

*Die Funktion der RhoGTPasen  
in den von Toll-Rezeptoren induzierten  
Signaltransduktionswegen*

Dissertation

zur Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nicole Teusch  
geboren in Trier

Mainz, Mai 2002

Der experimentelle Teil der Dissertation wurde angefertigt am:

Scripps Research Institute (TSRI)

Department of Immunology

10550 North Torrey Pines Road

La Jolla, CA 92037

USA

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2002

## **Im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen**

Arbibe, L., Mira, J.P., **Teusch, N.**, Kline, L., Guha M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch, R.J., and Knaus, U.G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF- $\kappa$ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immun.* *1*, 533-540

**Teusch, N.**, Gardiner, E., Janssen, E., Ulevitch, R.J., and Knaus, U.G. (2002). The GTPase RhoA regulates as a key element in Toll-like receptor 2 signaling both, NF- $\kappa$ B activation and apoptotic membrane blebbing. *Cell*, eingereicht

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Theoretische Grundlagen	
1.1.1 Toll-ähnliche Rezeptoren: Schlüsselemente der primären Immunantwort	1
1.1.2 Rho GTPasen: Multiple zelluläre Regulatoren	7
1.2 Zielsetzung	9
<b>2. Verwendete Materialien</b>	<b>11</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 RT-PCR zur Ermittlung der Expression bestimmter Gene in verschiedenen Zelllinien	
3.2 Transiente Transfektion und Durchführung der Luziferase-Assays	18
3.3 RBD- und PBD-Assay	21
3.4 Immunopräzipitationen	23
3.5 Live-Cell Imaging	24
3.6 Immunofluoreszenzstudien	24
3.7 Durchgeführte Analysen am FACS	25

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
4.1 TLR2 aktiviert NF- $\kappa$ B mittels eines Rac1-abhängigen Signalweges	
4.1.1 Stimulierung von TLR2 mit <i>S. aureus</i> aktiviert Rac1	27
4.1.2 Stimulation von TLR2 induziert die Interaktion des Austauschfaktors Vav mit Rac	29
4.1.3 Rac1 kontrolliert die durch TLR2 induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B	32
4.1.4 Die Rac1-abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung involviert Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K)	35
4.1.5 Die Rac1/PI-3K Kaskade reguliert die Transaktivierung von p65	37
4.2 Die GTPase RhoA kontrolliert als Schlüsselement zwei verschiedene von TLR2 induzierte Signalwege: NF- $\kappa$ B Aktivierung und Apoptose	41
4.2.1 Stimulierung von TLR2 mit <i>S. aureus</i> führt zur transienten Aktivierung von RhoA	
4.2.2 RhoA kontrolliert die von TLR2 induzierte NF- $\kappa$ B abhängige Gentranskription	43
4.2.3 RhoA ist nicht Bestandteil des Rac1-abhängigen NF- $\kappa$ B Aktivierungssignalweg	47
4.2.4 Die RhoA-abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung involviert PKC $\zeta$	
4.2.5 RhoA kontrolliert das von TLR2 induzierte Membran-Blebbing	55
4.2.6 Rho kontrolliert die früh-apoptotischen Ereignisse durch ROCK	60
4.2.7 Apoptotisches Membran-Blebbing in Monozyten benötigt ROCK and MLCK	62

---

<b>5. Diskussion</b>	<b>68</b>
5.1 Die Rolle von Rac1 in der TLR2-induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung	
5.2 Die Bedeutung der RhoA $\rightarrow$ PKC $\zeta$ Kaskade für die NF- $\kappa$ B Aktivierung	70
5.3 Die Bedeutung der RhoA $\rightarrow$ ROCK Kaskade für die bakteriell induzierte Apoptose	72
5.4 RhoA als Knotenpunkt in der dualen Signaltransduktion von TLR2	74
5.5 Die Bedeutung von Apoptose für die primäre Immunantwort	78
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
Abkürzungsverzeichnis	91
Lebenslauf	93

## **1. Einleitung**

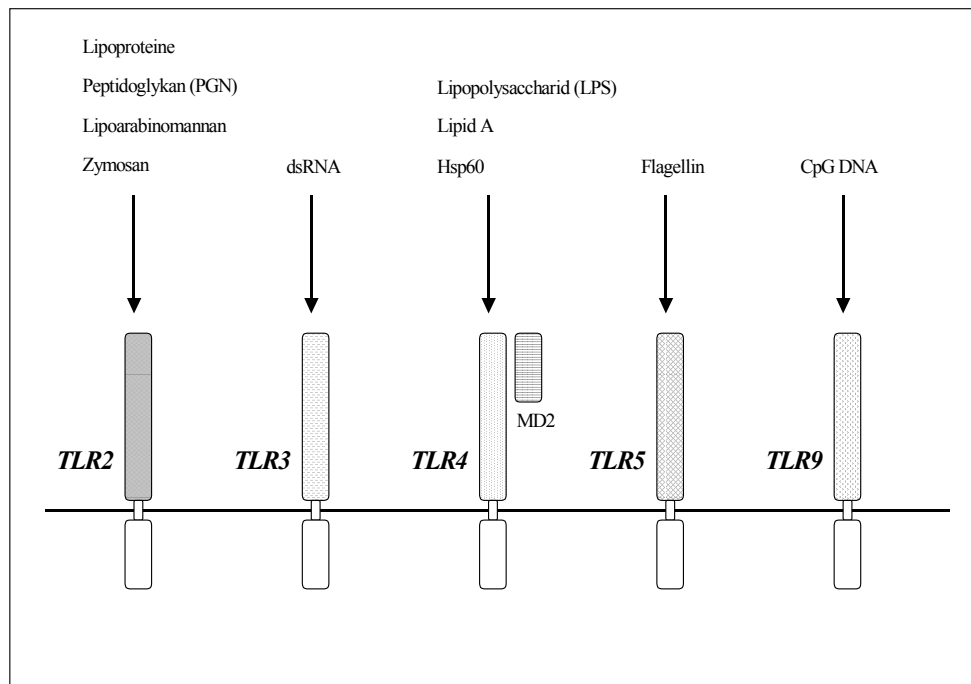
### **1.1 Theoretische Grundlagen**

#### **1.1.1 Toll-ähnliche Rezeptoren: Schlüsselemente der primären Immunantwort**

Infektiöse Mikroorganismen repräsentieren eine konstante Bedrohung für alle Mehrzeller. Die Entwicklung eines wirksamen Verteidigungsmechanismus, der unmittelbar nach der Mikrobeninvasion aktiviert wird, bildete deshalb eine entscheidende Grundlage für die Evolution von Metazoen. Eine bemerkenswerte Eigenschaft dieses sogenannten primären Immunsystems besteht darin, ein breites Spektrum an infektiösen Mikroorganismen zu erkennen und gleichzeitig zwischen Wirtszellen und Pathogenen differenzieren zu können. Das Prinzip der primären Immunantwort beruht auf der Fähigkeit von Mustererkennungsrezeptoren (engl.: Pattern-recognition receptors; PRRs), die hochkonservierten molekularen Strukturen mikrobieller Produkte spezifisch zu detektieren (Aderem & Ulevitch, 2000; Akira et al., 2001; Underhill & Ozinsky, 2002). Ein entscheidender Beitrag zum Verständnis der Pathogenerkennung leistete die erst kürzliche Entdeckung von Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl.: Toll-like receptors; TLRs), die in Säugetieren als PRRs fungieren (Medzhitov et al., 1997). Toll-ähnliche Rezeptoren zeigen, wie ihr Name bereits vermuten läßt, eine große Homologie zum Rezeptor Toll, der in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* während der Embryogenese für die Etablierung der dorso-ventralen Achse verantwortlich ist und außerdem in der Immunantwort der ausgewachsenen Fliege eine Rolle spielt (Lemaitre et al., 1996). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind zehn Mitglieder dieser Familie der Mustererkennungsrezeptoren in Säugetieren identifiziert worden (TLRs 1-10). Ausgehend von Gendatenbankrecherchen können aber noch weitere, bisher unbekannte Familienmitglieder angenommen werden (Akira et al., 2001). Für einige TLRs wurden



stimulierende Liganden identifiziert, die die Spezifität der einzelnen Rezeptoren in der Erkennung mikrobieller Produkte unterstreicht (Abb. 1).



**Abb. 1: Einige Toll-ähnliche Rezeptoren und ihre Liganden**

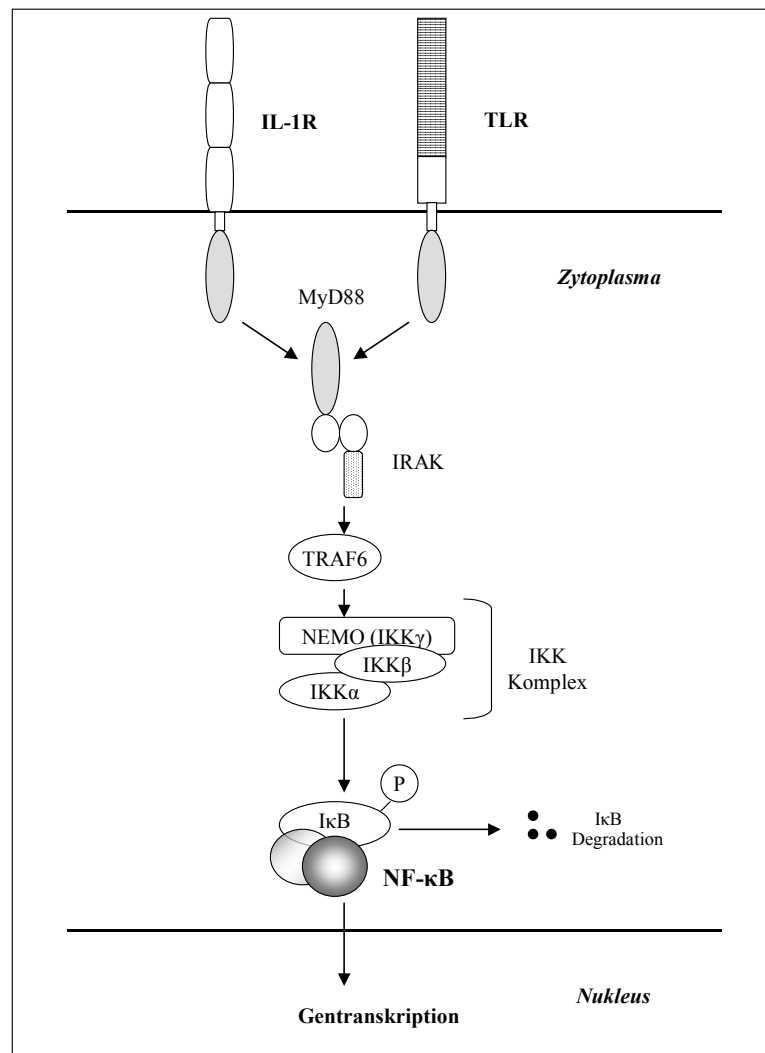
TLR2 erkennt ein breites Ligandenspektrum, vor allem aber Zellwandbestandteile von Gram-positiven Bakterien und Hefe (Zymosan). TLR3 ist aufgrund der Erkennung doppelsträngiger RNA (dsRNA) vermutlich in die Immunantwort bei manchen viralen Infektionen involviert. TLR4 ist essentiell für die Erkennung von Gram-negativen Liganden, wie beispielsweise LPS und wird außerdem durch das Hitzeschockprotein Hsp60, das unter Stressbedingungen von den Wirtszellen selbst produziert wird, aktiviert. TLR4 assoziiert zur Signalweiterleitung mit dem Protein MD2. TLR5 wird spezifisch in Gegenwart von Flagellin, einem in der Geißel von Bakterien vorkommenden Protein, aktiviert. TLR9 erkennt keine bakteriellen Zellwandbestandteile, sondern wird von unmethylierter CpG-DNA aktiviert. Unmethylierte CpG Motive treten in großer Häufigkeit im Bakteriengenom, aber nur selten in Säugetiergenomen auf. Die dargestellte Auflistung zeigt nur die wichtigsten Liganden und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Das Repertoire an TLR Liganden nimmt stetig zu (Einige Beispiele für die Identifizierung neuer Liganden sind in folgenden Literaturstellen aufgeführt: Hemmi et al., 2000; Hayashi et al., 2001; Hemmi et al., 2002). Zusätzlich sind die molekularen und strukturellen Grundlagen der Interaktion der Rezeptoren mit den bereits identifizierten Liganden in den meisten Fällen noch vollkommen ungeklärt. Der Toll-ähnliche Rezeptor 2 (TLR2) wurde in den letzten Jahren bereits intensiver studiert. Dieser Rezeptor kann durch ein außerordentlich breites Spektrum an infektiösen Pathogenen und deren biochemischen Produkten aktiviert werden (Aderem & Ulevitch, 2000; Akira et al., 2001). Neben Zellwandbestandteilen von Hefen und Gram-positiven Bakterien, wie beispielsweise Peptidoglykane (PGN) (Schwandner et al., 1999) und Lipoproteine (Brighthill et al., 1999), erkennt TLR2 auch bestimmte strukturelle Lipopolysaccharid-Varianten (Werts et al., 2001) und den Lipid-Anker des Parasiten *Trypanosoma cruzi* (Campos et al., 2001). Das breite Ligandenspektrum unterstreicht die Bedeutung von TLR2 für die Induktion der primären Immunantwort im Säugetierorganismus.

Eine wesentliche Grundlage für eine durch Toll-ähnliche Rezeptoren vermittelte Immunantwort stellt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (engl.: nuclear factor- $\kappa$ B) und die hieraus resultierende Produktion von proinflammatorischen Zytokinen dar (Medzhitov & Janeway, 2000; Aderem & Ulevitch, 2000). Im inaktivierten Zustand ist NF- $\kappa$ B durch Assoziation an die inhibitorischen I $\kappa$ B Proteine, die die Kernlokalisationssequenz maskieren, im Zytoplasma lokalisiert. Bei Stimulierung der Zellen werden die I $\kappa$ Bs phosphoryliert, ubiquitiniert und degradiert, was in einer nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors und der anschließenden Transkription von NF- $\kappa$ B Zielgenen resultiert (Baeuerle, 1998). „NF- $\kappa$ B“ ist im Prinzip ein kollektiver Begriff für strukturell verwandte, homo- oder heterodimere Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der Rel Proteine gehören (Baldwin, 1996). Jedes Mitglied dieser Familie weist ein nukleäres Lokalisationssignal und eine konservierte Amino-terminale Region, die sogenannte Rel-Homologie Domäne (RHD) auf, die die DNA-Bindedomäne und die Dimerisierungsdomäne umfasst. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden in Säugetieren fünf

Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie identifiziert: RelA (auch als p65 bezeichnet), c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) und NF- $\kappa$ B2 (p52/p100) (Mercurio & Manning, 1999). Während RelA, c-Rel und RelB nach der Translation bereits in transkriptionsaktiver Form vorliegen, werden NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2 als lange Vorläuferproteine synthetisiert (p105 und p100), die in Folge posttranslationaler Modifikation zu kürzeren transkriptionsaktiven Proteinen (p50 und p52) umgewandelt werden. Im Nachfolgenden wird mit der Bezeichnung „NF- $\kappa$ B“ das klassische NF- $\kappa$ B Dimer bestehend aus RelA und NF- $\kappa$ B1 (p65/p50) gemeint sein.

