirken. Durch einen Datenbank-Abgleich zeigt sich, dass die RING Finger Region von PAM stark von der Sequenz seiner Orthologe aus *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* abweicht, während sie 100% homolog zu der aus Maus und Ratte ist. Dies könnte bedeuten, dass PAM je nach Spezies ein anderes Spektrum von E2-Interaktionspartnern aufweist und möglicherweise auch andere Zielproteine ubiquitiniert. In der Konsequenz ist es daher denkbar, dass sich die physiologische Rolle von PAM in Säugern grundlegend von der im Fadenwurm respektive der Fruchtfliege unterscheidet.

		Homologie
H.s.	C MIC FTEALSAAPAIQLD C SH I FH LQ C CRRVLENRWLGPRITFGF I S C PI C	100%
M.m.	C MIC FTEALSAAPAIQLD C SH I FH LQ C CRRVLENRWLGPRITFGF I S C PI C	100%
D.r.	C MIC FTEALSAAPAIQLD C SH V FH LQ C TRRVLENRWLGPRITFGF M S C PI C	94%
C.e.	C VI C FTERLGAAPCIRLG C GH MFH FH C VRMILERRWNGPRITFGFI S C PI C	75%
D.m.	C MIC FVEALSCAPSIHLE C GH V FH YH C CKAVLEKRWSGPRITFGF L S C PI C	72%

Abbildung 4-1 PAM RING Finger Konsensussequenzen aus verschiedenen Organismen

Die konservierten Cysteine und Histidine sind in blau dargestellt. Von der humanen PAM Konsensussequenz abweichende Aminosäuren sind rot gefärbt. H.s. *Homo sapiens*; M.m. *Mus Musculus*; D.r. *Danio rerio*; C.e. *Caenorhabditis elegans*; D.m. *Drosophila melanogaster*

Der Befund, dass aufgereinigtes PAM *in vitro* als Ubiquitinligase wirken kann, ist ein deutlicher und direkter Hinweis darauf, dass es seine postulierte Rolle als E3-Ubiquitinligase erfüllt. Als ein Zielprotein, das durch PAM für den proteasomalen Abbau markiert werden könnte, wird TSC2 diskutiert. So wiesen Ramesh et al. einen negativ-regulatorischen Einfluss von PAM auf TSC2 in *Drosophila melanogaster* nach. Ein durch TSC2-Überexpression hervorgerufener Phänotyp konnte durch Inaktivierung des PAM Genes weiter verstärkt werden⁵². Des Weiteren beobachteten D'Souza et al. eine erhöhte Menge von phosphoryliertem TSC2 in PAM-defizienten Tieren von *Danio rerio*¹⁶. Entscheidend ist jedoch die in dieser Arbeit erstmalig gezeigte, PAM-abhängige *in vitro* Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung von TSC2. Zusammen mit oben erwähnten indirekten Daten liefert sie einen sehr starken Hinweis, dass PAM auch *in vivo* den Abbau von TSC2 vermittelt. Die Degradation von TSC2 in Anwesenheit von PAM war zudem hoch spezifisch. Proteine, die ebenfalls proteasomal abgebaut werden können (wie beispielsweise HSP 70¹⁴⁷), wurden im selben Reaktionsansatz nicht ubiquitiniert. Daher konnte eine generelle Aktivierung von Ubiquitinierungsreaktionen ausgeschlossen werden. Die PAM-abhängige TSC2 Ubiquitinierung ließ sich jedoch nur mit Proteinlysat als TSC2-Quelle durchführen. Wurde stattdessen reines, weil sehr stringent immunopräzipitiertes TSC2 verwendet, konnte keine Reaktion beobachtet werden. Möglicherweise kann eine effiziente Ubiquitinierung des Zielproteins also nur dann stattfinden, wenn weitere Co-Faktoren wie beispielsweise Proteine der F-Box- oder Cullin-Familie als Adaptorproteine im Reaktionsansatz vorliegen. Für eine Reihe von RING Finger E3 Ligasen die Notwendigkeit solcher Co-Faktoren für eine effektive Reaktion bereits gezeigt worden¹⁰⁴. So besteht bei der Untergruppe der SCF-RING E3 Ligasen das aktive Holoenzym aus einem Komplex von einem RING Finger Protein mit einem SCF-Trimer (Skp-Protein, Cullin-Protein, F-Box-Protein). Nur dieser vollständige Komplex kann das Zielprotein effizient ubiquitinieren^{104, 108}. Die Daten aus den hier vorliegenden Ubiquitinierungsversuchen deuten also darauf hin, dass es sich auch bei PAM um eine SCF-RING E3-Ligase handelt. In diesem Zusammenhang ist auch eine andere Beobachtung zu diskutieren: Nur natives, endogenes PAM war in der Lage, die Ubiquitinierung von TSC2 zu katalysieren. Heterolog expremiertes C-PAM, das die katalytisch aktive RING Finger Domäne und die Interaktionsstelle mit TSC2 enthält, war zwar in Autoubiquitinierungsversuchen aktiv,

jedoch nicht in der Lage TSC2 zu ubiquitinieren. Dies spricht dafür, dass nicht nur die RING Finger Domäne und die TSC2-Bindungsstelle für eine Ubiquitinierung von TSC2 nötig sind, sondern auch andere Proteinbereiche von PAM. Bei diesen Regionen handelt es sich möglicherweise um Interaktionsstellen für die oben erwähnten Adaptorproteine.

4.2. S1P vermittelte mTOR Aktivierung

TSC2 ist eine der wichtigsten regulatorischen Komponenten des TSC2 / mTOR Weges. Eine Veränderung des TSC2 Status' hat daher oftmals eine Aktivierung / Hemmung der mTOR Aktivität zur Folge. Aus den Ubiquitinierungs-Experimenten geht zweifelsfrei hervor, dass TSC2 durch PAM zum Abbau markiert werden *kann*. Dementsprechend konnte spekuliert werden, dass eine S1P induzierte PAM Aktivierung eine proteasomale Degradation von TSC2 bewirken und in der Konsequenz eine mTOR Aktivierung hervorrufen würde (siehe Übersichts-Abbildung 4-2). Tatsächlich führte die Behandlung der HeLa Zellen mit einer physiologischen S1P Konzentration zu einer Phosphorylierung von mTOR an dem regulatorischen Ser2448. Diese Modifikation ging mit einer Steigerung der Kinaseaktivität einher, wie die vollständig rapamycinsensitive Phosphorylierung der mTOR Zielproteine p70S6K und 4E-BP1 zeigte. Allerdings konnte ein S1P induzierter, PAM vermittelter Abbau von TSC2 trotz vielfältiger Herangehensweisen experimentell nicht bestätigt werden. Es ist aber denkbar, dass in anderen Zellen oder durch einen anderen Signalweg, eine PAM-abhängige, proteasomale Degradation von TSC2 der entscheidende Schritt für eine mTOR Aktivierung ist.

Bislang ist lediglich eine Möglichkeit einer TSC2-unabhängigen mTOR Aktivierung beschrieben worden. So zeigten Nobukuni et al, dass in embryonalen TSC2^{-/-} Mausfibroblasten eine Stimulation der Zellen mit Aminosäuren zu einer Stimulierung der mTOR Aktivität führt¹⁶¹. Im gewählten Modellsystem HeLa konnte jedoch durch RNA-Interferenz Experimente gezeigt werden, dass TSC2 für die S1P induzierte mTOR Aktivierung irrelevant ist. Selbst eine starke Reduzierung des TSC2 Proteingehaltes durch die transfizierte siRNA beeinflusste die mTOR Phosphorylierung nicht. Für die beobachtete mTOR Aktivität nach S1P Stimulierung ist daher ein ein Mechanismus zu vermuten, der zu einer direkten Regulation von mTOR, seines Aktivators Rheb oder einer bislang

unbekannten Komponente führt. Mit dem Farnesyltransferase Inhibitor FTI 277 konnte ein Indiz für eine Involvierung von Rheb erbracht werden, da eine Vorbehandlung der Zellen mit FTI 277 zu einer Blockade der mTOR Phosphorylierung nach S1P führte. Allerdings sind diese Daten nur eingeschränkt für eine Beteiligung von Rheb zu werten, da durch FTI 277 auch die Farnesylierung anderer Proteine inhibiert wird. Die Bestätigung einer Rheb-vermittelten Signalkaskade nach S1P wurde jedoch durch nachfolgende BioPorter Versuche erbracht: Eine Proteintransfektion der Zellen mit nukleotid-freiem, also inaktivem Rheb, hatte keinen Einfluss auf den mTOR Status. Jedoch reagierten Rheb-transfizierte Zellen nach S1P Behandlung mit einer deutlich stärkeren mTOR Phosphorylierung als die mit Kontrollprotein transfizierten Zellen. Dies deutet sehr stark darauf hin, dass S1P zu einer Aktivierung des in die Zelle gebrachten Rheb führt, vermutlich über eine Beladung des nukleotidfreien Rheb mit GTP.