Toll-ähnliche Rezeptoren sind Typ-1 Transmembranproteine bestehend aus einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne, die eine große Sequenzhomologie zum Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) aufweist (Medzhitov & Janeway, 2000). Aufgrund dieser sogenannten TIR (engl.: Toll/IL-1R homology) Domäne wurde bisher angenommen, daß TLRs und der IL-1R nach Stimulation ähnliche intrazelluläre Signalwege zur Einleitung der Immunantwort durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B induzieren (Abb. 2). Die von TIR Domänen vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird durch die Rekrutierung des zytoplasmatischen Adaptormoleküls MyD88 (engl.: myeloid differentiation factor 88) gewährleistet. MyD88 schafft so eine Verbindung der Rezeptoren mit einer Signalkaskade bestehend aus der Serin/Threonin Kinase IRAK (engl.: IL-1R-associated kinase), dem Adaptormolekül TRAF6 (engl.: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) und den I $\kappa$ B Kinasen (IKKs), die ultimativ in der Phosphorylierung und Degradierung von I $\kappa$ B resultiert (Medzhitov & Janeway, 2000, Karin & Lin, 2002). Neueste Studien zeigen jedoch, daß neben der I $\kappa$ B Degradierung zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Gentranskription zusätzliche biochemische Ereignisse, wie beispielsweise die Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65/RelA im Transkriptionskomplex, benötigt werden. Die Induktion dieser Ereignisse erfolgt vermutlich durch andere Signalwege, die entweder direkt vom aktivierten Rezeptor



**Abb. 2: Der IL-1R/TLR Signalweg zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B**

Die aktivierten Rezeptoren assoziieren mit dem Adaptormolekül MyD88 durch homophile Interaktion ihrer TIR Domänen. Neben der TIR Domäne besitzt MyD88 auch eine sogenannte „Death Domain“, die die Assoziation mit der Serin/Threonin Kinase IRAK erlaubt. Folglich wird TRAF6, ein weiteres Adaptormolekül rekrutiert, das den IKK Komplex aktiviert. Dieser induziert die Phosphorylierung von I $\kappa$ B, das daraufhin degradiert werden kann. Die I $\kappa$ B Degradation führt zur Freisetzung und zur nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription resultiert in der Produktion proinflammatorischer Zytokine.

oder auf einer anderen Ebene des konischen IKK-Signalweges abzweigen und unabhängig von der I $\kappa$ B Degradierung stattfinden (Sizemore et al., 1999). Hieraus ist zu schließen, daß nicht nur ein zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B erforderlicher Signaltransduktionsweg existiert (wie unter Abb. 2), sondern daß die Kooperation mehrerer unterschiedlicher Kaskaden ein womöglich viel komplexeres Bild für eine effiziente NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription ergibt.

Außerdem gibt es in zunehmendem Maße Anhaltspunkte dafür, daß TLR2 neben der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die im allgemeinen anti-apoptotisch wirkt, auch pro-apoptotische Signale induzieren kann. Bei Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, handelt es sich im Gegensatz zur Nekrose um einen kontrolliert ablaufenden Prozeß, der in verschiedene Stadien unterteilt werden kann (Cohen, 1993). Zellschrumpfungen und Veränderungen der Plasmamembran, wie z.B. Störungen der Phospholipidasymmetrie oder die Formation von Membranausstülpungen (Membran-Blebbing), sind charakteristisch für das apoptotische Frühstadium. Die für apoptotische Zellen typische DNA-Fragmentierung setzt dagegen zu einem späteren Zeitpunkt ein. Apoptose in TLR2-exprimierenden Zellen konnte nach Stimulierung von TLR2 mit bakteriellen Lipoproteinen beobachtet werden (Aliprantis et al., 1999; Aliprantis et al., 2000). Andere Beispiele, bei denen pro- und anti-apoptotische Signalantworten nach Stimulation von demselben Protein ausgehen, sind der TNF $\alpha$ -Rezeptor (TNFR) in Säugetieren und das Imd Protein (engl.: Immune deficiency), das für die antibakterielle Wirtsverteidigung in *Drosophila* verantwortlich ist. Bestimmte Parallelen in diesen Kaskaden lassen auf eine evolutionär konservierte, duale Signalfunktion in der Immunantwort schließen. Der zugrundeliegende Mechanismus, der die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalen reguliert, ist bisher in allen drei erwähnten Signalwegen allerdings vollkommen unklar. Im Fall von TLR2 wird die Möglichkeit zur Induktion apoptotischer Signale zumindest auf struktureller Ebene durch das Vorhandensein eines sogenannten "Death Domain" Moduls in dem Adaptormolekül MyD88 und der Serin/Threonin Kinase IRAK geschaffen. Dieses spezifische Modul ist in

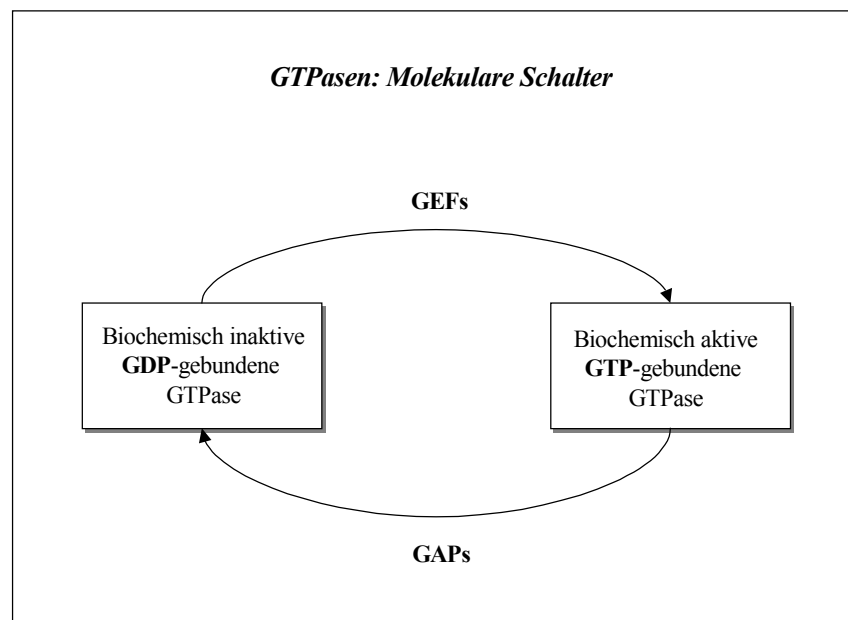
der Lage, den Rezeptor nach Stimulation mit der Aktivierung von Caspasen in Verbindung zu bringen.

### ***1.1.2 Rho GTPasen: Multiple zelluläre Regulatoren***

Die Rho GTPasen bilden eine Untergruppe der Ras Superfamilie von kleinen GTPasen (Lacal & McCormick, 1993). Bisher sind 14 verschiedene Rho GTPasen beschrieben worden (Rac1-3; Cdc42; TC10; RhoA-E, G, H und Rnd1,2), wobei die Familienmitglieder Rac1, Cdc42 und RhoA am besten charakterisiert sind. Diese GTPasen regulieren ein breites Spektrum zellulärer Funktionen, wie beispielsweise die Reorganisation des Zytoskeletts, Gentranskription, Zell- und Tumorwachstum sowie Apoptose (Bishop & Hall, 2000). Beispielsweise sind Rho GTPasen in die von den Rezeptoren IL-1R und TNFR induzierte Gentranskription und Polymerisation von Aktinfilamenten involviert (Puls et al., 1999, Wojciak-Stothard et al., 1998, Singh et al., 1999, Dreikhausen et al., 2001). Der Einfluß von Rac, Rho und Cdc42 auf stimulusabhängige Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, der die Grundlage vieler dynamischer Prozesse wie z.B. Chemotaxis und Phagozytose bildet, stellt eine Hauptfunktion der Rho GTPasen dar. Insgesamt ermöglicht die spezifische Interaktion aktivierter GTPasen mit unterschiedlichen zellulären Downstreamtargets die Ausbildung eines kooperativen Signalnetzwerkes, das die Kontrolle komplexer biologischer Prozesse auf unterschiedlichen Ebenen erlaubt.

Trotz ihrer vielfältigen zellulären Funktionen ist die Enzymologie von Rho GTPasen relativ einfach: Sie binden und hydrolysieren Guanin-Nukleotide. Der Austausch von hydrolysiertem GDP durch GTP resultiert in einer Konformationsänderung der GTPasen, die die Bindung an spezifische Zielproteine, die sogenannten Effektoren erlaubt. Dieser Mechanismus ermöglicht den Rho GTPasen, zwischen einer biochemisch aktiven, GTP-gebundenen und einer inaktiven, GDP-gebundenen

Konformation zu zyklisieren (Lacal & McCormick, 1993; Symons & Settleman, 2000). Der Austausch von GDP zu GTP wird von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (engl.: guanine nucleotide exchange factors, GEFs) katalysiert, indem diese die Freisetzung von GDP erleichtern und die nukleotid-freie Form der GTPase transient stabilisieren. Auf der anderen Seite fördern sogenannte GTPase-aktivierende Proteine (engl.: GTPase-activating proteins, GAPs) die GTP-Hydrolyseaktivität von Rho Proteinen und führen somit zu einer raschen Umwandlung in die inaktive, GDP-gebundene Form (Abb. 3). Aufgrund dieses empfindlich regulierten Mechanismus sind Rho GTPasen im Sinne „molekularer Schalter“ in der Lage, in Gegenwart extrazellulärer Stimuli spezifische Signalantworten gezielt einzuleiten.



**Abb. 3: Das Prinzip der Regulation von Rho GTPasen.**

(GEFs = guanine nucleotide exchange factors, GAPs = GTPase-activating proteins)

## **1.2 Zielsetzung**

Trotz der großen Bedeutung der evolutionär hochkonservierten Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) für die primäre Immunantwort sind die durch bakterielle Stimulation spezifisch initiierten und zur Immunreaktion führenden Signalwege immer noch weitgehend unklar. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Rolle von Rho GTPasen, die generell als Regulatoren verschiedener zellulärer Prozesse fungieren, in der vom Toll-ähnlichen Rezeptor 2 (TLR2) induzierten Signalantwort untersucht werden.

Im Einzelnen hatte die Arbeit folgende Ziele:

### Charakterisierung der von TLR2-induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung durch Rac1

- Identifizierung des Austauschfaktors (GEF), der die transiente Rac1 Aktivierung nach bakterieller Stimulation von TLR2 induziert
- Analyse des Einflusses der von Rac1 kontrollierten Signalkaskade auf die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und das DNA-Bindevermögen von NF- $\kappa$ B
- Etablierung eines experimentellen Systems, das eine Untersuchung der Transaktivierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 erlaubt

### Charakterisierung der Funktion von RhoA in der von TLR2-induzierten Signalantwort

- Nachweis einer transienten Aktivierung von RhoA, die spezifisch nach bakterieller Stimulation von TLR2 eingeleitet wird
- Analyse des Einflusses von RhoA auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B
- Detaillierte Charakterisierung der Regulation der NF- $\kappa$ B Aktivierung durch RhoA (Untersuchung des Einflusses der GTPase auf die I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung und die Transaktivierung von p65)
- Identifizierung eines potentiellen Downstreamtargets von RhoA im NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalweg



- 
- Untersuchung einer möglichen biochemischen Verknüpfung zwischen dem von Rac1 kontrollierten Signalweg mit der Rho-Kaskade hinsichtlich der von TLR2 induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung
  - Visualisierung und Charakterisierung der im Zuge bakterieller Stimulation von TLR2 auftretenden morphologischen Membranveränderungen
  - Analyse des Einflusses von RhoA auf die morphologischen Veränderungen
  - Identifizierung einer für die morphologischen Veränderungen verantwortlichen Signalkaskade

## ***2. Verwendete Materialien***

### Materialien für die Zellkultur

- Dulbecco`s modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) mit niedrigem Glukosegehalt (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- FuGENE (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
- G418 (Geneticin) (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- HEPES-Puffer (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FBS) (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- L-Glutamin (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- LipofectAMINE/PLUS-Reagenz (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- Penicillin (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- Puromycin (Sigma, St. Louis, USA)
- RPMI (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- Streptomycin (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- Trypsin/EDTA (0,05% Lösung) (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)

### Zelllinien und Kultivierung

- Als Modellzelllinie dienten humane embryonale Nierenzellen (293 Zellen), die stabil mit TLR2 transfiziert waren (Yang et al., 1998). Die **293-TLR2** Zellen wurden in DMEM mit niedrigem Glukosegehalt kultiviert, das mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µM) supplementiert war. Zusätzlich wurde dem Medium bei jeder Subkultivierung Puromycin (1 µg/ml) frisch beigefügt, um eine Selektion der TLR2-exprimierenden Zellen zu gewährleisten.

- Bei **THP1-CD14** Zellen handelt es sich um menschliche Monozyten, die stabil mit CD14 transfiziert wurden (Schiff et al., 1997) und als Suspensionszellen in Kultur gehalten werden können. TLR2 wird in THP-1 Zellen natürlicherweise exprimiert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI verwendet, das mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µM) supplementiert war. Das Antibiotikum G418 (50 mg/ml) diente als Selektionsmarker für CD14.

#### Mikrobiologisches Material zur biochemischen Stimulation der Toll-Rezeptoren

- HKSA (hitzeinaktivierte Kultur von *Staphylococcus aureus*) (bereitgestellt von Dr. C. Fearn, TSRI, La Jolla, USA)
- MALP-2 (2 kDa großes Makrophagen-aktivierendes Protein, das aus der Zellwand von *Mycoplasma fermentans* isoliert wurde) (bereitgestellt von Dr. P. Mühlradt, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, Deutschland)

#### Verwendete biochemische Inhibitoren

- CAPE (Calbiochem, La Jolla, USA)
- LY294002 (Alexis Corporation, San Diego, USA)
- Myristoyliertes Pseudosubstrat von PKCzeta (Biosource International, Camarillo, USA)
- Piceatannol (Calbiochem, La Jolla, USA)
- Ro318220 (Calbiochem, La Jolla, USA)
- Rottlerin (Calbiochem, La Jolla, USA)
- Wortmannin (Alexis Corporation, San Diego, USA)
- Y27632 (Calbiochem, La Jolla, USA)

Materialien für Immunpräzipitation und Immunoblotting

- Protein G-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Protein A-Agarose (Sigma, St. Louis, USA)
- Glutathion-Agarose Beads (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting system (Pierce, Rockford, USA)

Antikörper

- Anti-GFP (polyklonal, aus Kaninchen) (Molecular Probes, Eugene, USA)
- Anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (polyklonal, aus Kaninchen) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-Kaninchen-IgG (Peroxidase-konjugiert, polyklonal, aus Ziege) (Southern Biotechnology, Birmingham, USA)
- Anti-Maus-IgG (Peroxidase-konjugiert, monoklonal, aus Ziege) (Southern Biotechnology, Birmingham, USA)
- Anti-Myc (monoklonal, aus Maus) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-Myc (polyklonal, aus Kaninchen) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-PKC Sampler Kit (Transduction Laboratories, San Diego, USA)
- Anti-PKCdelta (polyklonal, aus Kaninchen) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-PKCzeta (polyklonal, aus Kaninchen) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-Rac1 (monoklonal, aus Maus) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA)
- Anti-RhoA (monoklonal, aus Maus) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-RhoA (polyklonal, aus Kaninchen) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

- Anti-ROCK-1 (H-85) (polyklonal, aus Kaninchen) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-TLR2 (polyklonal, aus Kaninchen) (Genentech, San Francisco, USA)
- Anti-Vav1 (C-14) (polyklonal, aus Kaninchen) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- Anti-Vav1 (monoklonal, aus Maus) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA)

Molekularbiologische Materialien

- Endo-free plasmid DNA Maxi Kit (Qiagen, Valencia, USA)
- RNAzol™ B zur Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellkulturen (Tel-Test, INC., USA)
- Luziferase Reporter-Assay Kit (beinhaltet das Substrat der Luziferase und den spezifischen Reaktionspuffer) (Promega, Madison, USA)
- 5x Lysepuffer des Luziferase Reporter-Assays (Promega, Madison, USA)
- Titan One Tube RT-PCR System (umfaßt spezifische Puffer, Salze und die reverse Transkriptase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
- dNTPs (Gibco BRL Lifetechnologies, Gaithersburg, USA)
- Primer (Genset Oligos, La Jolla, USA)

Expressionsvektoren

- Akt dn (Akt A308 A473) (bereitgestellt von Dr. G. Bokoch, TSRI, La Jolla, USA)
- Gal4 anhängiger Luziferase Reporter (pFR-Luc) (Stratagene, La Jolla, USA)
- Gal4-p65 (p65 aa 346-551)
- NF-κB anhängiger Luziferase Reporter (5x NF-κB-Luc) (Promega, Madison, USA)
- p85α dn (p85 aa 478-513) (bereitgestellt von Dr. G. Bokoch)
- pcDNA3 Rac1wt-EGFP
- pcDNA3 RBD-EGFP (Rhotekin aa 7-89; Reid et al., 1996)

- pcDNA3 RhoAN19-EGFP
- pcDNA3 RhoAwt -EGFP
- pCMV6 PBD F107 (Pak1 aa 67-150; Mira et al., 2000)
- PEF-bos ROCK-1 dn-Myc (ROCK-1 aa 941-1388, N1036T K1037T; Amano et al., 1999)
- pFA-CMV GAL4 (Stratagene, La Jolla, USA)
- pcDNA3 PKCdelta dn-HA (PKCdelta K376R; Soh et al., 1999)
- pcDNA3 PKCdelta wt-HA (Soh et al., 1999)
- pMT-2 PKCzeta dn (bereitgestellt von Dr. A. Hall, MRC, London, UK)
- pMT-2 PKCzeta wt (Puls et al., 1997) (bereitgestellt von Dr. A. Hall, MRC, London, UK)
- pRK5M Rac1N17-Myc
- pRK5M Rac1V12-Myc
- pRK5M Rac1wt-Myc
- pRK5M RhoAL63-Myc
- pRK5M RhoAN19-Myc
- pRK5M RhoAwt-Myc
- $\beta$ -Galaktosidase Plasmid (Promega, Madison, USA)

#### Materialien für die Untersuchungen zur Apoptose

- Annexin V-Biotin (Biosource International, Camarillo, USA)
- Annexin V-FITC (Biosource International, Camarillo, USA)
- Phalloidin Alexa 568 (Molecular Probes, Eugene, USA)
- Propidiumiodid (Sigma, St. Louis, USA)
- Streptavidin-TriColor (Caltag, Burlingame, USA)

### **3. Methoden**

#### **3.1 RT-PCR zur Ermittlung der Expression bestimmter Gene in verschiedenen Zelllinien**

RT-PCR ist die empfindlichste Technik, um die Gegenwart bzw. Abwesenheit von RNA-Molekülen in Geweben und Zellkulturen zu bestimmen. Üblicherweise werden zwei verschiedene Techniken für die RT-PCR eingesetzt: Zwei-Schritt RT-PCR oder Ein-Schritt RT-PCR. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ein-Schritt RT-PCR wurden die Reverse Transkription (RT) (cDNA Synthese) und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Gegenwart eines optimierten Puffers und der entsprechenden Enzyme (Reverse Transkriptase und Taq DNA Polymerase) zwar nacheinander aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien durchgeführt. Im Folgenden sind die verschiedenen Protokolle der durchgeführten RT-PCRs aufgezeigt. Bei jeder RT-PCR wurde 1 µg der aus den zu untersuchenden Zellen isolierten RNA eingesetzt. Alle Protokolle beginnen mit einer 30-minütigen Phase von 50°C, in der die jeweilige RNA zur cDNA umgeschrieben wird (RT-Phase). Anschließend wird die cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert.

#### PCR-Protokolle für Vav1, Vav2 und Vav3:

Vav1: 94°C 60 s	Vav2: 94°C 60 s	Vav3: 94°C 60 s
58°C 60 s	52°C 60 s	56°C 60 s
<u>68°C 60 s</u>	<u>68°C 60 s</u>	<u>68°C 60 s</u>
35 Zyklen	35 Zyklen	35 Zyklen

Primer für Vav1: Sense, 5`-GAAGGACAAACTACATCGCAGG

Antisense, 5`-CTTTGTGCTTCCCCTGCTG

Fragmentgröße: 605 bp

Primer für Vav2: Sense, 5`-GAAGTCTCACGGGAAAATGTGG

Antisense, 5`-GTATGCAGTGTAGTCGATCTCC

Fragmentgröße: 590 bp

Primer für Vav3: Sense, 5`-CTACCAGAGAAACGGACCAATG

Antisense, 5`-CAAGCTGTTGCCTGCTCTATTAC

Fragmentgröße: 590 bp

PCR-Protokoll für  $\beta$ -Aktin:

94°C 60 s

60°C 60 s

68°C 60 s

25 Zyklen

Primer für  $\beta$ -Aktin: Sense, 5`-TGACGGGGTCACCCACACTCTGCCCCAT

Antisense, 5`-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGAT

Fragmentgröße: 631 bp



### ***3.2 Transiente Transfektion und Durchführung der Luziferase-Assays***

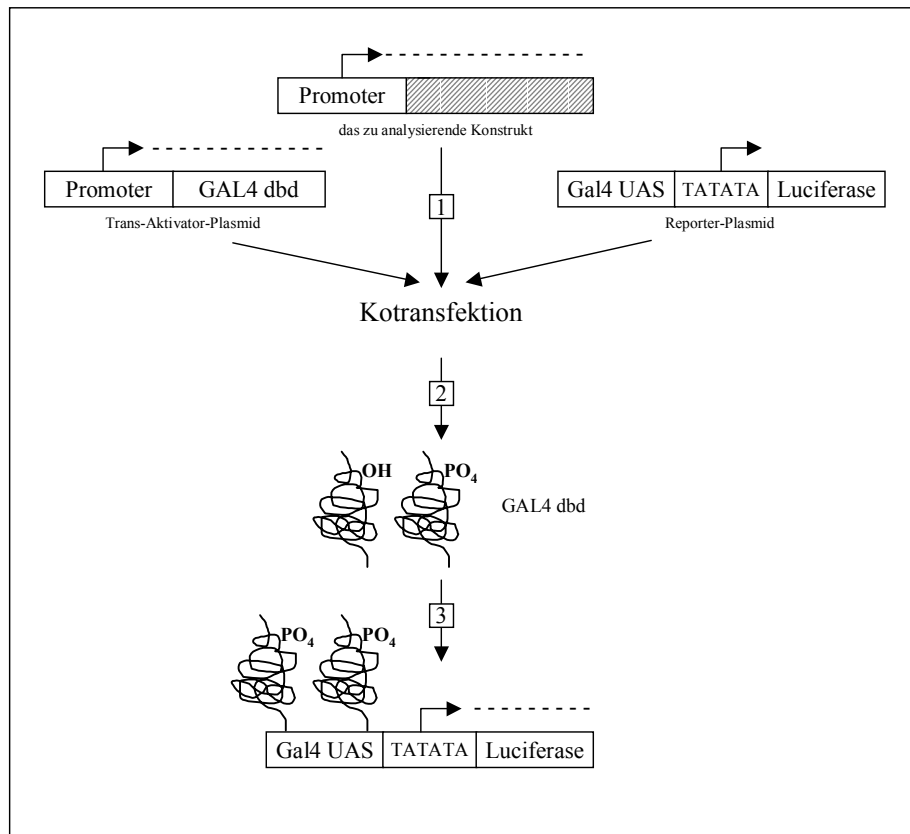
293 Zellen wurden mit LipofectAMINE, Plus-Reagenz und den jeweiligen Plasmiden transient transfiziert. In 6-Loch-Schalen wurde auch bei mehreren Plasmiden pro Ansatz (Kotransfektionen) eine DNA Gesamtmenge von 2 µg nie überschritten. Als Kontrolle dienten jeweils Transfektionen der Expressionsvektoren ohne inklonierte Konstrukte. Die genaue Expressionszeit wurde abhängig vom nachfolgenden Assay gewählt und betrug in der Regel 20-28 h. Um quieszente Zellen zu erhalten, wurden die Kulturen vor der Stimulation mit Bakterien für mindestens 3 h in Medium inkubiert, das mit 1% FBS supplementiert war.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Luziferase-Reportergen stammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus Pyralis*. Die Luziferase katalysiert die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff,  $Mg^{2+}$  und ATP. Die Reaktion wird von einer Lichtemission der Wellenlänge 562 nm begleitet, die eine quantitative Untersuchung der Genexpression erlaubt. Zur Durchführung der Reporterassays wurden 293 Zellen mit 100 ng des NF-κB abhängigen Luziferase-Reporters (5x NF-κB-Luc) zusammen mit der DNA des zu analysierenden Konstruktes oder mit dem entsprechenden leeren Expressionsvektor transfiziert. Um Schwankungen der Transfektionseffizienz bei der Bestimmung der Luziferase-Aktivität zu vermeiden, erfolgte zusätzlich eine Kotransfektion mit einem zweiten Reportergen, der β-Galaktosidase. Die Transfektionseffizienz in 293 Zellen betrug unabhängig vom Plasmid konstant zwischen 65-80%. Nach einer dreistündigen Inkubation in Gegenwart von 1% FBS wurden die Zellen 4-5 h mit *S. Aureus* (HKSA) stimuliert. Anschließend erfolgte die Lyse mit einem für diesen Assay spezifischen Lysepuffer. Die Zellysate wurden 1:40 mit Aqua bidest. verdünnt. Zur Analyse am Luminometer wurden 3 µl der Verdünnung mit jeweils 100 µl des Luziferase-Substrates zusammenpipettiert.

Auch in THP-1 Zellen, die generell als sehr schwer transfizierbar gelten, gelang es uns, Luziferase-Assays durchzuführen. Hierbei wurden die Suspensionszellen mit 50 ng

des NF- $\kappa$ B abhängigen Luziferase-Reporters und mit 100-150 ng der DNA des zu analysierenden Konstruktes in Gegenwart von FuGENE transient transfiziert. Die Transfektionseffizienz konnte anhand von X-Gal Färbungen auf 20-30% geschätzt werden. Im Gegensatz zu 293 Zellen war eine Stimulationsdauer von 2 h ausreichend. Zur Analyse am Luminometer wurden 4  $\mu$ l der unverdünnten Lysate mit jeweils 100  $\mu$ l des Luziferase-Substrates zusammenpipettiert.

Eine komplexere Form des Luziferase-Assays stellt das sogenannte Trans-Reporting System dar. Hierbei erlaubt die Expression eines chimären Trans-Aktivator-Proteins das Analysieren eines Signaltransduktionsweges (Abb. 4). Um die stimulationsabhängige Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 zu untersuchen, wurde ein p65-Fragment (aa 354-551) in den pFA-CMV Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält die DNA-Bindedomäne des aus Hefe bekannten Transkriptionsfaktors Gal4, welche die Klonierung des Fusionsgens Gal4-p65 ermöglichte. Das zugehörige Reporterplasmid, pFR-Luc, beinhaltet 5 Kopien der Gal4 spezifischen Bindesequenz „upstream“ des Luziferase Promoters. Nur das phosphorylierte Fusionsprotein Gal4-p65 bindet an die Konsensussequenz und ermöglicht somit die Expression der Luziferase (Abb. 4). Mit Hilfe dieser Methode läßt sich der Einfluß verschiedener Konstrukte auf den zur stimulusabhängigen Phosphorylierung von p65 führenden Signaltransduktionsweg gut untersuchen. Kommt es beispielsweise bei Kotransfektion eines bestimmten Konstruktes zu verminderter Phosphorylierung, so wird die Luziferaseexpression ebenfalls herabgesetzt, was sich am Luminometer quantitativ nachweisen läßt. Zur Durchführung dieses spezifischen Reporterassays wurden 293-TLR2 Zellen mit 80 ng pFR-Luc, 160 ng pGal4-p65 und der DNA des zu analysierenden Konstruktes kotransfiziert.



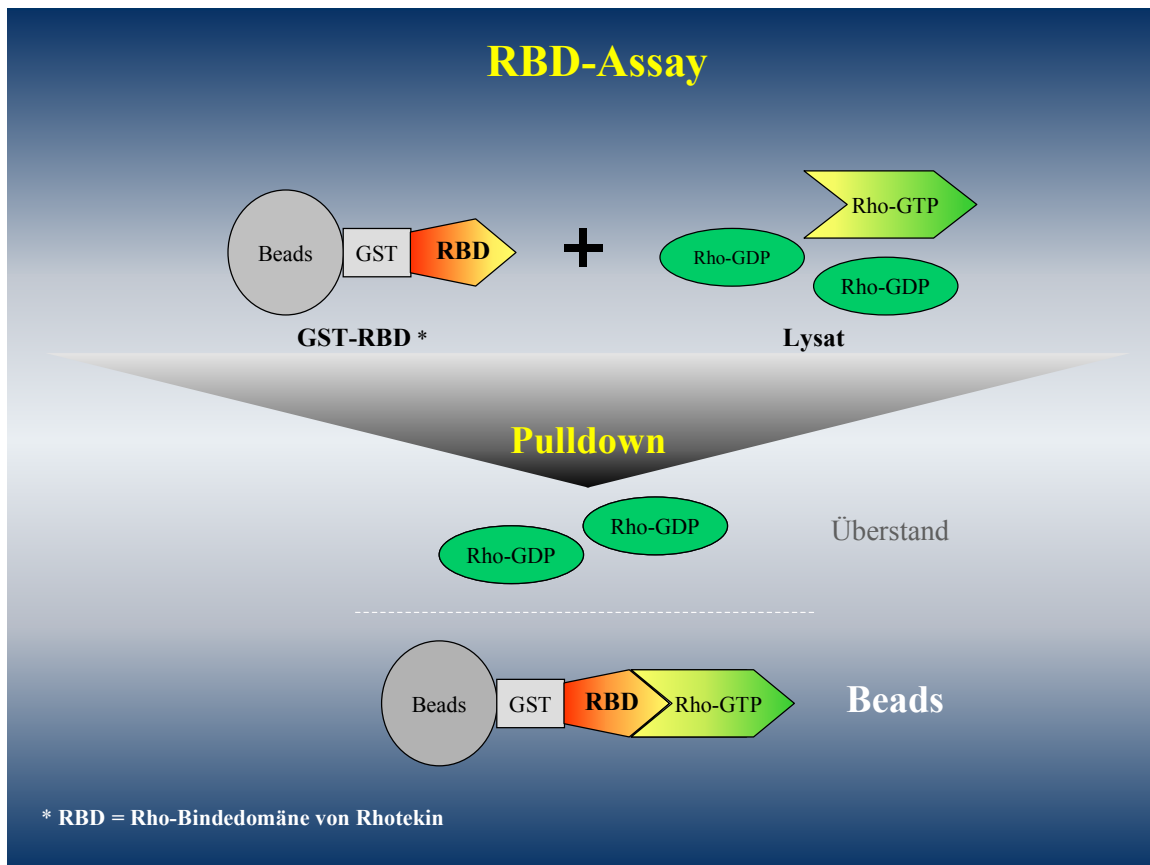
#### Abb.4: Prinzip des Trans-Reporting Systems

1. Das Trans-Aktivator-Plasmid pGal4-p65 wird mit dem Reporterplasmid pFR-Luc und der DNA des zu analysierenden Konstruktes kotransfiziert. 2. Das Trans-Aktivator-Plasmid exprimiert das chimäre Fusionsprotein Gal4-p65. 3. Nur das phosphorylierte Fusionsprotein bindet an die Gal4 spezifische Konsensussequenz und aktiviert die Expression der Luziferase. (dbd = DNA binding domain; UAS = upstream activation sequence)

### ***3.3 RBD- und PBD-Assay***

Assays, welche die Detektion von aktivierten, d.h. GTP-gebundenen Rho-GTPasen in Zellysaten ermöglichen, beruhen auf der Tatsache, daß nur die aktivierte Form der GTPase mit spezifischen „downstream“ Effektoren interagiert. So wird beim RBD-Assay zelluläres, GTP-gebundenes Rho spezifisch an die Rho-Bindedomäne (RBD) des Effektorproteins Rhotekin gebunden (Ren et al., 1999; Kimura et al., 2000). Die Fusion der RBD an Glutathion S-Transferase (GST-RBD) und die zusätzliche Kopplung an Glutathion-Beads ermöglicht die Affinitätspräzipitation der aktiven GTPase aus Zellysaten, während die GDP-gebundene Form im Überstand verbleibt (Abb. 5).