S1P-abhängige Effekte können extrazellulär durch Binden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor oder intrazellulär durch Wirken als „second messenger“ vermittelt werden^{162, 163}. Letzteres wird allerdings erst bei S1P Konzentrationen von 10 μ M erreicht¹⁶⁴ und kann aufgrund der eingesetzten Mengen (0.5 μ M S1P) vernachlässigt werden. HeLa Zellen exprimieren alle fünf der bislang beschriebenen Rezeptoren⁶, über die tatsächliche Rezeptordichte an der Zelloberfläche ist nichts bekannt. Von einer Beteiligung des S1P₁ Rezeptors ist nicht auszugehen, da die Gabe des Agonisten SEW-2871 nicht zu einer Phosphorylierung von mTOR führte. Eine Rolle von S1P₂ ist ebenfalls unwahrscheinlich, da der Antagonist JTE-013 die mTOR Phosphorylierung nicht verhinderte. Die Gabe des S1P₃ Antagonisten Cay10444 führte bereits ohne S1P Stimulation zu einer Phosphorylierung von mTOR. Dies könnte bedeuten, dass der S1P₃ Rezeptor eine Hemmung von mTOR vermittelt und diese nach Gabe von Cay10444 aufgehoben wird. Allerdings zeigten Koide et al., dass Antagonist-Konzentrationen von 10 μ M notwendig sind, um die S1P₃-vermittelte Calciumfreisetzung in HeLa Zellen um 40% zu vermindern¹⁶⁵. In dieser Arbeit wurde daher eine Konzentration von 50 μ M eingesetzt um eine komplette Antagonisierung der S1P-Effekte zu gewährleisten. Möglicherweise kommt es jedoch bei diesen sehr hohen Konzentrationen (zum Vergleich: IC₅₀ des S1P₂ Antagonisten JTE-013 = 22 nM¹⁶⁶) zu unspezifischen Effekten an den anderen Rezeptoren oder rezeptorunabhängigen Effekten. Diese Frage kann jedoch erst geklärt werden, wenn weitere am S1P₃ Rezeptor

pharmakologisch wirksame Substanzen erhältlich sind. Die Rolle von S1P₄ bzw. S1P₅ konnte nicht untersucht werden, da für diese beiden Rezeptoren weder Agonisten noch Antagonisten erhältlich sind.

Der Aufklärung des verantwortlichen Rezeptors für die beobachteten S1P-abhängigen Effekte kommt jedoch große Bedeutung zu. Aufgrund des variierenden Expressionsmusters sind in Abhängigkeit des betroffenen Rezeptortyps völlig unterschiedliche physiologische Auswirkungen zu erwarten. So werden im Menschen die S1P₁₋₃ Rezeptoren in nahezu allen Geweben expremiert. Dagegen findet sich eine S1P₄ Expression hauptsächlich im hämatopoetischen System während der S1P₅ Rezeptor besonders stark im Gewebe von Gehirn, Rückenmark, Lymphozyten und Milz nachweisen ist ^{167, 168 153, 169}

Mittels spezifischer Inhibitoren konnte außerdem ein regulatorischer Einfluss der durch S1P aktivierbaren Proteinkinasen ERK, PI3K und AKT ⁴³⁻⁴⁵ ausgeschlossen werden. Stattdessen zeigte sich, dass der Signaltransduktionsmechanismus der S1P induzierten mTOR Stimulierung über dieselben Komponenten (GPCR- G i/ α – PLC – PKC) verläuft, die auch zu einer S1P-abhängigen Aktivierung von PAM führen ⁶. Während die Inhibitor Versuche eine regulatorische Rolle von PAM lediglich nahe legen, wird sie durch Transfektionsexperimente mit der BioPorter Reagenz evident. Eine Erhöhung der intrazellulären PAM Konzentration als solche hatte keinen Einfluss. Eine S1P Stimulation der PAM transfizierten Zellen, führt aber zu einer deutlich stärkeren mTOR Phosphorylierung als in den Kontrollzellen. Dies lässt sich nur dadurch erklären, dass PAM nach Aktivierung durch S1P zu einer Steigerung der mTOR Phosphorylierung beiträgt.

4.3. PAM als potentieller GEF von Rheb

Die BioPorter Versuche zeigten, dass sowohl Rheb als auch PAM nach einer S1P Stimulation Einfluss auf die mTOR Phosphorylierung ausüben. Eine Erklärung wäre, dass beide Proteine unabhängig voneinander zu einer mTOR Aktivierung führen. Eine andere Möglichkeit ist, dass der GTP-Beladungszustand von Rheb durch PAM beeinflusst wird. Rheb weist bei relativ hoher GTP Affinität eine geringe intrinsische GTPase Aktivität auf, so dass es im Vergleich zu anderen G-Proteinen ein hohes GTP zu GDP Ratio besitzt ¹⁷⁰.

Diese Eigenschaft führte zu Spekulationen, dass kein Guaninnukleotid Austauschfaktor (GEF) nötig sei, um Rheb mit GTP zu beladen. Entsprechend wird die Existenz einer GEF für Rheb kontrovers diskutiert. Da mit TSC2 ein potenter Gegenspieler von Rheb vorliegt, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass ein grundlegender Aktivierungsmechanismus wie eine GEF Aktivität bei Rheb keine Rolle spielt. Dementsprechend nimmt die Identifizierung dieses Enzyms einen hohen Stellenwert in der TSC2 / mTOR Forschung ein.

Den ersten Hinweis auf eine potentielle GEF Aktivität von PAM auf Rheb lieferte der „stationäre GTPase Versuch“. Zhang et al. beschrieben 2003 erstmals, dass Rheb in Anwesenheit von TSC2 verstärkt GTP zu GDP und freiem Phosphat hydrolysiert ⁹⁵. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass TSC2 mittels einer „GTPase-Aktivierungs-Protein“ Domäne die intrinsische GTPase Aktivität von Rheb erhöht, was in der Konsequenz zur Inaktivierung von Rheb führt ^{92, 171}. In dieser Arbeit sollte zunächst überprüft werden, ob PAM durch seine Interaktion mit TSC2 dessen GTPase Aktivität auf Rheb vermindert. Die Analyse dieser Reaktion in Gegenwart von PAM zeigte jedoch keine Hemmung sondern eine tendenzielle Erhöhung der der Phosphatfreisetzung. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass PAM die GAP Aktivität von TSC2 auf Rheb weiter steigert, so dass mehr GTP hydrolysiert wird. Eine andere Erklärung wäre, dass PAM nach dem Hydrolyseschritt das Rheb-GDP wieder in Rheb-GTP überführt und dieses für einen neuen Zyklus zur Verfügung steht. Beide Theorien würden eine Erklärung für die erhöhte Menge an freiem Phosphat liefern (siehe Abbildung 3-16 und Abbildung 3-18). Anschließende Nukleotid-Bindungsversuche zeigten aber eine PAM vermittelte, erhöhte Bindung von GTP an Rheb. Zusätzlich konnte durch eine andere Versuchsanordnung nachgewiesen werden, dass die Dissoziation von GDP bzw. der Austausch von GDP gegen GTP an Rheb in Anwesenheit von PAM erhöht ist.