Zur Durchführung dieses Assays wurden 293 Zellen mit 100 ng Rhowt transfiziert. In THP-1 Zellen konnte der RBD-Assay mit endogen exprimiertem Rho durchgeführt werden. Vor der bakteriellen Stimulation wurden beide Zelllinien einem Serumentzug von mindestens 3 h unterworfen. Die Aktivierung der Zellen wurde mit eiskaltem Phosphatpuffer zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Anschließend erfolgte die Lyse im Puffer folgender Zusammensetzung: Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), NaCl (500 mM), EDTA (1 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 10% Glycerol, NaF (5 mM), DTT (1 mM), 1% Nonidet P-40 und den Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Leupeptin (1 µg/ml) und Aprotinin (1 µg/ml). 400 µg der 293 Zellysate und 1.2 mg der THP-1 Lysate wurden jeweils mit 20 µg des rekombinanten GST-RBD Fusionsproteins 1 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluß wurden die Beads abzentrifugiert und viermal mit Lysepuffer gewaschen. Die Auftrennung der an die Beads gebundenen Proteine erfolgte mit SDS-PAGE. Das Blotten der Proteinbanden auf Nitrozellulosemembran erlaubte die Detektion mit spezifischen Antikörpern (Anti-RhoA bzw. Anti-Myc).



#### Abb.5: Prinzip des RBD-Assays

Nur die aktive, GTP-gebundene Form der GTPase Rho, nicht aber die GDP-gebundene, biochemisch inaktive Form, kann an die Rho-Bindedomäne des Effektorproteins Rhotekin (RBD) binden. Die Kopplung des Fusionsproteins GST-RBD an Beads erlaubt die Affinitätspräzipitation der aktiven GTPase. Die Beads und die assoziierte GTP-gebundene Form werden nach einer einstündigen Inkubationszeit abzentrifugiert, während die GDP-gebundene Form im Zellüberstand zurückbleibt. (GST = Glutathion *S*-Transferase)

Mit Hilfe des PBD-Assays, der dem gleichen Prinzip folgt, ist es möglich, die aktive Form der GTPasen Rac und Cdc42 in Zellysaten zu detektieren. Hierzu werden die Lysate nach bakterieller Stimulation mit der p21-Bindedomäne (PBD) der Kinase Pak1 (p21-activated kinase), einer der wohl bekanntesten Effektoren der RhoGTPasen, inkubiert. Die p21-

Bindedomäne ist als GST-Fusionsprotein ebenfalls an Glutathion-Beads gebunden, was eine Affinitätspräzipitation von aktiviertem Rac bzw. Cdc42 erlaubt. Die experimentelle Durchführung und die spezifischen Pufferbedingungen dieses Assays sind ausführlich beschrieben worden (Bernard et al., 1999; Mira et al., 2000).

### **3.4 Immunopräzipitationen**

Zur Immunopräzipitation von RhoA wurden 293-TLR2 Zellen mit RhoAwt 24 h vor der bakteriellen Stimulation transfiziert. Die Zellyse erfolgte mit dem in Kapitel 3.3 beschriebenen Puffer. 400 µg der Lysate wurden jeweils 1 h bei 4°C mit dem primären Antikörper (Anti-Myc) inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine weitere einstündige Inkubation mit 30 µl Protein G Sepharose Beads. Die Auftrennung der an Rho assoziierten Proteine wurde mit Hilfe der SDS-PAGE durchgeführt. Das Blotting der Proteinbanden auf Nitrozellulosemembran erlaubte die Detektion mit spezifischen Antikörpern.

Der Austauschfaktor Vav1 konnte aus THP-1 Zellen immunopräzipitiert werden. Hierzu wurden die Zellen nach Stimulation mit *S. aureus* mit RIPA-Puffer lysiert. RIPA-Puffer setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: Tris-HCL (25 mM, pH 7.4), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 0.02% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.2% Deoxycholat und den Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Leupeptin ( 1 µg/ml) und Aprotinin (1 µg/ml). Zur Immunopräzipitation wurde 1 mg Lysat mit Anti-Vav1 1 h bei 4°C inkubiert, gefolgt von einer weiteren einstündigen Inkubation mit 20 µl Protein A Agarose Beads. Die assoziierten Proteine wurden schließlich mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

### ***3.5 Live-Cell Imaging***

Für das Live-Cell Imaging wurden 293-TLR2 Zellen in 35-mm Kulturschalen gesät und mit unterschiedlichen EGFP-gekoppelten Konstrukten bzw. mit EGFP-kodierendem, leeren Vektor transfiziert. Vor der Stimulation wurden die Zellen einem dreistündigen Serumentzug unterworfen. Die Stimulation erfolgte in farbstofflosem Kulturmedium, das mit 1% FBS supplementiert war. Hierzu wurden pro Kulturschale  $10^7$  CFU/ml (CFU = colony-forming units) der hitzeinaktivierten Bakteriensuspension von *S. aureus* (HKSA) 1:100 in serumfreiem Medium verdünnt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. In einigen Ansätzen stellte das lösliche bakterielle Lipoprotein Malp-2 einen alternativen Stimulus dar. Mit dem 20x Objektiv eines Olympus Epifluoreszenzmikroskopes konnten die morphologischen Veränderungen der Zellen im Laufe der Stimulation visuell klar dargestellt werden. Ab dem Zeitpunkt der Bakterienzugabe ( $t = 0$ ) wurde pro Versuchsansatz für einen Zeitraum von mindestens 20 min alle 60 s ein Bild aufgenommen. Die einzelnen Bilder konnten mit Hilfe einer Princeton MicroMAX cooled CCD Kamera und der Innovision ISEE Software festgehalten und anschließend unter Gebrauch der Metamorph Software (Universal Imaging Inc.) digitalisiert werden.

### ***3.6 Immunofluoreszenzstudien***

Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden 293-TLR2 auf 1 mm dicken Deckgläsern (Corning, Big Flats, NY, USA) ausgesät und mit EGFP-gekoppeltem RhoAwf bzw. EGFP-kodierendem, leeren Expressionsvektor transfiziert. Die Stimulation erfolgte mit *S. aureus* in Gegenwart von 1% FBS für einen Zeitraum von 3 h. Im Anschluß an die Stimulation wurden die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, 20 min lang mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und in Gegenwart von 0.5% Triton X-

100/PBS 15 min permeabilisiert. Zur Visualisierung des Aktinzytoskeletts folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Phalloidin Alexa 568 (Emission im roten Wellenlängenbereich). Die Deckgläser wurden anschließend mit Hilfe eines Anti-Fade Mounting Mediums (Molecular Probes, Eugene, USA) auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung der Proben erfolgte mit dem 40x Objektiv eines Olympus Epifluoreszenzmikroskopes.

Bei den Fluoreszenzstudien in THP-1 Zellen konnte von der Tatsache Gebrauch gemacht werden, daß Monozyten bei mehrstündigem Serumentzug zur Adhärenz neigen. Die Stimulation der quieszenten Zellen erfolgte entweder mit Gram-positiven Bakterien oder dem Lipoprotein Malp-2 für einen Zeitraum von etwa 10 h in Gegenwart von 1% FBS. Im Anschluß wurden nicht-adhärenzte Zellen durch Waschen mit PBS entfernt, während die adhärenzte Zellpopulation sowohl Phalloidinfärbungen als auch Färbungen mit Annexin V-FITC unterworfen wurde. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte gemäß des für 293-TLR2 Zellen zuvor beschriebenen Protokolls.

### ***3.7 Durchgeführte Analysen am FACS***

Die Benutzung des FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) erlaubt die quantitative und statistische Beurteilung unterschiedlichster Zellparameter, wobei jeder einzelnen Zelle mehrere Parameter zugeordnet werden können. So ist es mit Hilfe des FACS möglich, anhand spezifischer Oberflächenmarker zwischen gesunden und apoptotischen Zellen innerhalb einer Population zu unterscheiden. Im frühen Stadium der Apoptose kommt es zu Veränderungen der Asymmetrie in der Plasmamembran, die eine Externalisierung charakteristischer Phospholipide (Phosphatidylserinreste) mit sich führt. Die hoch spezifische Bindung von Annexin V-Konjugaten an diese Phosphatidylserinreste ist deshalb nur bei apoptotischen (Annexin V positiv), nicht aber bei gesunden Zellen



(Annexin V negativ) möglich. Zur Detektion der stimulusabhängigen Apoptose wurden 293-TLR2 Zellen mit EGFP-gekoppelten Konstrukten bzw. EGFP-kodierendem, leeren Expressionsvektor transfiziert und für den Zeitraum von 1 h mit HKSA in 1% FBS-haltigem Medium stimuliert. Abschließend wurden die Zellen mit Annexin V-Bindepuffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen und nacheinander mit jeweils Annexin V-Biotin und Streptavidin-TriColor (Emission im roten Wellenlängenbereich) inkubiert. Zur Analyse am FACScan (Becton Dickinson) wurden pro Probe maximal 5000 EGFP-positive (transfizierte) Zellen gesammelt. Innerhalb dieser Zellpopulation wurde dann der Prozentsatz an Annexin V-positiven Zellen ermittelt.

FACS Analysen wurden auch in THP-1 Zellen durchgeführt. Nach einer Stimulationsdauer von ca. 10 h in Gegenwart von 3% FBS wurden die Zellen in Annexin V-Bindepuffer resuspendiert und 15 min lang mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid (PI) inkubiert. Mit Hilfe des FACScan wurde pro Probe der Prozentsatz der Annexin-positiven Zellen relativ zur Gesamtzellpopulation ermittelt. PI gab Aufschluß über die Integrität der Plasmamembran und erlaubte so eine Bestimmung des Anteils an nekrotischen Zellen innerhalb der Annexin V-positiven Zellpopulation.

## **4. Ergebnisse**

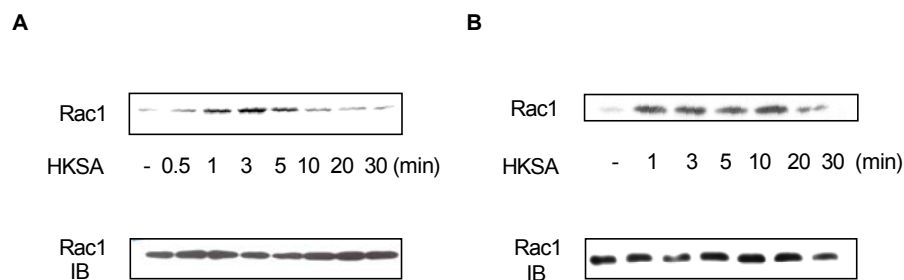
### **4.1 TLR2 aktiviert NF- $\kappa$ B mittels eines Rac1-abhängigen Signalweges**

Trotz der zentralen Bedeutung der Toll-ähnlichen Rezeptoren für die primäre Immunantwort sind die durch bakterielle Stimulation spezifisch induzierten und für die Immunreaktion verantwortlichen Signaltransduktionswege immer noch relativ ungeklärt. Da die RhoGTPase Rac1 als Regulator multipler zellulärer Funktionen in verschiedene Aspekte der Wirtverteidigung gegen Bakterien involviert ist, wurde ihre Funktion in der vom aktivierten TLR2 (Toll-like receptor 2) induzierten Signalkaskade näher untersucht.

#### **4.1.1 Stimulierung von TLR2 mit *S. aureus* aktiviert Rac1**

Biochemische Assays, welche die Detektion aktivierter GTPasen ermöglichen, beruhen auf der Tatsache, daß nur die GTP-gebundenen, nicht aber die GDP-gebundenen Formen mit spezifischen „Downstreameffektoren“ interagieren können. So kann beispielsweise die p21-Bindedomäne (PBD) des Effektorproteins Pak1 (p21-activated kinase 1) verwendet werden, um GTP-gebundenes, biochemisch aktives Rac1 aus Zellysaten zu präzipitieren (Bernard et al., 1999; Mira et al., 2000). Mit Hilfe dieses sogenannten PBD-Assays wurde untersucht, ob Rac1 nach Stimulation von TLR2 mit dem Gram-positiven Bakterium *S. aureus* in zwei unterschiedlichen TLR2-exprimierenden Zelllinien aktiviert wird (Abb. 6). Die endogene Expression von TLR2 konnte in der monozytischen Zelllinie THP-1 mittels Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und Western Blot Analysen nachgewiesen werden. Inkubation der THP-1 Zellen mit einer hitzeinaktivierten Suspension von *S. aureus* (HKSA) führte zu einer schnellen und transienten Aktivierung von endogenem Rac1, wobei das Aktivierungsmaximum zwischen 1 und 10 min lag (Abb. 6A). Ein vergleichbarer Zeitverlauf konnte in 293

Zellen, die mit TLR2 stabil transfiziert waren, in Gegenwart Gram-positiver Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 6B). Nach bakterieller Stimulation ursprünglicher 293 Zellen, die TLR2 generell nicht exprimieren, wurde im Gegensatz dazu keine Aktivierung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Rac1 ist demnach Bestandteil einer Signaltransduktionskaskade, die spezifisch vom Toll-ähnlichen Rezeptor 2 induziert wird.

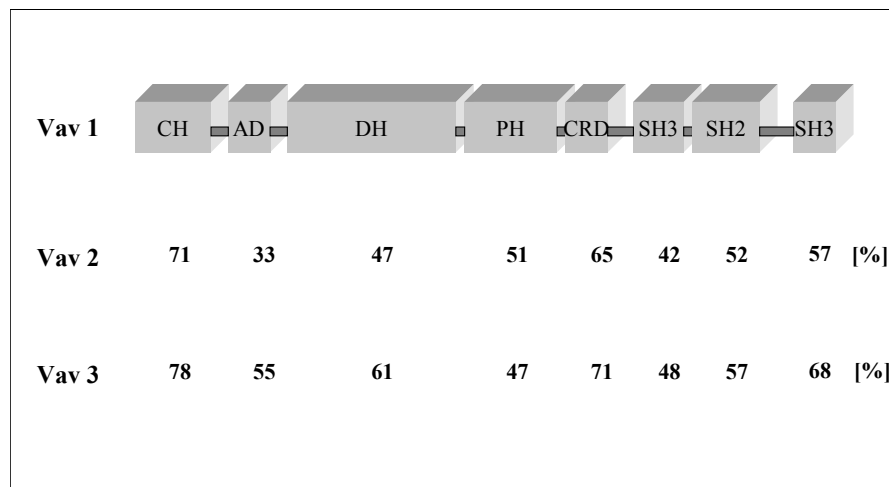


**Abb. 6: Transiente Aktivierung von Rac1 nach Stimulation mit HKSA**

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Rac1 Aktivierung in der monozytischen Zelllinie THP-1 (A) und in 293-TLR2 Zellen (B) (obere Reihe). Die Zellen wurden nach Serumentzug in 1% FBS-haltigem Medium mit HKSA ( $10^7$  CFU/ml) stimuliert. Die Aktivierung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit kaltem Phosphatpuffer gestoppt. Pro Zeitpunkt wurden 900  $\mu$ g der Lysate einer Affinitätspräzipitation mit GST-PBD unterworfen. Die an die GST-PBD Beads gebundenen Proteine konnten anschließend mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet werden. Die Detektion von Rac1 erfolgte mit einem spezifischen Antikörper. Untere Reihe: Immunoblots (IB) Zur Demonstration der Expression von Rac1 in den für die PBD-Assays jeweils herangezogenen Gesamtzellsaten. (Ein Resultat aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten ist gezeigt.)