Im Kontext betrachtet lassen sich die Daten aus den drei verschiedenen Nukleotid-Bindungsversuchen (GTPase Versuch – GTP γ S Bindung – GDP/GTP Austausch) so deuten, dass PAM die Affinität von Rheb zu GTP steigert und / oder den Austausch von GDP gegen GTP an Rheb erhöht. Diese *in vitro* Daten legen somit den Schluss nahe, dass PAM tatsächlich der GEF für Rheb sein könnte und dadurch zu dessen Aktivierung beitragen kann. Eine PAM-Region, die für die beobachteten Effekte in Frage kommt, ist die RCC1-ähnliche Domäne. Diese ist in anderen GEFs für die katalytische Aktivität als essentiell

beschrieben worden ^{7, 9, 10}. Untersuchungen mit der heterolog exprimierten und aufgereinigten RCC1 ähnlichen Domäne von PAM zeigten jedoch keinerlei enzymatische Aktivität dieses Fragmentes. Allerdings wies das Protein eine hohe Instabilität auf und ließ sich nur in stark degradiert Form aus *E.coli* aufreinigen. Es wäre möglich, dass das Protein gar keine Enzymaktivität mehr besaß. Zudem könnte, analog zur TSC2 Ubiquitinierung, das vollständige PAM von Nöten sein, um eine GEF Aktivität auf Rheb auszuüben. Die Klärung dieser Frage, bzw. die Identifikation der verantwortlichen Domänen ist daher ein essentieller Schritt, um die GEF Aktivität von PAM *in vitro* endgültig zu bestätigen und anschließend auch *in vivo* Nachweisen zu können.

4.4. Duale Rolle von PAM als Ubiquitinligase und Guanin-Nukleotid Austauschfaktor

In bislang keiner Veröffentlichung wurde PAM in den Zusammenhang einer GEF Aktivität bezüglich Rheb gesetzt. Interessanterweise ist jedoch vor kurzem eine Interaktion des HERC1 (**H**ect and **R**cc1) Proteins mit TSC2 beschrieben worden. Das Binden von HERC1 an TSC2 führt zur Dissoziation des TSC2/TSC1 Komplexes mit der Folge einer TSC2 Inaktivierung ¹⁷². Bemerkenswert ist die Struktur von HERC1: Es hat ein Molekulargewicht von 532 kDa, besitzt eine Domäne mit Homologien zur Klasse der HECT E3 Ubiquitinligasen und eine RCC1-ähnliche Region, die GEF Aktivität auf die kleinen G-Protein ARF und Rab ausübt ¹⁷³. Allerdings konnte eine Ubiquitinligase Aktivität von HERC1 bislang ebenso wenig nachgewiesen werden, wie eine GEF Aktivität auf Rheb. Die Autoren spekulieren jedoch, dass HERC1 entweder eine Ubiquitinierung von TSC2 katalysiert oder aber das Binden von GTP an Rheb verstärkt. Die strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zu PAM sind offenkundig. Es lässt sich daher vermuten, dass PAM und HERC1 zu einer bislang nicht beschriebenen Gruppe von Enzymen zählen, die sowohl Ubiquitinligaseaktivität als auch GEF Aktivität besitzen.

Im Falle von PAM konnten in dieser Arbeit Hinweise für das Wirken von PAM als ein solches „*duales Enzym*“ gefunden werden:

- 1) PAM hat Ubiquitinligaseaktivität, ubiquitiniert TSC2 und katalysiert somit dessen proteasomalen Abbau
- 2) PAM verstärkt die Bindung von GTP an Rheb und erhöht den Austausch von GDP gegen GTP an Rheb.

Die Kohärenz der Daten wird noch weiter erhöht, wenn man die Auswirkungen der jeweiligen enzymatischen Reaktionen betrachtet: Zum einen wird ein negativer Regulator des mTOR Signalweges durch die Ubiquitinligase Fähigkeit von PAM für den proteasomalen Abbau markiert und dadurch inaktiviert. Zum anderen wird ein positiver Regulator des mTOR Weges durch das Wirken von PAM als GEF aktiviert. Obwohl beide Mechanismen sich voneinander völlig unterscheiden und offenkundig auch durch differentielle Stimuli gesteuert werden, führen sie in der Konsequenz zum selben Ergebnis: Die Aktivierung der mTOR Signaltransduktion.

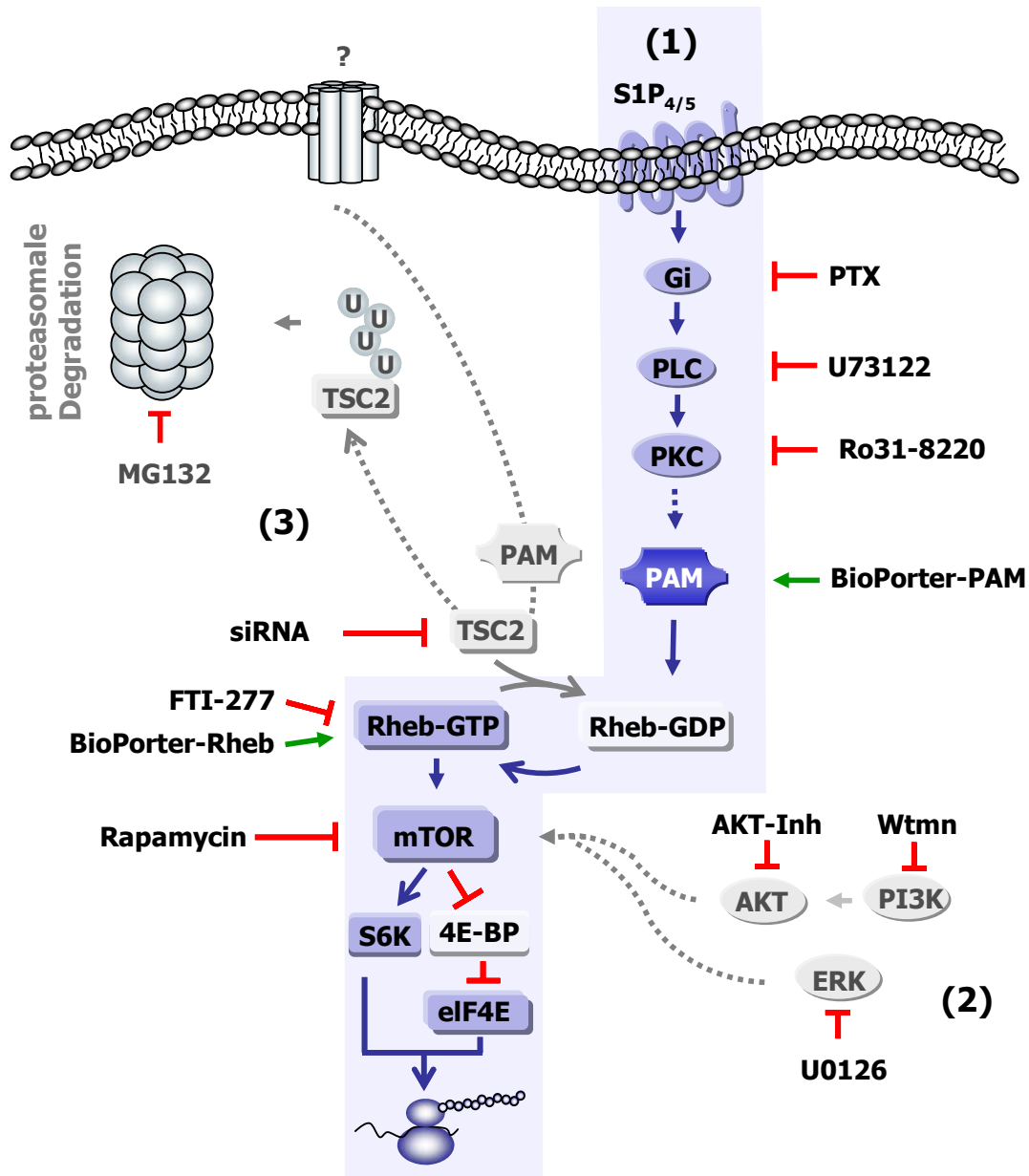


Abbildung 4-2 Modell für die S1P induzierte mTOR Aktivierung

(1) Nach Binden von S1P an einen S1P Rezeptor kommt es zu einer Signalweiterleitung über ein Gi/o-Protein, PLC und PKC und vermutlich weitere Mediatoren hin zu PAM. Rheb wird durch PAM in den GTP-gebundenen Zustand überführt, das aktivierte Rheb bindet an mTOR und erhöht dessen Kinase Aktivität. Die daraus resultierende Phosphorylierung der p70S6K und des 4E-BP1 hat in der Konsequenz eine gesteigerte Ribosomenbiogenese und Proteintranslation zur Folge. (2) Dieser Signalweg ist unabhängig von den durch S1P aktivierbaren Proteinkinasen PI3K, AKT oder ERK (3) Der negative Regulator TSC2 ist im Falle der S1P induzierten mTOR Aktivierung nicht involviert. TSC2 kann aber PAM-abhängig ubiquitiniert und proteasomal degradiert werden. Der auslösende Stimulus für diese Reaktion muss noch identifiziert werden. Hemmung von einzelnen Signalweg-Komponenten sind in Rot, Aktivierungen in Grün dargestellt

4.5. Ausblick

Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass PAM auf zwei verschiedenen Wegen die Kinaseaktivität von mTOR steigern kann: Durch Inaktivierung von TSC2 oder durch Aktivierung von Rheb. Welche dieser beiden Möglichkeiten genutzt wird, scheint von dem primären Stimulus abhängig, der den entsprechenden Signalweg induziert. Im gewählten Modellsystem HeLa Zelle ist das TSC2 Protein bei der S1P induzierten mTOR Stimulation nicht involviert, wohl aber PAM und Rheb. Es ist aber denkbar, dass in anderen Zelltypen oder bei einem anderen Effektor, eine PAM-abhängige TSC2 Ubiquitinierung der entscheidende Faktor für die mTOR Aktivierung sein kann. Ebenso kann spekuliert werden, dass der durch PAM vermittelte proteasomale Abbau von TSC2 in mTOR unabhängigen Vorgängen eine Rolle spielt, wie beispielsweise durch TSC2 regulierte endozytotische Vorgänge¹⁷⁴.

Zwar sind eine Reihe von phänotypischen Beobachtungen PAM defizienter Organismen beschrieben worden, die genauen Mechanismen jedoch, mit denen PAM seine beschriebene Rolle als Regulator des neuronalen Wachstums während der Embryonalentwicklung oder seinen Einfluss auf die spinale Verarbeitung noxischer Reize im adulten Organismus ausübt, ist noch nicht geklärt. Diese Arbeit kann daher einen Beitrag zum Verständnis dieser Vorgänge leisten, indem sie den TSC2 / mTOR Weg mit PAM verknüpft. Da beispielsweise sowohl PAM als auch S1P einen Einfluss auf die spinale Nozizeption ausüben ist dementsprechend auch eine regulatorische Rolle von mTOR bei der Regulation der Schmerzverarbeitung denkbar. So erfüllt mTOR in Neuronen eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung synaptischer Plastizität. Aktuelle Publikationen zeigen eine mTOR vermittelte, aktivitätsabhängige Proteintranslation, die bei der Verstärkung (Langzeitpotentierung / Long Term Potentiation / LTP) aber auch bei der Abschwächung (Langzeitdepression / Long Term Depression / LTD) der synaptischen Aktivität von Bedeutung ist¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Diese Prozesse spielen hauptsächlich bei Gedächtnis- und Lernvorgängen eine wichtige Rolle. So schneiden beispielsweise rapamycinbehandelte Ratten in Lern- und Erinnerungsversuchen, die als Tiermodell der LTP von hippokampalen Neuronen gelten, deutlich schlechter ab als Kontrolltiere¹⁷⁸.

Der Mechanismus der LTP ist aber auch bei der Ausbildung der so genannten „zentralen Sensibilisierung“, die beispielsweise durch inflammatorische Schmerzen eingeleitet werden kann, von Bedeutung. Durch die persistierende Reizung von peripheren Nozizeptoren kommt zu Proteinmodifikationen und transkriptionellen Vorgängen an den entsprechenden Synapsen im Dorsalhorn des Rückenmarks, wodurch die Exzitabilität der betroffenen Neurone gesteigert wird^{179, 180}. Diese Sensibilisierung äußert sich durch ein Absinken der Schmerzschwelle (Allodynie) und durch verstärkte Schmerzwahrnehmung (Hyperalgesie). Interessanterweise greifen die zentrale Sensibilisierung als auch die LTP auf konservierte Signalmechanismen zurück, die sich teilweise überschneiden^{181 182}. Man kann daher die Ausbildung der zentralen Sensibilisierung als eine Art spinaler LTP betrachten, die durch Aktivierung von nozizeptiven Afferenzen eingeleitet wird¹⁸³. So konnten Klein et al. zeigen, dass beim Mensch durch Induktion einer LTP mittels Hochfrequenzstimulation auch die Schmerzwahrnehmung gesteigert wird¹⁸⁴. Dementsprechend könnte die LTD bei analgetisch wirksamen Vorgängen eine Rolle spielen¹⁸⁵.

Unter der Annahme, dass mTOR bei der Entstehung einer LTP/LTD involviert ist, kann auch eine Rolle in der Steuerung der Schmerzverarbeitung angenommen werden. Die intrathekale Applikation des mTOR Inhibitors Rapamycin zeigt im „Formalin-Test“ allerdings nur eine tendenzielle Steigerung des nozizeptiven Verhaltens in Phase II. Ein Grund für die mangelnde Signifikanz der Daten liegt in der hohen Varianz der Messwerte begründet. Laut Tierexperimentator Dr. Coste konnte eine erfolgreiche intrathekale Injektion nicht überprüft werden, da dass Rapamycin mit der üblicherweise als Farbstoff mit injizierten Tusche interagiert (eigener Vorversuch in der Zellkultur). Tiere mit fehlerhafter oder unzureichender intrathekaler Rapamycininjektion konnten daher nicht aus der Versuchsreihe ausgeschlossen werden. Da die Fehlquote von Dr. Coste auf 25% geschätzt wurde, könnte dies eine Erklärung für die hohen Varianzen der Messdaten sein. Sollte die mTOR Hemmung, wie sich tendenziell andeutet, eine Steigerung des Schmerzantwort bewirkt, würde dies bedeuten, dass entweder analgetisch wirksame Vorgänge gehemmt werden oder pronozizeptive Prozesse stimuliert werden. Daher könnte die Identifikation der Proteine, die bei Reizung von Nozizeptoren in Neuronen des Dorsal Horns mTOR-abhängig translatiert werden, neue Anhaltspunkte für die Entstehung der zentralen Sensibilisierung liefern. Der hier durchgeführte Formalin-Test ist jedoch möglicherweise nicht das ideale

Modell, da er keine entzündlichen Vorgänge sondern nur Akutschmerz und eine kurzfristige zentrale Sensibilisierung bewirkt. Ein Effekt der mTOR Inhibierung lässt sich möglicherweise bei Vorgängen, bei denen es zu einer stärkeren Änderung der Proteinpopulation kommt, besser nachweisen.

Das Schmerzmodell des „Formalin-Tests“ wurde gewählt, weil hier ein Einfluss von S1P als auch von PAM auf die spinale Nozizeption bereits demonstriert wurde. Zusammen mit den in dieser Arbeit ermittelten *in vitro* Daten konnte daher spekuliert werden, dass diese Effekte auf die Schmerzverarbeitung im Formalintest möglicherweise über mTOR vermittelt werden. Um diese Theorie jedoch zu bestätigen, bedarf es Versuche die eine Kopplung dieser 3 Komponenten *in vivo* zeigen. Dies könnte durch die Untersuchung PAM defizienter Tiere geschehen, in denen das PAM Gen, durch konditionellen Knock-out nur in den schmerzrelevanten sensorischen Neuronen ausgeschaltet ist. Sollte es in diesen Tieren zu einer Neutralisation der analgetischen Effekte von S1P kommen, die zudem mit einer verminderten mTOR Aktivität einhergeht, würde dies zweifelsfrei eine Relevanz der S1P-PAM-mTOR Signalkaskade bei nozizeptiven Vorgängen bestätigen.

5. Zusammenfassung

Das "Protein Associated with Myc" spielt in den verschiedenen physiologischen Vorgängen eine Rolle. Dazu zählen Prozesse der Synaptogenese und Schmerzverarbeitung ebenso wie eine Regulation des Pteridin- und cAMP-Stoffwechsels. Auf welche Weise PAM die unterschiedlichen Effekte vermittelt, ist bislang nur in Ansätzen verstanden. Um die Wirkmechanismen von PAM aufzuklären, wurden in dieser Arbeit seine biochemischen Funktionen untersucht.