#### 4.1.2 Stimulation von TLR2 induziert die Interaktion des Austauschfaktors Vav mit Rac

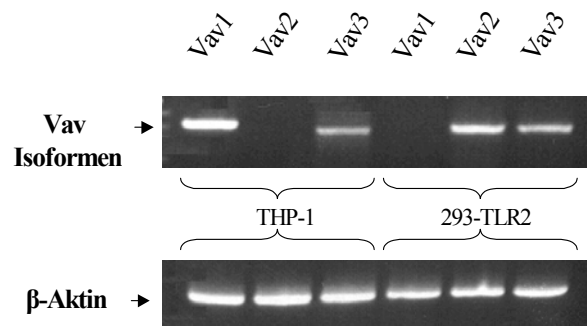
Rho GTPasen werden durch Interaktion mit einer Vielzahl von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren, aktiviert. Einer der wohl best charakterisiertesten Austauschfaktoren ist das Protoonkogen Vav. Mittlerweile wurden drei Isoformen dieses Proteins identifiziert, die eine Reihe von konservierten Strukturdomänen aufweisen (Abb. 7). Als funktionell besonders wichtige Domänen sind die DBL-Homologie (DH) Domäne und die Src-Homologie (SH3 und SH2) Domänen hervorzuheben. Die DH-Domäne ist für den GDP-GTP Austausch verantwortlich, während die SH-Domänen die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen umfassen und die Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen ermöglichen.



**Abb. 7: Domänenstruktur und relative Homologien der Vav-Isoformen**

Die Domänenstruktur des Austauschfaktors Vav1 ist schematisch dargestellt. Die relativen Homologien der Isoformen Vav2 und Vav3 zu Vav1 sind für die einzelnen Domänen jeweils in Prozent angegeben. Die für jede Isoform spezifischen Primer wurden anhand der Sequenzen im Bereich der SH-Domänen konstruiert. (CH = Calponin Homologie; AD = Azide Domäne; DH = Dbl Homologie; PH = Pleckstrin Homologie; CRD = Cysteinreiche Domäne; SH2/SH3 = Src Homologie)

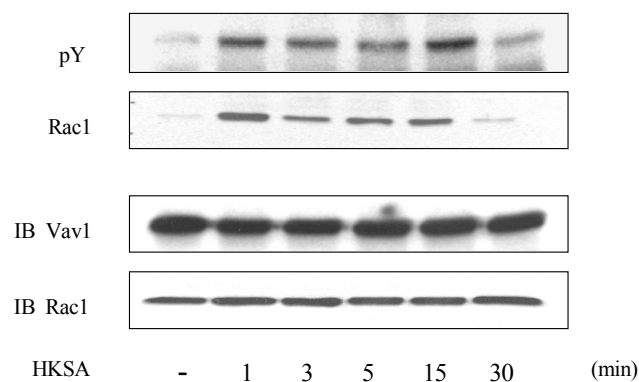
Vav1 wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, während die erst kürzlich identifizierten Austauschfaktoren Vav2 und Vav3 in einem breiten Spektrum unterschiedlicher Gewebe gefunden werden können. Um die in THP-1 und 293-TLR2 Zellen exprimierten Vav-Isoformen zu bestimmen, wurden spezifische Primer anhand der jeweiligen Sequenzen im Bereich der SH-Domänen konstruiert (Kapitel 3.1). Durch Einsatz dieser Primer in der RT-PCR wurden Vav1 und Vav3 in der monozytischen Zelllinie THP-1 und die Isoformen Vav2 und Vav3 in 293-TLR2 Zellen identifiziert (Abb. 8). Die Identifikation der einzelnen Vav-Isoformen in den verwendeten Zelllinien stellte eine hilfreiche Voraussetzung für weitere Untersuchungen zur möglichen biochemischen Funktion des Austauschfaktors in von TLR2 induzierten Signalwegen dar.



**Abb. 8: RT-PCR der Vav-Isoformen in THP-1 und 293-TLR2 Zellen**

Die gesamte RNA wurde aus den angegebenen Zellen isoliert. Mit Hilfe spezifischer Primer wurden die mRNAs der jeweiligen Vav-Isoformen in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Größe der PCR-Produkte: Vav1 – 605 bp; Vav2 und Vav3 – 590 bp. Als Kontrolle diente die RT-PCR des Housekeeping-Gens β-Aktin.

Die Aktivierung des GDP/GTP-Austauschvermögens von Vav wird durch Phosphorylierung von Tyrosinresten induziert (Crespo et al., 1997). Um eine mögliche Involvierung des Austauschfaktors in der TLR2 vermittelten Aktivierung der GTPase Rac1 beurteilen zu können, wurde Vav1 deshalb nach Stimulation aus THP-1 Zellen immunopräzipitiert und bezüglich einer stimulusabhängigen Tyrosin-Phosphorylierung untersucht. Die Inkubation mit *S. aureus* induzierte eine rasche und transiente Tyrosin-Phosphorylierung von Vav1, die bis zu 15 min nach der Stimulierung andauerte (Abb. 9).



**Abb. 9: Transiente Tyrosin-Phosphorylierung von Vav1 und Proteinkomplexformation mit Rac1**

THP-1 Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit HKSA stimuliert. 1 mg der Zellysate wurde jeweils einer Immunopräzipitation mit Anti-Vav1 unterworfen. Die assoziierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Identifikation der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Die Expression von Vav1 und Rac1 in den Zellysaten ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt. (pY = Phospho-Tyrosin) (Ein Resultat aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten ist gezeigt.)

Ausschließlich tyrosin-phosphoryliertes Vav1 war in der Lage, mit Rac1 einen transienten Proteinkomplex zu bilden. Die Assoziation der beiden Proteine war somit eindeutig stimulusabhängig. Außerdem überlappte das Zeitintervall der Komplexbildung mit dem für die Aktivierung von Rac1 ermittelten Zeitverlauf in diesen Zellen (Abb. 6). Die zur Tyrosin-Phosphorylierung von Vav führenden biochemischen Ereignisse sind sehr komplex und vermutlich abhängig vom verwendeten Zelltyp und eingesetztem Stimulus.

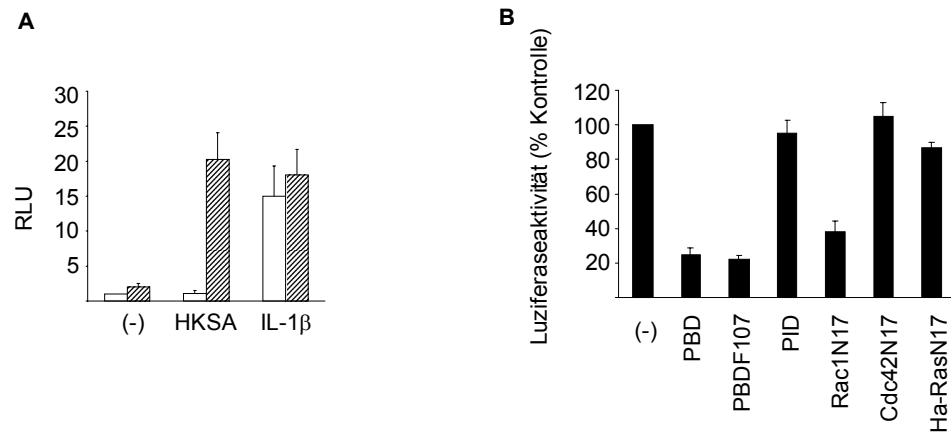
#### **4.1.3 Rac1 kontrolliert die durch TLR2 induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B**

Ein entscheidender Schritt in der von Toll-ähnlichen Rezeptoren vermittelten primären Immunantwort ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) und die damit verbundene nachfolgende Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Aderem & Ulevitch, 2000). Die NF- $\kappa$ B Aktivierung ließ sich durch Transfektion des Luziferase-Reportergens, dessen Expression von fünf NF- $\kappa$ B-abhängigen Enhancern kontrolliert wird (5x NF- $\kappa$ B-Luc), experimentell analysieren. Um Schwankungen der Transfektions-effizienz bei der Bestimmung der Luziferaseaktivität zu vermeiden, erfolgte zusätzlich eine Kotransfektion mit einem zweiten Reportergen, der  $\beta$ -Galaktosidase. Ein 15- bis 20-facher Anstieg der Luziferaseaktivität wurde nach Inkubation mit Interleukin-1 (IL-1) sowohl in ursprünglichen 293 Zellen als auch in 293-Zellen, die TLR2 stabil exprimierten (293-TLR2), beobachtet (Abb. 10A). Auch die Stimulierung von 293-TLR2 Zellen mit *S. aureus* resultierte in einem 20-fachen Anstieg der NF- $\kappa$ B abhängigen Gentranskription in 293-TLR2 Zellen. Im Gegensatz dazu konnte in ursprünglichen 293 Zellen bei bakterieller Stimulation keine Luziferaseaktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Spezifität von TLR2 bei der Erkennung Gram-positiver Bakterien.

Um die Funktion von Rac1 im TLR2-induzierten Signalweg zu NF- $\kappa$ B zu evaluieren, wurden verschiedene Konstrukte eingesetzt. Die p21-Bindedomäne (PBD) der Kinase Pak1, einem der wohl prominentesten Effektoren der RhoGTPasen, umfaßt die Cdc42-Rac interaktive Bindedomäne (CRIB domain) und die Pak inhibitorische Domäne (PID). Eine Transfektion der PBD ruft sowohl eine Blockierung der GTPasen Cdc42 und Rac als auch eine Inhibierung des Effektors Pak selbst in den jeweiligen Zellen hervor (Mira et al., 2000). In bakteriell stimulierten 293-Zellen reduzierte die Koexpression der PBD die NF- $\kappa$ B Aktivierung um ca. 80% (Abb. 10B). Im Gegensatz dazu beeinträchtigte eine Überexpression der PID die HKSA induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung nicht, was darauf hindeutet, daß der gefundene signifikante Effekt der PBD nicht auf eine Inhibierung von Pak1 zurückzuführen ist. Die Expression einer mutierten Form der PBD (PBD F107), die an aktives Cdc42 und Rac bindet aber die Kinaseaktivität von Pak nicht inhibiert, bestätigte die Involvierung von RhoGTPasen im Aktivierungssignalweg zu NF- $\kappa$ B. So reduzierte die PBD F107 die Luziferaseaktivität in einem vergleichbaren Ausmaß wie die PBD (Abb. 10B).

Um zu evaluieren, ob Rac1 oder Cdc42 die NF- $\kappa$ B Aktivierung regulieren, wurden die dominant-negativen Mutanten dieser GTPasen (Rac1N17 und Cdc42N17) jeweils transfiziert. Die Überexpression von Rac1N17 senkte die durch *S. aureus* induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B signifikant (um 70%). Im Gegensatz dazu reduzierte Cdc42N17 die NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression nicht (Abb. 10B). Auch die Expression der dominant-negativen Mutante der GTPase Ha-Ras (Ha-RasN17) hatte keinen Einfluß auf die bakteriell induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, was darauf hindeutet, daß Rac1 die NF- $\kappa$ B-induzierte Genexpression nicht über einen Ras-abhängigen Signalweg reguliert. Die transiente Transfektion der dominant-negativen Formen der GTPasen Rac1, Cdc42 und Ha-Ras in 293-Zellen wurde durch Immunoblotting überprüft, um Schwankungen in der Expressionstärke der jeweiligen Konstrukte auszusräumen. In allen Versuchsansätzen war die Expressionstärke der einzelnen Mutanten jeweils vergleichbar (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 10: Rac1 reguliert die von TLR2 induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung**

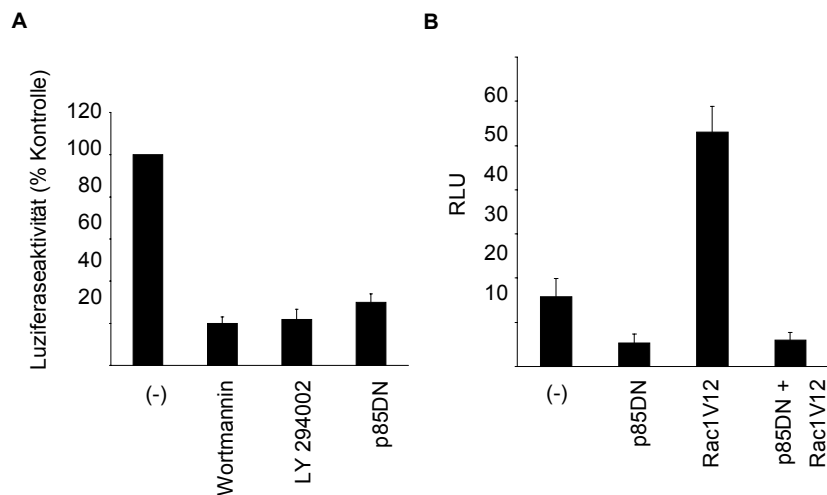
(A) Ursprüngliche 293 Zellen (leere Balken) und 293-TLR2 Zellen (schraffierte Balken) wurden nach der Transfektion der Reporterplasmide 5x NF- $\kappa$ B-Luc und  $\beta$ -Gal (Plasmid der  $\beta$ -Galaktosidase) entweder nicht stimuliert (-) oder 5 h lang mit HKSA ( $10^7$  CFU/ml) bzw. IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) stimuliert. Die Aktivität der Luziferase ist in Form der artifizierten Einheit RLU (relative luciferase units) ausgedrückt. (B) 293-TLR2 Zellen wurden nach Transfektion mit den Reportergenen entweder mit leerem Expressionsvektor (-) (entspricht der Kontrolle) oder den angezeigten Konstrukten kotransfiziert und schließlich mit HKSA stimuliert. Die bei der Transfektion der einzelnen Konstrukte ermittelten Luziferaseaktivitäten sind jeweils prozentual in Relation zur Kontrolle (100%) gesetzt. (Alle Balken repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.)