Die These, dass PAM als E3 Ubiquitinligase aktiv ist, konnte *in vitro* mittels biochemischer Versuche zweifelsfrei bestätigt werden. Sowohl das nativ aufgereinigte, humane PAM, als auch der heterolog exprimierte C-Terminale Bereich (C-PAM), der die katalytisch aktive RING Finger Domäne enthält, wiesen die Fähigkeit zur Ubiquitinkettenbildung und Autoubiquitinierung auf. Bei der Identifikation eines möglichen Zielproteins rückte das Protein TSC2 und der damit verbundene TSC2 / mTOR Signalweg in den Fokus. Für das gewählte Modell-System HeLa Zellen ließ sich eine Interaktion von PAM und TSC2 durch Ko-Immunopräzipitationen und Immunzytochemie nachweisen. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass das vollständige, native PAM, nicht aber die isolierte RING Finger Domäne, TSC2 polyubiquitinieren und zum proteasomalen Abbau markieren kann.

TSC2 ist ein negativer Regulator der mTOR Kinaseaktivität, in dem es den stimulatorischen Einfluss von Rheb auf mTOR inhibiert. PAM wird in HeLa Zellen durch das Phospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) aktiviert. Nach S1P Behandlung der Zellen war eine Phosphorylierung der Proteinkinase mTOR nachweisbar. Diese ging mit einer Aktivierung der Kinaseaktivität einher, wie die rapamycinsensitive Phosphorylierung der mTOR Zielproteine p70S6K und 4E-BP1 zeigte.

Durch Gabe von Rezeptor-Agonisten/-Antagonisten konnte eine Beteiligung des S1P₁ und S1P₂ Rezeptors ausgeschlossen werden. Der zunächst vermutete Mechanismus eines S1P induzierten, PAM-abhängigen Abbaus von TSC2 konnte trotz vielfältiger Herangehensweisen nicht nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung als Indikation einer Inaktivierung war ebenfalls nicht detektierbar. Auch die GAP Aktivität von TSC2 auf Rheb, wird in *in vitro* Versuchen durch die Interaktion mit PAM nicht vermindert. Durch eine Verminderung der TSC2 Expression mittels spezifischer siRNA zeigte sich, dass TSC2

nicht in die S1P-abhängige mTOR Aktivierung involviert ist. Auch regulatorische Proteinkinasen wie AKT, ERK oder PI3K, die durch S1P aktiviert werden können, sind an dem Signalweg nicht beteiligt, wie die Hemmung dieser Enzyme mit spezifischen Inhibitoren zeigte.

Dagegen konnte eine Beteiligung von PAM und Rheb zum einen mittels Proteintransfektion bestätigt werden, zum anderen ließen sich die S1P Effekte durch Hemmstoffe verhindern, die für eine Aktivierung von PAM, respektive Rheb, nötig sind. Durch Nukleotidbindungsstudien war ein Einfluss von PAM auf den GTP-Beladungszustand von Rheb nachweisbar. Sowohl in einem GTP γ S Bindungsversuch als auch in einem GDP Dissoziationsexperiment erhöhte PAM konzentrationsabhängig die GTP Bindung bzw. den GDP/GTP Austausch an Rheb.

In dieser Arbeit wird damit erstmalig eine duale Funktion eines Proteins als Ubiquitinligase *und* GEF beschrieben. So konnte die postulierte Aktivität von PAM als Ubiquitinligase bestätigt und TSC2 als Zielprotein identifiziert werden. Gleichzeitig wurde ein TSC2 unabhängiger Weg der mTOR Aktivierung aufgeklärt, an dem PAM und Rheb beteiligt sind. Als möglicher Mechanismus kommt eine Aktivität von PAM als Guanin-Nukleotid Austausch Faktor (GEF) auf Rheb in Frage. Durch Beschreibung von PAM als negativem Regulator von TSC2 *und* Aktivator von Rheb trägt diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zur TSC2 / mTOR Forschung bei. Umgekehrt ermöglicht sie eine neue Sichtweise auf partiell PAM-abhängige Vorgänge wie Synaptogenese und Nozizeption, indem sie TSC2 / mTOR in diese Prozesse integriert.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Struktur von PAM	2
Abbildung 1-2 S1P vermittelte Aktivierung von PAM	5
Abbildung 1-3 Steuerung der Proteintranslation durch den TSC2 / mTOR Signalweg	9
Abbildung 1-4 Der Ubiquitin – Proteasom Signalweg	12
Abbildung 1-5 Modelle der RING Finger Domäne von RING E3 Ubiquitinligasen	14
Abbildung 2-1 Coomassie Gel der GST-RCC1 Aufreinigung	30
Abbildung 3-1 Native PAM Aufreinigung aus HeLa Zellen	36
Abbildung 3-2 PAM Autoubiquitinierung	37
Abbildung 3-3 C-PAM besitzt Auto-Ubiquitinierungsaktivität	38
Abbildung 3-4 PAM Ko-Immunopräzipitiert mit TSC2 aus HeLa Lysat	40
Abbildung 3-5 Immunopräzipitiertes TSC2 wird nicht durch PAM ubiquitiniert	41
Abbildung 3-6 TSC2 wird PAM-abhängig ubiquitiniert	42
Abbildung 3-7 S1P induziert nicht den Abbau von TSC2	44
Abbildung 3-8 S1P führt nicht zu einer Phosphorylierung von TSC2	45
Abbildung 3-9 S1P vermindert nicht die PAM-TSC2 Interaktion	46
Abbildung 3-10 S1P führt zu einer Phosphorylierung an Serin 2448	48
Abbildung 3-11 Zielproteine von mTOR werden nach S1P Stimulation phosphoryliert	50
Abbildung 3-12 ERK, AKT und PI3K unabhängige mTOR Phosphorylierung	51
Abbildung 3-13 mTOR wird Go/i, Phospholipase C und PKC- abhängig phosphoryliert	52
Abbildung 3-14 Erhöhung der intrazellulären PAM Konzentrationen erhöht die Sensitivität der S1P induzierten mTOR Phosphorylierung	53
Abbildung 3-15 Aufreinigung von GST-Rheb und GST aus E.coli	54
Abbildung 3-16 Schematische Darstellung des steady-state GTPase Versuches	55
Abbildung 3-17 PAM inhibiert nicht die GAP Aktivität von TSC2 auf Rheb	56
Abbildung 3-18 Schematische Darstellung des steady-state GTPase Versuches in Anwesenheit einer GEF (PAM)	57
Abbildung 3-19 PAM beeinflusst die Nukleotidbindungseigenschaften von Rheb	58
Abbildung 3-20 Die S1P induzierte mTOR Phosphorylierung ist TSC2 unabhängig	59
Abbildung 3-21 Die S1P induzierte Aktivierung von mTOR ist Rheb-abhängig	61
Abbildung 3-22 Hotplate-Test mit Mäusen nach intrathekalen Rapamycin Gabe	63
Abbildung 3-23 Formalintest mit Mäusen nach intrathekalen Rapamycin Gabe	64
Abbildung 4-1 PAM RING Finger Konsensussequenzen aus verschiedenen Organismen	66
Abbildung 4-2 Modell für die S1P induzierte mTOR Aktivierung	74

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-bis(<i>O</i> -aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetracetic acid acetyl methyl ester
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemo luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK-2	Extracellular-signal-regulated protein kinase-2
FCS	Fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
kDa	Kilo-Dalton
Min.	Minute
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
o.a.	oben angeführt
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKB	Protein kinase B
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RSK-1	ribosomal S6-kinase 1
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard error of the mean
Ser	Serin
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
vgl.	Vergleiche

8. Publikationen und Tagungsbeiträge

Christian Maeurer, Sandra Pierre, Wiebke Potstada, Gerd Geisslinger and Klaus Scholich
“*Sphingosine-1-Phosphate induced activation of mTOR is mediated by PAM and Rheb independently of TSC2.*” *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, Volume 375 (03/2007)

C. Maeurer, S.C. Pierre, W. Potstada, S. Holland and K. Scholich (2007)
“*Sphingosine-1-phosphate induced mTOR-activation is mediated by the E3-ubiquitin ligase PAM*” *Oncogene* (in Überarbeitung)

Ovidiu Coste, Christian Brenneis., Sandra Pierre, Claudiu Marian, Christian Maeurer, Helmut Schmidt, Corina Ehnert, Gerd Geisslinger, and Klaus Scholich (2007)
“*Sphingosine-1-Phosphate modulates spinal nociceptive processing*”. Submitted to PNAS

C. Maeurer, S.C. Pierre, W. Potstada, G. Geisslinger, K. Scholich “*Sphingosine 1 Phosphat aktiviert mTOR über PAM und Rheb unabhängig von TSC2*“
Vortrag auf der 48. Frühjahrstagung der DGPT, 13-15. März, 2007, Mainz

Winkler, M., Maeurer, C., Hemschemeier, A. and Happe T. (2004) “*The isolation of green algal strains with outstanding H₂-productivity*”. Biohydrogen III, (Miyake J, Igarashi Y, Roegner M., eds), Elsevier Science, Oxford, 103-115.