#### **4.1.4 Die Rac1-abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung involviert Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K)**

Die von Rac kontrollierten Signaltransduktionswege können generell durch unterschiedliche, spezifische Downstreameffektoren vermittelt werden (Van Aelst & D-Souza-Schorey, 1997). Eine Involvierung der Kinase Pak1, dem Haupteffektor von Rac1, in der NF- $\kappa$ B Aktivierung von 293-TLR2 Zellen wurde bereits ausgeschlossen (siehe Kapitel 4.1.3). Ein weiterer potentieller Rac-Effektor im zur NF- $\kappa$ B Aktivierung führenden Signalweg stellt die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K) dar. PI-3K ist ein Heterodimer, das sich aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85) zusammensetzt (Carpenter & Cantley, 1996), wobei p85 direkt mit aktivem Rac1 interagieren kann (Zheng et al., 1994; Bokoch et al., 1996). Zur Untersuchung der Funktion von PI-3K im TLR2 induzierten Signalweg wurden sowohl die für PI-3K spezifischen pharmakologischen Inhibitoren Wortmannin und LY294002 und als auch eine dominant-negative Form der regulatorischen Kinaseuntereinheit (p85dn) verwendet. Eine Inkubation von 293-TLR2 Zellen mit beiden Inhibitoren reduzierte die bakteriell induzierte Expression des Luziferase-Reportergens jeweils um 70-80%. Auch die Kotransfektion von p85dn blockierte die Reporterexpression in vergleichbarer Größenordnung (Abb. 11A). Somit ist die Aktivität der PI-3K für den von TLR2 induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalweg essentiell.

PI-3K kann je nach untersuchtem Zelltyp und verwendetem Stimulus sowohl als Effektor als auch als Aktivator von Rac1 dienen. So sind die in Folge der Kinaseaktivität von PI-3K produzierten Lipide in der Lage, Rac1 spezifische Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) zu aktivieren, was schließlich in einer Aktivierung von Rac1 resultiert. Andererseits kann die aktive GTPase, wie bereits erwähnt, an die regulatorische Untereinheit p85 spezifisch binden und somit die Aktivierung und die Lokalisation der Kinase regulieren. Eine Inhibierung der Kinaseaktivität mit Wortmannin beeinflusste die durch *S. aureus* induzierte Rac Aktivierung in 293-TLR2 und THP-1 Zellen nicht (Daten

nicht gezeigt), so daß eine Aktivatorfunktion von PI-3K gegenüber Rac1 im untersuchten Signalweg ausgeschlossen werden kann.



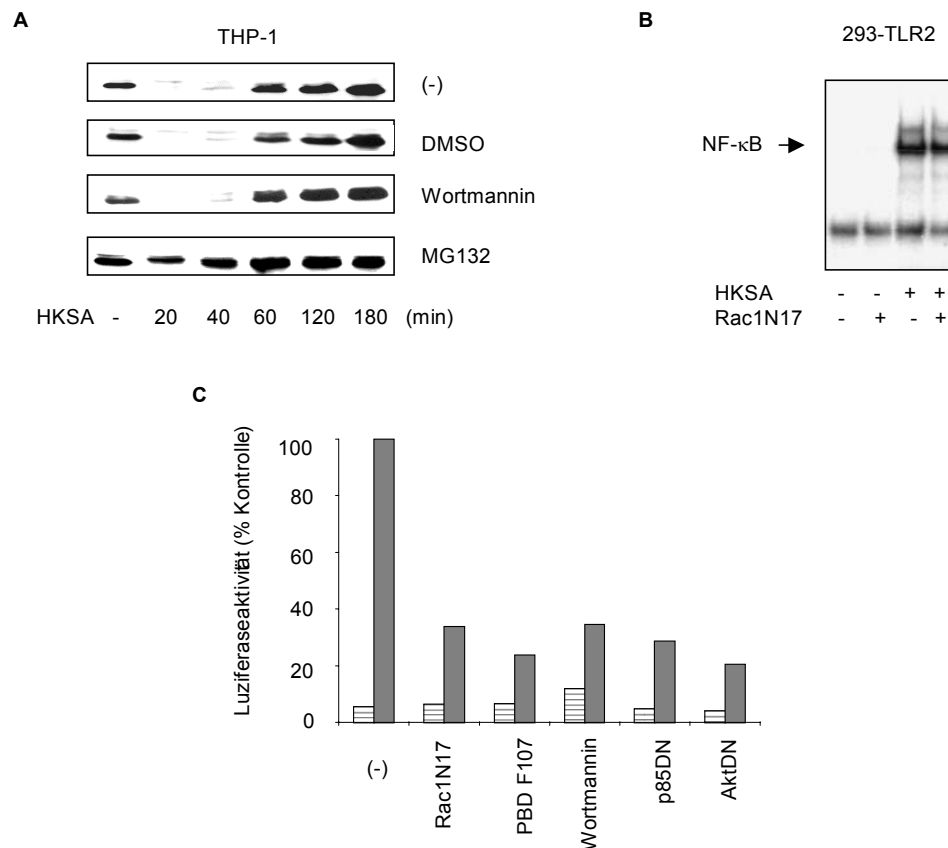
**Abb. 11: PI-3K agiert als Downstreameffektor von Rac1 im NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalweg**

(A) Die Aktivität der PI-3K wurde in 293-TLR2 Zellen entweder durch eine 30-minütige Behandlung mit den Inhibitoren Wortmannin (50 nM) und LY294002 (10  $\mu$ M) oder durch Transfektion mit p85dn inhibiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO, dem Lösungsmittel der Inhibitoren, behandelt wurden. Die ermittelten Luziferaseaktivitäten sind jeweils prozentual in Relation zur Kontrolle (100%) gesetzt. (B) 293-TLR2 Zellen wurden nach Transfektion mit den Reportergenen entweder mit leerem Expressionsvektor (-) oder den angezeigten Konstrukten kotransfiziert und schließlich mit HKSA stimuliert. Die Aktivität der Luziferase ist in Form der artifizierten Einheit RLU (relative luciferase units) ausgedrückt.

Um eine mögliche Effektorfunktion der Kinase zu evaluieren, wurden 293-Zellen mit p85dn, dominant-aktivem Rac1 (Rac1V12) oder der Kombination aus beiden Konstrukten transfiziert und nach Stimulation mit HKSA einem Luziferase-Reporterassay unterworfen. Die Expression von Rac1V12 potentierte die NF- $\kappa$ B abhängige Luziferaseaktivität gegenüber der Kontrolle um das 2-3 fache, was die Funktion von Rac1 im TLR2 vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalweg nachdrücklich bestätigt. Die Koexpression von p85dn konnte diesen Potenzierungseffekt dagegen vollständig aufheben, indem sie die Reporteraktivität in einer Größenordnung reduzierte, die mit der alleinigen Expression von p85dn vergleichbar war (ca. 70%) (Abb. 11B). Diese Daten weisen zusammenfassend darauf hin, daß PI-3K im TLR2 induzierten Signalweg zu NF- $\kappa$ B einen Effektor von Rac1 darstellt.

#### ***4.1.5 Die Rac1/PI-3K Kaskade reguliert die Transaktivierung von p65***

Im inaktiven Zustand ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im Zytoplasma an den spezifischen Inhibitor I $\kappa$ B gebunden. Die Phosphorylierung und Degradierung von I $\kappa$ B führt zur Freisetzung der Kernlokalisationssequenz, die den anschließenden Transport von NF- $\kappa$ B in den Nukleus ermöglicht. Um die Funktion der Rac1/PI-3K Kaskade in der von TLR2 induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung genauer zu bestimmen, wurde deshalb der Effekt von Rac1 und PI-3K auf die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  untersucht. In THP-1 Zellen ist I $\kappa$ B $\alpha$  schon 20 min nach Stimulation mit HKSA vollständig degradiert und wird im Laufe von 60 min wieder resynthetisiert. Dieser Zeitverlauf wurde weder durch eine Inhibierung der PI-3K Aktivität mit Wortmannin noch durch eine Überexpression von dominant-negativem Rac1 (Rac1N17) verändert (Abb. 12A). Im Gegensatz dazu blockierte der Proteasomeninhibitor MG132 die I $\kappa$ B Degradierung signifikant.



**Abb. 12: Die Rac1/PI-3K Kaskade reguliert die Transaktivierung von p65**

(A) Zeitverlauf der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Degradation in THP-1 Zellen: Die Monozyten blieben entweder unbehandelt (-) oder wurden mit DMSO bzw. den Inhibitoren Wortmannin (50 nM) und MG132 (10  $\mu\text{M}$ ) 60 min vor den angegebenen Zeitpunkten der Stimulation preinkubiert. Jedes Zellysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran gebロットet.  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. (B) EMSA (Electrophoretic mobility shift assay): 293-TLR2 Zellen waren entweder untransfiziert oder exprimierten dominant-negatives Rac1 (Rac1N17). Darüberhinaus blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden 60 min mit HKSA stimuliert. Nukleäre Extrakte wurden präpariert und mit einer NF- $\kappa\text{B}$  spezifischen, radioaktiven Probe inkubiert. (C) Um die Transaktivierung von p65 zu analysieren, wurden 293-TLR2 Zellen nach Transfektion mit der Reporterkombination pFR-Luc und pGal4-p65 entweder mit leerem Expressionsvektor (-) oder den angezeigten Konstrukten kotransfiziert bzw. mit dem Inhibitor Wortmannin vorbehandelt und schließlich mit HKSA stimuliert (ausgefüllte Balken). Die jeweils ermittelten Luziferaseaktivitäten sind prozentual in Relation zur Kontrolle (100%) gesetzt.

Um den Effekt der Rac1 abhängigen Signalkaskade auf das DNA-Bindevermögen von NF- $\kappa$ B beurteilen zu können, wurden DNA-Bindessays, sogenannte EMSA (electrophoretic mobility shift assay), durchgeführt. Hierzu wurden nukleäre Extrakte der zu untersuchenden Zellen präpariert, die dann mit einer für NF- $\kappa$ B spezifischen, radioaktiv markierten Sequenz inkubiert wurden. Nur bei bakterieller Stimulation kam es zur Bindung des Transkriptionsfaktors an das spezifische Oligonukleotid. Eine Überexpression von Rac1N17 in 293-TLR2 Zellen veränderte das DNA-Bindevermögen von NF- $\kappa$ B nicht (Abb. 12B). Auch die Inkubation mit den PI-3K Inhibitoren Wortmannin und LY294002 hatte keinen Einfluß auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung in THP-1 Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten demonstrieren, daß Rac1 einen Signalweg kontrolliert, der essentiell für die HKSA induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung ist, ohne die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , die nukleäre Translokation und das DNA-Bindevermögen von NF- $\kappa$ B zu beeinflussen.

Die Degradierung des zytoplasmatischen Inhibitors I $\kappa$ B stellt zwar eine essentielle aber nicht die alleinige Voraussetzung zur NF- $\kappa$ B-abhängigen Gentranskription dar. So konnte gezeigt werden, daß die induzierbare Phosphorylierung und Transaktivierung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 die Transkriptionsaktivität entscheidend beeinflusst (Sizemore et al., 1999; Leitges et al., 2001). Um den Einfluß der Rac1 Kaskade auf die Transkriptionsuntereinheit p65 direkt zu untersuchen, wurde das Fusionsgen Gal4-p65 kloniert und in 293-TLR2 Zellen transfiziert. Die stimulusabhängige Phosphorylierung von p65 resultierte in der Bindung des Fusionsproteins Gal4-p65 an den Gal4 abhängigen Promoter des zugehörigen Reporterplasmides und bewirkte so die Transkription der Luziferase (siehe Kapitel 3.2). Die Stimulation mit HKSA führte zu einem 10-15 fachen Anstieg der Transkriptionsaktivität von p65. Sowohl dominant-negatives Rac1 als auch das Konstrukt PBD F107, das aktiviertes Rac1 bindet und somit die Interaktion der GTPase mit Downstreameffektoren verhindert, reduzierten die Transaktivierung von p65 um 65-80% (Abb. 12C). Vergleichbare Effekte wurden auch bei Inhibierung der PI-3K Aktivität mit dem spezifischen Inhibitor Wortmannin bzw. durch Transfektion der

dominant-negativen Form von p85 erzielt. Die Kinase Akt (PKB), auf die in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden soll, repräsentiert ein Downstreamtarget von PI-3K im TLR2 induzierten Signalweg zu NF- $\kappa$ B. Die Expression der dominant-negativen Form von Akt (Akt<sub>dn</sub>) inhibierte die Transaktivierung von p65 ebenfalls signifikant. Zusammenfassend demonstrieren die dargestellten Daten, daß der von TLR2 induzierte Rac1-abhängige Signalweg die Aktivierung von NF- $\kappa$ B gezielt durch die Kontrolle der Transkriptionsaktivität von p65 reguliert.

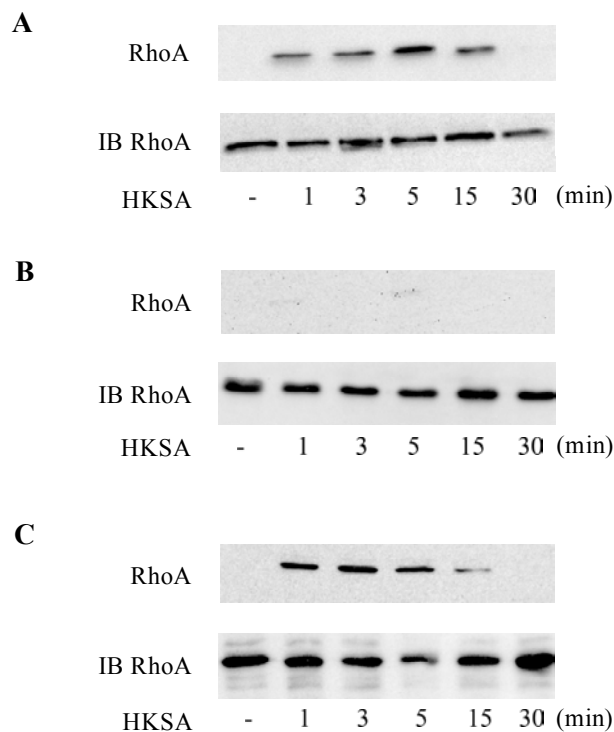
## ***4.2 Die GTPase RhoA kontrolliert als Schlüsselement zwei verschiedene von TLR2 induzierte Signalwege: NF- $\kappa$ B Aktivierung und Apoptose***

Neben der NF- $\kappa$ B-vermittelten Gentranskription gibt es in zunehmendem Maße Anhaltspunkte dafür, daß der Toll-ähnliche Rezeptor 2 zusätzlich proapoptotische Signale induziert. So konnten beispielsweise Aliprantis und Mitarbeiter die Induktion von Apoptose in TLR2 exprimierenden Zellen nach Stimulation mit einem bakteriellen Lipoprotein beobachten (Aliprantis et al., 1999; Aliprantis et al., 2000). Der diesen Beobachtungen zugrundeliegende regulierende Mechanismus ist jedoch bisher unklar. Rho GTPasen sind generell aufgrund ihrer spezifischen Interaktion mit verschiedenen zellulären Effektoren in der Lage, ein kooperatives Signalnetzwerk zu koordinieren, das die Kontrolle von derart komplexen biologischen Prozessen erlaubt. Vor allem für die GTPase RhoA ist sowohl eine Involvierung in Gentranskription als auch ein Einfluß auf apoptotische Ereignisse in verschiedenen Zellsystemen beschrieben worden (Donovan et al., 1997; Subauste et al., 2000).

### ***4.2.1 Stimulierung von TLR2 mit *S. aureus* führt zur transienten Aktivierung von RhoA***

Der biochemische Assay, der die Detektion von aktiviertem Rho in stimulierten Zellysaten ermöglicht, beruht auf dem gleichen Prinzip, wie der bereits beschriebene PBD-Assay zur Bestimmung von aktiviertem Rac (Kapitel 4.1.1). So kann biochemisch aktives, GTP-gebundenes Rho mit Hilfe der Rho-Bindedomäne (RBD) des spezifischen Effektorproteins Rhotekin aus Zellysaten affinitätspräzipitiert werden (Ren et al., 1999). Mittels dieses sogenannten RBD-Assays wurde untersucht, ob RhoA nach Stimulation von TLR2 mit Gram-positiven Stimuli wie *S. aureus* (HKSA) aktiviert wird. Die Inkubation mit HKSA resultierte in einer raschen und transienten Aktivierung von RhoA in 293-TLR2 Zellen, die etwa 15 min andauerte (Abb. 13A).





**Abb. 13: Die Stimulation von TLR2 resultiert in einer transienten Aktivierung von RhoA**

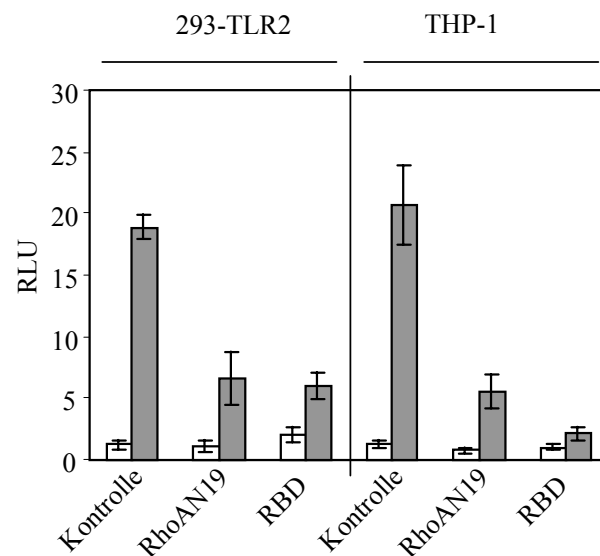
(A, B) Zeitverlauf der RhoA Aktivierung in 293-TLR2 Zellen (A) und ursprünglichen 293 Zellen (B). Beide Zelllinien wurden 24 h vor der Stimulation mit HKSA mit 100 ng Myc-RhoAwt transient transfiziert. Die Stimulierung erfolgte in Medium, das 1% FBS enthielt. (C) Zeitverlauf der RhoA Aktivierung in der monozytischen Zelllinie THP-1. Die Zellen wurden einem 15-stündigen Serumentzug unterworfen und anschließend in Gegenwart von 1% FBS mit HKSA stimuliert. Obere Reihen: Die Lysate jedes Zeitpunktes wurden einer Affinitätspräzipitation mit GST-RBD unterworfen. Die an die GST-RBD gebundenen Proteine wurden schließlich mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern unter der Verwendung von Enhanced Chemiluminescence (ECL). Untere Reihe: Immunoblots (IB) von RhoA in den für die Bindeassays verwendeten Zellysate. (Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.)

Die Aktivierung von RhoA erfolgte unmittelbar nach der Inkubation mit den Bakterien und dauerte für einen Zeitraum von etwa 15 min an. Im Gegensatz hierzu konnte in ursprünglichen 293 Zellen keine stimulus-abhängige Rho Aktivierung festgestellt werden (Abb. 13B). Die GTPase ist somit Bestandteil einer Signalkaskade, die spezifisch von TLR2 induziert wird. Auch in der humanen monozytischen Zelllinie THP-1, die TLR2 endogen exprimieren, konnte in Gegenwart Gram-positiver Stimuli die Aktivität in einem vergleichbaren Zeitverlauf induziert werden (Abb. 13C).

#### **4.2.2 RhoA kontrolliert die von TLR2 induzierte NF- $\kappa$ B abhängige Gentranskription**

Wie bereits in Kapitel 4.1.3 beschrieben, läßt die Transfektion des Reporterplasmides 5x NF- $\kappa$ B eine experimentelle Analyse der stimulus-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu. Neben der Transfektion von 293-TLR2 Zellen gelang es uns schließlich auch, die als generell schwer transfizierbar geltenden Suspensionszellen THP-1 mit dem Luziferase-Reporter gen und dominant-negativen Plasmiden kozutransfizieren. Die Transfektionseffizienz in 293-TLR2 wurde mit Hilfe von Immunofluoreszenz ermittelt und lag unabhängig vom eingesetzten Konstrukt konstant bei ca. 80%. In THP-1 Zellen war die Transfektionseffizienz mit ca. 30% erwartungsgemäß niedriger, reichte aber aus, um Unterschiede in der Reporter genaktivität signifikant quantifizieren zu können. Die Stimulation von beiden Zelllinien mit hitzeinaktivierten *S. aureus* resultierte jeweils in einem 15- bis 20-fachen Anstieg der Reporter genaktivität (Kontrolle) (Abb. 14). Um die Funktion von RhoA in dem von TLR2 induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalweg beurteilen zu können, wurde der Luziferase-Reporter entweder mit dominant-negativem RhoA (RhoAN19) oder der Rho-Bindedomäne (RBD) des Effektors Rhotekin kotransfiziert. Die Rhotekin-RBD bindet spezifisch an zelluläres, aktives RhoA und verhindert so die Interaktion der GTPase mit endogenen Downstreameffektoren. Die Inhibierung von RhoA mit Hilfe dieser beiden Konstrukte führte in beiden Zelllinien zu

einer signifikanten Abnahme der Luziferaseaktivität. Je nach Zelltyp und verwendetem Plasmid bewegte sich der reduzierende Effekt zwischen 70 und 90% (Abb. 14). Im Gegensatz dazu hatten die Expression eines Kontrollvektors (Kontrolle) und die Kotransfektion von Wildtyp RhoA (Daten nicht gezeigt) keinen Einfluß auf die NF- $\kappa$ B Aktivität.



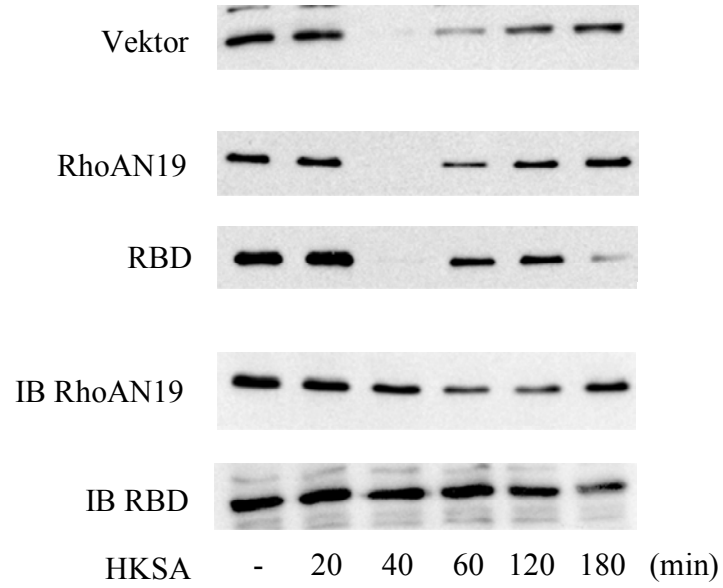
**Abb. 14: RhoA reguliert die von TLR2 induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung**

293-TLR2 (links) und THP-1 Zellen (rechts) wurden nach Transfektion mit den Reporterplasmiden 5x NF- $\kappa$ B und  $\beta$ -Gal (Plasmid der  $\beta$ -Galaktosidase) entweder mit leerem Expressionsvektor (Kontrolle) oder den angezeigten Konstrukten kotransfiziert. Die Zellen blieben entweder unstimuliert (leere Balken) oder wurden 2-4 h lang mit HKSA stimuliert (ausgefüllte Balken). Die Aktivität der Luziferase ist in Form der artifiziellen Einheit RLU (relative luciferase units) ausgedrückt. (Alle Balken repräsentieren Mittelwerte von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.)

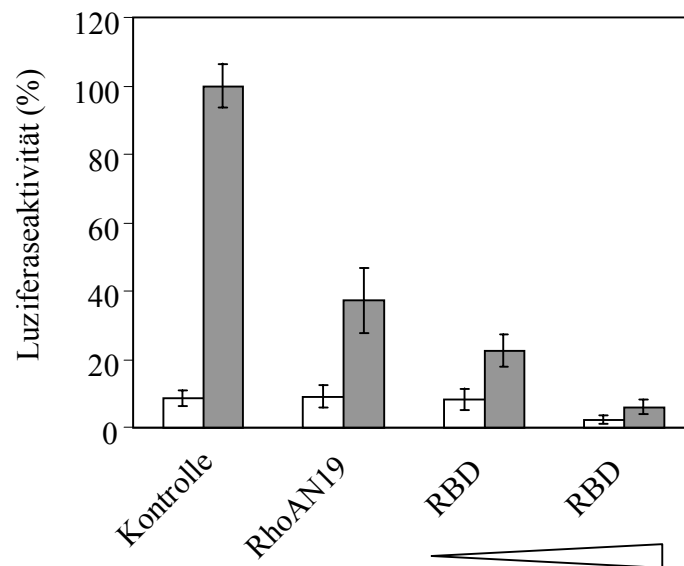
In den verwendeten Zelllinien 293-TLR2 und THP-1 ist die Aktivität von RhoA demnach essentiell für die bakteriell induzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription. Die Expressionsstärke der transfizierten Plasmide wurde mittels Immunoblotting überprüft und war für alle eingesetzten Konstrukte ähnlich (Daten nicht gezeigt).

Um die Rolle von RhoA in der von TLR2 induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung näher zu bestimmen, wurde der Effekt dieser GTPase auf die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  untersucht. In 293-TLR2 Zellen führt die Inkubation mit hitzeinaktivierten *S. aureus* (HKSA) zu einer signifikanten Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  40 min nach der Stimulation. Im Lauf von etwa 2 Stunden wird das Protein wieder vollständig resynthetisiert. Somit degradiert I $\kappa$ B $\alpha$  in den epithelialen 293 Zellen etwa halb so schnell wie in der monozytischen Zelllinie THP-1 (Kapitel 4.1.5, Abb. 9A) bei Verwendung des gleichen bakteriellen Stimulus. Dieser Zeitverlauf blieb auch bei Überexpression der Rhotekin-RBD oder dominant-negativem RhoA (RhoAN19) unverändert (Abb. 15A). Im Gegensatz dazu kann die I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung durch Inkubation mit dem Proteasomeninhibitor MG132 (Kapitel 4.1.5) oder durch Überexpression von dominant-negativer I $\kappa$ B Kinase 2, die für die stimulus-abhängige Phosphorylierung von I $\kappa$ B verantwortlich ist, nahezu vollständig inhibiert werden (Daten nicht gezeigt). Wie bereits zuvor erwähnt, beruht die NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription nicht ausschließlich auf der Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und der nachfolgenden Translokation des Proteinkomplexes p65/p50 in den Nukleus, sondern hängt auch von der induzierbaren Transkriptionsaktivität der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 ab. Um den Einfluß von Rho auf die Transaktivierung von p65 zu evaluieren, wurden 293-TLR2 Zellen mit dem Fusionsprotein GAL4-p65 und dem zugehörigen Reporterplasmid transfiziert. Die Stimulation mit HKSA induzierte einen 10 bis 15-fachen Anstieg in der Transkriptionsaktivität von p65. Im Gegensatz zur Kontrolle (Transfektion des Expressionsvektors) inhibierten sowohl dominant-negatives RhoA als auch die Rho-Bindedomäne (RBD) die Transaktivierung von p65 um 70-90% (Abb. 15B). Somit reguliert der von TLR2 induzierte Rho-abhängige Signalweg die NF- $\kappa$ B- abhängige Gentranskription durch direkte Kontrolle der Transkriptionsaktivität von p65.

**A**



**B**

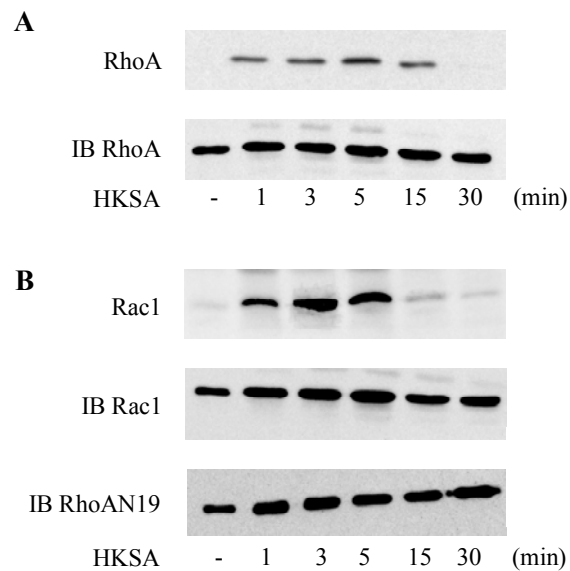


**Abb. 15: RhoA reguliert die Transaktivierung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65**

(A) Zeitverlauf der I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung in 293-TLR2 Zellen: Die Zellen wurden entweder mit Vektor (obere Reihe) oder den angezeigten Konstrukten (mittlere Reihen) 24 h vor der Stimulation mit HKSA transfiziert. Die Lysate jedes Zeitpunktes (50  $\mu$ g) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. I $\kappa$ B $\alpha$  wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Immunoblots (IB) zeigen die Expression der transfizierten Konstrukte in den Gesamtzellysaten (untere Reihen). (B) Um die Transaktivierung von p65 zu analysieren, wurden 293-TLR2 Zellen nach Transfektion mit der Reporterkombination pFR-Luc und pGAL4-p65 entweder mit einem Kontrollvektor oder den angezeigten Konstrukten kotransfiziert. Die Zellen blieben entweder unstimuliert (leere Balken) oder wurden 5 h lang mit HKSA (ausgefüllte Balken) stimuliert. Die für jedes Konstrukt ermittelten Luziferaseaktivitäten sind jeweils prozentual in Relation zur Kontrolle (100%) gesetzt. (Alle Balken repräsentieren Mittelwerte von mindestens 4 unabhängig durchgeführten Experimenten.)