Happe T., Maeurer, C. and Hemschemeier A. (2002) Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants for hydrogen production.
Poster, NEDO Meeting Development of molecular devices for hydrogen production. Kyoto, Japan.

9. Literaturverzeichnis

1. Consortium., H. G. S. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-45 (2004).
2. Guo, Q., Xie, J., Dang, C. V., Liu, E. T. & Bishop, J. M. Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9172-7 (1998).
3. Murthy, V. et al. Pam and its ortholog highwire interact with and may negatively regulate the TSC1.TSC2 complex. *J Biol Chem* 279, 1351-8 (2004).
4. Scholich, K., Pierre, S. & Patel, T. B. Protein associated with Myc (PAM) is a potent inhibitor of adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 276, 47583-9 (2001).
5. Gao, X. & Patel, T. B. Histidine residues 912 and 913 in protein associated with Myc are necessary for the inhibition of adenylyl cyclase activity. *Mol Pharmacol* 67, 42-9 (2005).
6. Pierre, S. C., Hausler, J., Birod, K., Geisslinger, G. & Scholich, K. PAM mediates sustained inhibition of cAMP signaling by sphingosine-1-phosphate. *Embo J* 23, 3031-40 (2004).
7. Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A. & Wittinghofer, A. Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell* 105, 245-55 (2001).
8. Azuma, Y. et al. Model of the ran-RCC1 interaction using biochemical and docking experiments. *J Mol Biol* 289, 1119-30 (1999).
9. Rosa, J. L., Casaroli-Marano, R. P., Buckler, A. J., Vilaro, S. & Barbacid, M. p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins. *Embo J* 15, 4262-73 (1996).
10. Garcia-Gonzalo, F. R., Bartrons, R., Ventura, F. & Rosa, J. L. Requirement of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate for HERC1-mediated guanine nucleotide release from ARF proteins. *FEBS Lett* 579, 343-8 (2005).
11. Cherfils, J. & Chardin, P. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 306-11 (1999).
12. Joazeiro, C. A. & Weissman, A. M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-52 (2000).
13. Jackson, P. K. et al. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 10, 429-39 (2000).
14. Freemont, P. S. RING for destruction? *Curr Biol* 10, R84-7 (2000).
15. Zhen, M., Huang, X., Bamber, B. & Jin, Y. Regulation of presynaptic terminal organization by *C. elegans* RPM-1, a putative guanine nucleotide exchanger with a RING-H2 finger domain. *Neuron* 26, 331-43 (2000).
16. D'Souza, J. et al. Formation of the retinotectal projection requires Esrom, an ortholog of PAM (protein associated with Myc). *Development* 132, 247-56 (2005).
17. Wu, C., Wairkar, Y. P., Collins, C. A. & DiAntonio, A. Highwire function at the *Drosophila* neuromuscular junction: spatial, structural, and temporal requirements. *J Neurosci* 25, 9557-66 (2005).

18. Liao, E. H., Hung, W., Abrams, B. & Zhen, M. An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation. *Nature* 430, 345-50 (2004).
19. Nakata, K. et al. Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. *Cell* 120, 407-20 (2005).
20. Ehnert, C. et al. Protein associated with Myc (PAM) is involved in spinal nociceptive processing. *J Neurochem* 88, 948-57 (2004).
21. Yang, H. et al. Developmental expression of PAM (protein associated with MYC) in the rodent brain. *Brain Res Dev Brain Res* 136, 35-42 (2002).
22. Santos, T. M. et al. Alternative splicing in protein associated with Myc (Pam) influences its binding to c-Myc. *J Neurosci Res* 83, 222-32 (2006).
23. Schaefer, A. M., Hadwiger, G. D. & Nonet, M. L. rpm-1, a conserved neuronal gene that regulates targeting and synaptogenesis in *C. elegans*. *Neuron* 26, 345-56 (2000).
24. Chang, Q. & Balice-Gordon, R. J. Highwire, rpm-1, and futsch: balancing synaptic growth and stability. *Neuron* 26, 287-90 (2000).
25. McCabe, B. D. et al. Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron* 41, 891-905 (2004).
26. Wan, H. I. et al. Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 26, 313-29 (2000).
27. Burgess, R. W. et al. Evidence for a conserved function in synapse formation reveals Phr1 as a candidate gene for respiratory failure in newborn mice. *Mol Cell Biol* 24, 1096-105 (2004).
28. Le Guyader, S., Maier, J. & Jesuthasan, S. Esrom, an ortholog of PAM (protein associated with c-myc), regulates pteridine synthesis in the zebrafish. *Dev Biol* 277, 378-86 (2005).
29. Taiwo, Y. O., Bjerknes, L. K., Goetzl, E. J. & Levine, J. D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 32, 577-80 (1989).
30. England, S., Bevan, S. & Docherty, R. J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol (Lond)* 495, 429-440 (1996).
31. Vanegas, H. & Schaible, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64, 327-63 (2001).
32. Vasquez, E. et al. Spinal Prostaglandins Are Involved in the Development But Not the Maintenance of Inflammation-Induced Spinal Hyperexcitability. *J. Neurosci.* 21, 9001-9008 (2001).
33. Williams, J. T., Christie, M. J. & Manzoni, O. Cellular and Synaptic Adaptations Mediating Opioid Dependence. *Physiol. Rev.* 81, 299-343 (2001).
34. Formigli, L. et al. Sphingosine 1-phosphate induces cytoskeletal reorganization in C2C12 myoblasts: physiological relevance for stress fibres in the modulation of ion current through stretch-activated channels. *J Cell Sci* 118, 1161-71 (2005).
35. Donati, C. & Bruni, P. Sphingosine 1-phosphate regulates cytoskeleton dynamics: implications in its biological response. *Biochim Biophys Acta* 1758, 2037-48 (2006).

36. Eigenbrod, S., Derwand, R., Jakl, V., Endres, S. & Eigler, A. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration, endocytosis and apoptosis of dendritic cells. *Immunol Invest* 35, 149-65 (2006).
37. Czeloth, N., Bernhardt, G., Hofmann, F., Genth, H. & Forster, R. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol* 175, 2960-7 (2005).
38. Rosen, H. & Goetzl, E. J. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5, 560-70 (2005).
39. Ryu, J. et al. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *Embo J* 25, 5840-51 (2006).
40. Maceyka, M., Payne, S. G., Milstien, S. & Spiegel, S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585, 193-201 (2002).
41. Laychock, S. G., Sessanna, S. M., Lin, M. H. & Mastrandrea, L. D. Sphingosine 1-phosphate affects cytokine-induced apoptosis in rat pancreatic islet beta-cells. *Endocrinology* 147, 4705-12 (2006).
42. Weigert, A. et al. Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. *Blood* 108, 1635-42 (2006).
43. Kim, D. S., Hwang, E. S., Lee, J. E., Kim, S. Y. & Park, K. C. Sphingosine-1-phosphate promotes mouse melanocyte survival via ERK and Akt activation. *Cell Signal* 15, 919-26 (2003).
44. Baudhuin, L. M. et al. S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). *Faseb J* 18, 341-3 (2004).
45. Hsieh, H. L. et al. Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression via PI3K/Akt and p42/p44 MAPK pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 207, 757-66 (2006).
46. Park, M. T. et al. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *J Biol Chem* 278, 50624-34 (2003).
47. Lepley, D., Paik, J. H., Hla, T. & Ferrer, F. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res* 65, 3788-95 (2005).
48. Mehta, D., Konstantoulaki, M., Ahmmed, G. U. & Malik, A. B. Sphingosine 1-phosphate-induced mobilization of intracellular Ca²⁺ mediates rac activation and adherens junction assembly in endothelial cells. *J Biol Chem* 280, 17320-8 (2005).
49. Miura, S. et al. Ras/Raf1-dependent signal in sphingosine-1-phosphate-induced tube formation in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 924-9 (2003).
50. An, S., Bleu, T. & Zheng, Y. Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1-phosphate receptors. *Mol Pharmacol* 55, 787-94 (1999).
51. Cummings, R. J. et al. Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 30227-35 (2002).

52. Ramesh, V. Aspects of tuberous sclerosis complex (TSC) protein function in the brain. *Biochem Soc Trans* 31, 579-83 (2003).
53. Jefferies, H. B., Reinhard, C., Kozma, S. C. & Thomas, G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4441-5 (1994).
54. Schmelzle, T. & Hall, M. N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103, 253-62 (2000).
55. Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15, 807-26 (2001).
56. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-84 (2006).
57. Fingar, D. C. & Blenis, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-71 (2004).
58. Hay, N. & Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-45 (2004).
59. Holland, E. C., Sonenberg, N., Pandolfi, P. P. & Thomas, G. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* 23, 3138-44 (2004).
60. Martin, D. E. & Hall, M. N. The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 17, 158-66 (2005).
61. Lenz, G. & Avruch, J. Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *J Biol Chem* 280, 38121-4 (2005).
62. Gong, R., Park, C. S., Abbassi, N. R. & Tang, S. J. Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281, 18802-15 (2006).
63. Deldicque, L., Theisen, D. & Francaux, M. Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 94, 1-10 (2005).
64. Astrinidis, A. & Henske, E. P. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene* 24, 7475-81 (2005).
65. Tee, A. R. & Blenis, J. mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol* 16, 29-37 (2005).
66. El-Hashemite, N., Zhang, H., Henske, E. P. & Kwiatkowski, D. J. Mutation in TSC2 and activation of mammalian target of rapamycin signalling pathway in renal angiomyolipoma. *Lancet* 361, 1348-9 (2003).
67. Kristof, A. S., Marks-Konczalik, J., Billings, E. & Moss, J. Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* 278, 33637-44 (2003).
68. Lindemann, S. W. et al. Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7076-81 (2004).
69. Lim, H. K. et al. Phosphatidic acid regulates systemic inflammatory responses by modulating the Akt-mammalian target of rapamycin-p70 S6 kinase 1 pathway. *J Biol Chem* 278, 45117-27 (2003).

70. Abraham, R. T. & Wiederrecht, G. J. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 14, 483-510 (1996).
71. Breslin, E. M., White, P. C., Shore, A. M., Clement, M. & Brennan, P. LY294002 and rapamycin co-operate to inhibit T-cell proliferation. *Br J Pharmacol* 144, 791-800 (2005).
72. Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A. & Tonegawa, S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59-73 (2004).
73. Huang, S., Bjornsti, M. A. & Houghton, P. J. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther* 2, 222-32 (2003).
74. Kuo, C. J. et al. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 358, 70-3 (1992).
75. Franz, D. N. et al. Rapamycin causes regression of astrocytomas in tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol* 59, 490-8 (2006).
76. Wienecke, R. et al. Antitumoral activity of rapamycin in renal angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex. *Am J Kidney Dis* 48, e27-9 (2006).
77. Guba, M. et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8, 128-35 (2002).
78. Easton, J. B. & Houghton, P. J. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 25, 6436-46 (2006).
79. Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N. & Hay, N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 12, 502-13 (1998).
80. Gingras, A. C. et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13, 1422-37 (1999).
81. Haghghat, A., Mader, S., Pause, A. & Sonenberg, N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J* 14, 5701-9 (1995).
82. Schwab, M. S. et al. p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 19, 2485-94 (1999).
83. Jefferies, H. B. et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J* 16, 3693-704 (1997).
84. Tsokas, P. et al. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J Neurosci* 25, 5833-43 (2005).
85. Takei, N. et al. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci* 24, 9760-9 (2004).
86. Tiruchinapalli, D. M. et al. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* 23, 3251-61 (2003).
87. Tongiorgi, E., Righi, M. & Cattaneo, A. Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17, 9492-505 (1997).
88. Martin, K. C. & Zukin, R. S. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26, 7131-4 (2006).

89. Nave, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R. & Shepherd, P. R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 344 Pt 2, 427-31 (1999).
90. Sekulic, A. et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 60, 3504-13 (2000).
91. Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. & Avruch, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 15, 702-13 (2005).
92. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K. L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829-34 (2003).
93. Yan, L. et al. Hyperactivation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling by a gain-of-function mutant of the Rheb GTPase. *J Biol Chem* 281, 19793-7 (2006).
94. Li, Y., Inoki, K. & Guan, K. L. Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity. *Mol Cell Biol* 24, 7965-75 (2004).
95. Zhang, Y. et al. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 5, 578-81 (2003).
96. Li, Y., Corradetti, M. N., Inoki, K. & Guan, K. L. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 29, 32-8 (2004).
97. Manning, B. D. & Cantley, L. C. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* 28, 573-6 (2003).
98. van Slegtenhorst, M. et al. Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 7, 1053-7 (1998).
99. Cai, S. L. et al. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* 173, 279-89 (2006).
100. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-57 (2002).
101. Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P. & Blenis, J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13489-94 (2004).
102. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Pandolfi, P. P. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179-93 (2005).
103. Wu, E. H. T. & Wong, Y. H. Involvement of Gi/o Proteins in Nerve Growth Factor-Stimulated Phosphorylation and Degradation of Tuberlin in PC-12 Cells and Cortical Neurons. *Mol Pharmacol* 67, 1195-1205 (2005).
104. Kipreos, E. T. & Pagano, M. The F-box protein family. *Genome Biol* 1, REVIEWS3002 (2000).
105. Schlesinger, D. H., Goldstein, G. & Niall, H. D. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14, 2214-8 (1975).
106. Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206-14 (1983).

107. Glickman, M. H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428 (2002).
108. Deshaies, R. J. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 435-67 (1999).
109. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19, 94-102 (2000).
110. Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. & Goldberg, A. L. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274, 3363-71 (1999).
111. Chung, C. H. & Baek, S. H. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 633-40 (1999).
112. D'Andrea, A. & Pellman, D. Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33, 337-52 (1998).
113. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79 (1998).
114. Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L. & Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78, 773-85 (1994).
115. Alvarez-Castelao, B. & Castano, J. G. Mechanism of direct degradation of I kappa B alpha by 20S proteasome. *FEBS Lett* 579, 4797-802 (2005).
116. Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-8 (1991).
117. Rolfe, M., Chiu, M. I. & Pagano, M. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *J Mol Med* 75, 5-17 (1997).
118. Ciechanover, A., Shkedy, D., Oren, M. & Bercovich, B. Degradation of the tumor suppressor protein p53 by the ubiquitin-mediated proteolytic system requires a novel species of ubiquitin-carrier protein, E2. *J Biol Chem* 269, 9582-9 (1994).
119. Bossis, G., Ferrara, P., Acquaviva, C., Jariel-Encontre, I. & Piechaczyk, M. c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. *Mol Cell Biol* 23, 7425-36 (2003).
120. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-36 (1990).
121. Brooks, C. L. & Gu, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21, 307-15 (2006).
122. Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-81 (2006).
123. Hoeller, D., Hecker, C. M. & Dikic, I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 776-88 (2006).
124. Ciechanover, A. & Brundin, P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40, 427-46 (2003).
125. Kuras, L. et al. Dual regulation of the met4 transcription factor by ubiquitin-dependent degradation and inhibition of promoter recruitment. *Mol Cell* 10, 69-80 (2002).

126. van der Horst, A. et al. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* 8, 1064-73 (2006).
127. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-41 (2002).
128. Finley, D., Bartel, B. & Varshavsky, A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338, 394-401 (1989).
129. Haglund, K., Di Fiore, P. P. & Dikic, I. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28, 598-603 (2003).
130. Hegde, A. N. Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 73, 311-57 (2004).
131. Cyr, D. M., Hohfeld, J. & Patterson, C. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* 27, 368-75 (2002).
132. Gardner, R. G., Nelson, Z. W. & Gottschling, D. E. Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell* 120, 803-15 (2005).
133. Platta, H. W., Girzalsky, W. & Erdmann, R. Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem J* 384, 37-45 (2004).
134. Zhang, X. D. & Matunis, M. J. Ub in charge: regulating E2 enzyme nuclear import. *Nat Cell Biol* 7, 12-4 (2005).
135. Lorick, K. L. et al. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-9 (1999).
136. Pintard, L., Willems, A. & Peter, M. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *Embo J* 23, 1681-7 (2004).
137. Saurin, A. J., Borden, K. L., Boddy, M. N. & Freemont, P. S. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 21, 208-14 (1996).
138. Chen, A., Kleiman, F. E., Manley, J. L., Ouchi, T. & Pan, Z. Q. Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 277, 22085-92 (2002).
139. Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102, 533-9 (2000).
140. Kabcenell, A. K., Goud, B., Northup, J. K. & Novick, P. J. Binding and hydrolysis of guanine nucleotides by Sec4p, a yeast protein involved in the regulation of vesicular traffic. *J Biol Chem* 265, 9366-72 (1990).
141. Hall, A. & Self, A. J. The effect of Mg²⁺ on the guanine nucleotide exchange rate of p21N-ras. *J Biol Chem* 261, 10963-5 (1986).
142. Dubuisson, D. & Dennis, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161-74 (1977).
143. Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H. & Weissman, A. M. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275, 8945-51 (2000).
144. Chen, Z. & Pickart, C. M. A 25-kilodalton ubiquitin carrier protein (E2) catalyzes multi-ubiquitin chain synthesis via lysine 48 of ubiquitin. *J Biol Chem* 265, 21835-42 (1990).
145. Pickart, C. M. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 8, 499-504 (2001).

146. Tsubuki, S. et al. Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 1195-201 (1993).
147. Urushitani, M. et al. CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *J Neurochem* 90, 231-44 (2004).
148. Aicher, L. D., Campbell, J. S. & Yeung, R. S. Tuberin phosphorylation regulates its interaction with hamartin. Two proteins involved in tuberous sclerosis. *J Biol Chem* 276, 21017-21 (2001).
149. Tee, A. R., Anjum, R. & Blenis, J. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem* 278, 37288-96 (2003).
150. Yu, Y., Kudchodkar, S. B. & Alwine, J. C. Effects of simian virus 40 large and small tumor antigens on mammalian target of rapamycin signaling: small tumor antigen mediates hypophosphorylation of eIF4E-binding protein 1 late in infection. *J Virol* 79, 6882-9 (2005).
151. Reynolds, T. H. t., Bodine, S. C. & Lawrence, J. C., Jr. Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem* 277, 17657-62 (2002).
152. Basso, A. D. et al. The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb farnesylation and mTOR signaling. Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti-tumor activity. *J Biol Chem* 280, 31101-8 (2005).
153. Ovidiu Coste, C. B., Sandra Pierre, Claudiu Marian, Christian Maeurer, Helmut Schmidt, Corina Ehnert, Gerd Geisslinger, and Klaus Scholich. Sphingosine-1-Phosphate modulates spinal nociceptive processing. *Plos* (2007).
154. Kelly, P. A., Gruber, S. A., Behbod, F. & Kahan, B. D. Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. *Pharmacotherapy* 17, 1148-56 (1997).
155. Marczin, N., Ryan, U. S. & Catravas, J. D. Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther* 263, 170-9 (1992).
156. Lindl, T., Bauer, J. *Zell- und Gewebekultur* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1989).
157. Aristarkhov, A. et al. E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4294-9 (1996).
158. Yamanaka, A. et al. Cell cycle-dependent expression of mammalian E2-C regulated by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Mol Biol Cell* 11, 2821-31 (2000).
159. Hatakeyama, S., Jensen, J. P. & Weissman, A. M. Subcellular localization and ubiquitin-conjugating enzyme (E2) interactions of mammalian HECT family ubiquitin protein ligases. *J Biol Chem* 272, 15085-92 (1997).
160. Gonen, H. et al. Identification of the ubiquitin carrier proteins, E2s, involved in signal-induced conjugation and subsequent degradation of I κ B α . *J Biol Chem* 274, 14823-30 (1999).
161. Nobukuni, T. et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14238-43 (2005).
162. Hla, T. et al. Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger? *Biochem Pharmacol* 58, 201-7 (1999).

163. Spiegel, S. Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukoc Biol* 65, 341-4 (1999).
164. Van Brocklyn, J. R. et al. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 142, 229-40 (1998).
165. Koide, Y. et al. Development of novel EDG3 antagonists using a 3D database search and their structure-activity relationships. *J Med Chem* 45, 4629-38 (2002).
166. Osada, M., Yatomi, Y., Ohmori, T., Ikeda, H. & Ozaki, Y. Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 483-7 (2002).
167. Niedernberg, A., Scherer, C. R., Busch, A. E. & Kostenis, E. Comparative analysis of human and rat S1P(5) (edg8): differential expression profiles and sensitivities to antagonists. *Biochem Pharmacol* 64, 1243-50 (2002).
168. Spiegel, S. & Milstien, S. Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1484, 107-16 (2000).
169. Takuwa, Y. et al. Subtype-specific, differential activities of the EDG family receptors for sphingosine-1-phosphate, a novel lysophospholipid mediator. *Mol Cell Endocrinol* 177, 3-11 (2001).
170. Im, E. et al. Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells. *Oncogene* 21, 6356-65 (2002).
171. Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C. & Blenis, J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 13, 1259-68 (2003).
172. Chong-Kopera, H. et al. TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 281, 8313-6 (2006).
173. Rosa, J. L. & Barbacid, M. A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70. *Oncogene* 15, 1-6 (1997).
174. Xiao, G. H., Shoarinejad, F., Jin, F., Golemis, E. A. & Yeung, R. S. The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J Biol Chem* 272, 6097-100 (1997).
175. Nguyen, P. V. Protein synthesis during LTP: linking synaptic activity to translation. *Trends Neurosci* 25, 180 (2002).
176. Cammalleri, M. et al. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14368-73 (2003).
177. Hou, L. & Klann, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 24, 6352-61 (2004).
178. Dash, P. K., Orsi, S. A. & Moore, A. N. Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex-Mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 26, 8048-56 (2006).
179. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-10 (2001).

-
180. Woolf, C. J. & Salter, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765-9 (2000).
 181. Kantner, R. M., Goldstein, B. D. & Kirby, M. L. Regulatory mechanisms for substance P in the dorsal horn during a nociceptive stimulus: axoplasmic transport vs electrical activity. *Brain Res* 385, 282-90 (1986).
 182. Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A. & Woolf, C. J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26, 696-705 (2003).
 183. Sandkuhler, J. Learning and memory in pain pathways. *Pain* 88, 113-8 (2000).
 184. Klein, T., Magerl, W., Hopf, H. C., Sandkuhler, J. & Treede, R. D. Perceptual correlates of nociceptive long-term potentiation and long-term depression in humans. *J Neurosci* 24, 964-71 (2004).
 185. Heinke, B. & Sandkuhler, J. Signal transduction pathways of group I metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression at sensory spinal synapses. *Pain* 118, 145-54 (2005).

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Mäurer
Kelterbaum 27
56626 Andernach

geboren am 27.10.1973 in Remagen

Abitur

1994 Kurfürst Salentin Gymnasium Andernach

Zivildienst

1994-1995: Fachklinik Bad Tönisstein

Berufsausbildung

1995-1997: Staatlich geprüfter Biologisch-Technischer-Assistent
Rheinische Akademie, Köln

Hochschulstudium

1997-2003 Studium der Biologie
an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn
Diplomarbeit am Insitut für Molekularbiologie und Biochemie der
Pflanzen (Prof. Dr. Wolfgang Hachtel)

2003-2007 Naturwissenschaftliche Promotion
am Institut für Klinische Pharmakologie (Prof. Dr. Dr. Gerd
Geißlinger)
Johann Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main

11. Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Gerd Geißlinger danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit am Institut für Klinische Pharmakologie sowie für die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Professor Dr. Rolf Marschalek danke ich für Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Klaus Scholich bedanke ich mich für die engagierte Betreuung und die Möglichkeit, jederzeit über fachliche Fragen diskutieren zu können.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für das freundschaftliche Verhältnis und die gute Zusammenarbeit danken, insbesondere Wiebke Becker, Kerstin Birot, Christian Brenneis, Dr. Corina Ehnert, Melanie Friedrichs, Julia Häussler und Dr. Sandra Pierre.

Besonders herzlicher Dank an Agathe, Hans-Josef und Iris