**4.2.3 RhoA ist nicht Bestandteil des Rac1-abhängigen NF- $\kappa$ B Aktivierungssignalweg**

Da sowohl Rac1 als auch RhoA die Transkriptionsaktivität von p65 direkt regulieren, ohne die Degradation von I $\kappa$ B zu beeinflussen, war es naheliegend zu untersuchen, ob die beiden GTPasen Bestandteil der gleichen, zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führenden Signalkaskade sind. Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K), die als Downstreameffektor von Rac1 in dem von TLR2 induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalweg identifiziert wurde (Kapitel 4.1.4), kann je nach untersuchtem Zelltyp und verwendetem Stimulus sowohl als Effektor als auch als Aktivator von RhoGTPasen im allgemeinen fungieren. Um die Rolle der Kinase in der HKSA induzierten RhoA Aktivierung zu beurteilen, wurde die Aktivität von PI-3K mit dem spezifischen pharmakologischen Inhibitor Wortmannin blockiert. Die Inkubation mit Wortmannin hatte entsprechend der durchgeführten RBD Bindeassays keinen Einfluß auf die stimulusabhängige Aktivierung von RhoA in 293-TLR2 (Abb. 16A) oder in THP-1 Zellen (Daten nicht gezeigt). Demnach wird die RhoA Aktivierung nicht von einem PI-3K-abhängigen Signalweg reguliert. Um zu evaluieren, ob die GTPase



**Abb. 16: RhoA ist nicht Bestandteil des von Rac1 kontrollierten NF- $\kappa$ B Aktivierungssignalweg**

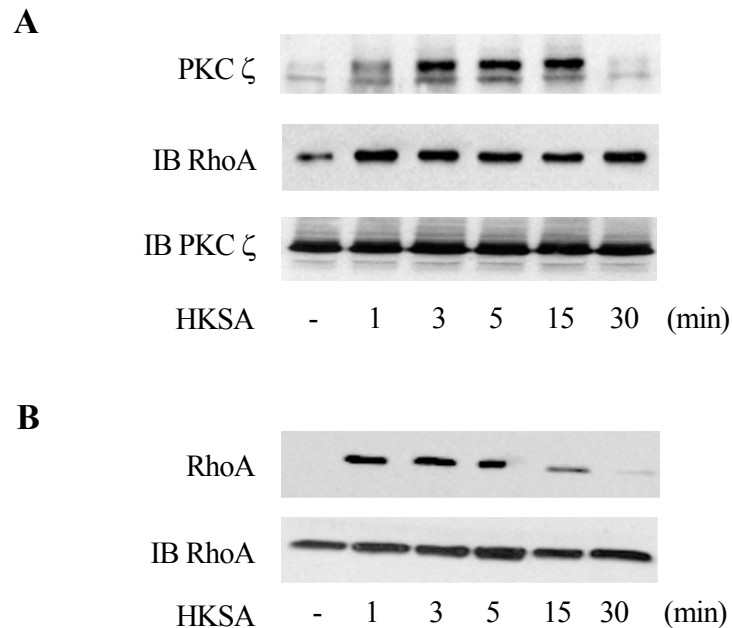
(A) Aktivierung von RhoA nach Inhibierung von PI-3K. 293-TLR2 Zellen wurden mit Myc-RhoAwt 24 h vor der Stimulation mit HKSA transfiziert. Um die Kinaseaktivität von PI-3K zu inhibieren, wurden die Zellen 30 min vor der Stimulation mit dem für PI-3K spezifischen Inhibitor Wortmannin (50 nM) inkubiert. Obere Reihe: Jedes Lysat wurde einer Affinitätspräzipitation mit GST-RBD unterworfen. Die an die GST-RBD gebundenen Proteine wurden schließlich mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern unter der Verwendung von Enhanced Chemiluminescence (ECL). Untere Reihe: Immunoblots (IB) von RhoA in den für die Bindeassays verwendeten Zellysate. (B) Aktivierung von Rac1 nach Inhibierung von RhoA. 293-TLR2 Zellen wurden mit dominant-negativem RhoA (Myc-RhoAN19) 24 h vor der Stimulation mit HKSA transfiziert. Die Lysate der verschiedenen Zeitpunkte wurden einer Affinitätspräzipitation mit GST-PBD unterworfen. Die an die GST-PBD gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Antikörper (obere Reihe). Immunoblots (IB) von endogenem Rac1 und überexprimiertem RhoAN19 in in den für die Bindeassays verwendeten Zellysaten.

Rho dagegen die Aktivierung von Rac1 kontrolliert, wurden 293-TLR2 Zellen mit dominant-negativem RhoA (RhoAN19) transfiziert und die HKSA induzierte Rac1 Aktivierung mit Hilfe des PBD-Assays (Kapitel 4.1.1) untersucht. Die Expression von dominant-negativem RhoA inhibierte die Aktivierung von Rac1 nicht (Abb. 16B). Obwohl Rac1 und RhoA beide die Transkriptionsaktivität der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 direkt regulieren, sind die GTPasen demnach jeweils Bestandteil zweier unterschiedlicher TLR2-induzierter Signalwege.

#### **4.2.4 Die RhoA-abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung involviert PKC $\zeta$**

Studien an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* demonstrierten, daß Pkc1, ein Homolog der in Säugetieren vorkommenden Proteinkinase C (PKC), mit dem kleinen GTP-bindenden Protein Rho1 assoziiert und als dessen Downstreamtarget agiert (Nonaka et al., 1995). Zusätzlich konnte eine Involvierung der atypischen PKC Isoform  $\zeta$  in die Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 in PKC $\zeta$ -defizienten Mäusen gezeigt werden (Leitges et al., 2001, Sanz et al., 1999). Vor diesem Hintergrund untersuchten wir, ob RhoA nach bakterieller Stimulation von TLR2 in 293-TLR2 Zellen mit Mitgliedern der PKC Familie interagiert. Eine Analyse der Gesamtzellysate im Vorfeld zeigte, daß die atypischen PKC Isoformen in 293-TLR2 Zellen endogen stark exprimiert wurden. Bei Stimulation mit HKSA assoziierte nur die atypische PKC Isoform  $\zeta$  (Abb. 17A), nicht aber andere PKC Familienmitglieder wie PKC $\delta$  or PKC $\theta$  (Daten nicht gezeigt) mit der GTPase RhoA. Die Interaktion von RhoA mit PKC $\zeta$  war eindeutig stimulusabhängig. Die Assoziation der beiden Proteine wurde in einem Zeitrahmen beobachtet, der im Vergleich zum für die Rho Aktivierung ermittelten Zeitverlauf leicht verspätet war. Kontrollexperimente, bei denen statt des Rho-spezifischen Antikörpers ein beliebiger monoklonaler Antikörper zur Immunopräzipitation eingesetzt wurde, zeigten keine



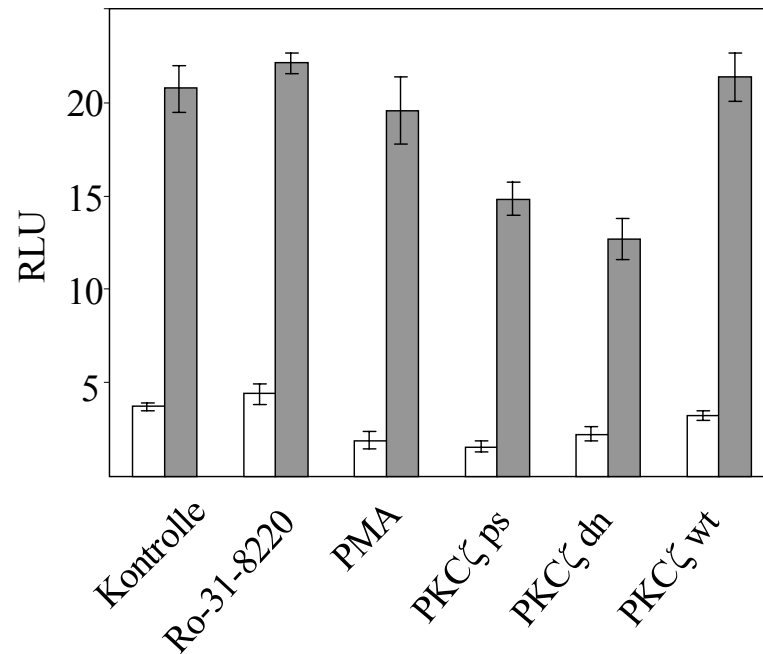


**Abb. 17: PKC $\zeta$  repräsentiert ein potentielles Downstreamtarget von RhoA**

(A) 293-TLR2 Zellen wurden mit Myc-RhoAwt 24 h vor der Stimulation mit HKSA transfiziert. Anti-RhoA Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Antikörper für PKC $\zeta$  (obere Reihe). Immunoblots (IB) zeigen die Menge an immunopräzipitiertem RhoA pro Zeitpunkt und die Expression von PKC $\zeta$  in den Gesamtzelllysaten. (B) Aktivierung von RhoA nach Inhibierung von PKC $\zeta$ . 293-TLR2 Zellen wurden mit Myc-RhoAwt 24 h vor der Stimulation transfiziert. Um die Kinaseaktivität von PKC $\zeta$  zu inhibieren, wurden die Zellen 60 min vor der Stimulation mit dem für PKC $\zeta$  spezifischen inhibitorischen Pseudosubstrat (PKC $\zeta$  ps, 30  $\mu$ M) inkubiert. Obere Reihe: Jedes Lysat wurde einer Affinitätspräzipitation mit GST-RBD unterworfen. Die an die GST-RBD gebundenen Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion von RhoA erfolgte mit einem spezifischen Antikörper. Die untere Reihe zeigt die Expression an RhoA in den Gesamtzelllysaten der verschiedenen Zeitpunkte. (Immunoblot =IB)

Assoziation von PKC $\zeta$  (Daten nicht gezeigt), so daß die gefundene Interaktion von RhoA und der PKC Isoform als spezifisch angesehen werden kann. Um die Rolle von PKC $\zeta$  auf die von TLR2 induzierte Aktivierung von RhoA zu analysieren, wurde die Aktivität von PKC $\zeta$  mit einem spezifischen, inhibitorischen Pseudosubstrat (PKC $\zeta$  ps) blockiert. Die Behandlung mit dem Pseudosubstrat beeinflusste die Aktivierung von RhoA in 293-TLR2 Zellen nicht (Abb. 17B). PKC $\zeta$  repräsentiert demnach ein mögliches Downstreamtarget für RhoA.

Da atypische PKC Isoformen (aPKCs), so auch PKC $\zeta$ , eine entscheidende Rolle in der Regulation verschiedener NF- $\kappa$ B-Aktivierungssignalwege spielen (Diaz-Meco et al., 1993; Sanz et al., 2000), untersuchten wir schließlich, ob aPKCs auch die bakteriell induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in 293-TLR2 Zellen kontrollieren (Abb. 18). Die selektive Inhibierung aller konventionellen PKC Isoformen mit dem Inhibitor Ro-31-8220 hatte im Vergleich zur Kontrolle (mit DMSO behandelte Zellen) keinen Effekt auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression. Darüberhinaus führte auch eine mehrstündige Inkubation mit Phorbolester (PMA), die eine Herunterregulierung der Expression aller konventionellen und neuartigen PKC Isoformen hervorruft (Wooten et al., 2000), zu keiner Reduktion der NF- $\kappa$ B Aktivierung. Beide Befunde weisen daraufhin, daß weder konventionelle noch neuartige PKCs am TLR2 Signaling zu NF- $\kappa$ B in 293-TLR2 Zellen beteiligt sind. Um zu beurteilen, ob die atypische PKC isoform  $\zeta$  stattdessen eine Rolle in der HKSA induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung spielt, wurden 293-TLR2 Zellen mit PKC $\zeta$  ps wie bereits beschrieben vorbehandelt oder mit dominant-negativer PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$ dn) transfiziert. Beide Ansätze resultierten in einer Reduktion der NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression von jeweils 40-50% (Abb. 18). Im Gegensatz hierzu beeinflusste die Überexpression von Wildtyp PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$  wt) die von TLR2 induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht.

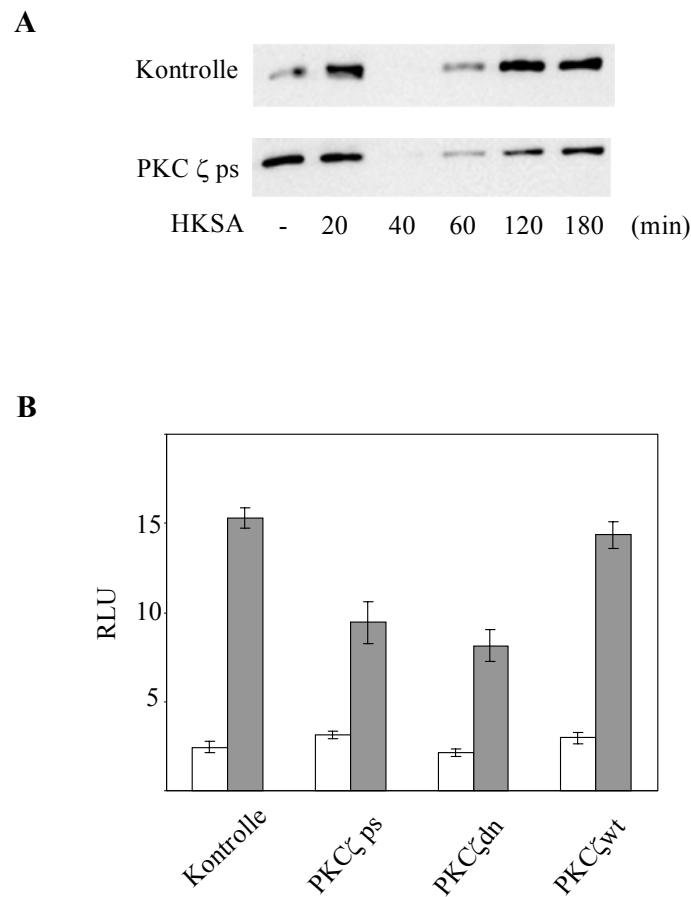


**Abb. 18: PKC $\zeta$  reguliert die von TLR2 induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung**

293-TLR2 Zellen wurden nach der Transfektion der Reporterplasmide 5x NF- $\kappa$ B und  $\beta$ -Gal (Plasmid der  $\beta$ -Galaktosidase) entweder mit leerem Expressionsvektor (Kontrolle) oder den angezeigten PKC $\zeta$ -Konstrukten kotransfiziert. Die Zellen wurden entweder mit Phorbol ester (PMA, 1  $\mu$ M) über Nacht, mit dem PKC $\zeta$  spezifischen Pseudosubstrat (PKC $\zeta$  ps, 30  $\mu$ M) 60 min oder mit dem konventionellen PKC Inhibitor Ro-31-8220 (5  $\mu$ M) 30 min lang vorinkubiert. Die Zellen blieben entweder unstimuliert (leere Balken) oder wurden 2-4 h lang mit HKSA stimuliert (ausgefüllte Balken). Die Aktivität der Luziferase ist in Form der artifiziellen Einheit RLU (relative luciferase units) ausgedrückt. (Alle Balken repräsentieren Mittelwerte von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.)

Wie bereits zuvor gezeigt, reguliert der von TLR2 induzierte Rho-abhängige Signalweg die NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription durch die direkte Kontrolle der Transkriptionsaktivität von p65. Aus diesem Grund war es naheliegend, den Effekt von PKC $\zeta$  sowohl auf die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  als auch auf die Transaktivierung von p65 zu analysieren. Der Zeitverlauf der I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung wurde in Gegenwart des PKC $\zeta$  Pseudosubstrates (PKC $\zeta$  ps) nicht beeinflusst (Abb. 19A), was darauf schließen läßt, daß PKC $\zeta$  die NF- $\kappa$ B Aktivierung unabhängig von I $\kappa$ B $\alpha$  reguliert.

Um zu bestätigen, daß die PKC Isoform NF- $\kappa$ B durch Beeinflussung der Transkriptionsaktivität von p65 kontrolliert, wurden 293-TLR2 Zellen mit dem chimären Protein Gal4-p65 und dem dazugehörigen Reporterplasmid transfiziert. Die Vorbehandlung mit PKC $\zeta$  ps führte zu einer Senkung der Transkriptionsaktivität von p65 um etwa 50% (Abb. 19B). Übereinstimmend damit reduzierte dominant-negative PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$ dn) die Transaktivierung von p65 in vergleichbarer Größenordnung (um ca. 60%). Die Transfektion von PKC $\zeta$ wt beeinflusste die Aktivität von p65 dagegen nicht. Zusammenfassend läßt sich somit festhalten, daß die atypische PKC Isoform  $\zeta$  Bestandteil einer von RhoA regulierten Signalkaskade ist, die gezielt die Transkriptionsaktivität der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 kontrolliert. Im Rahmen dieser zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führenden Signalkaskade fungiert PKC $\zeta$  als Downstreameffektor von RhoA.



**Abb. 19: PKC $\zeta$  ist in die Transaktivierung von p65 involviert**

(A) I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung in 293-TLR2 Zellen: Die Zellen blieben entweder unbehandelt (Kontrolle, obere Reihe) oder wurden 60 min lang mit PKC $\zeta$  ps (30  $\mu$ M) preinkubiert (untere Reihe). Nach der Stimulierung mit HKSA wurden die Lysate jedes Zeitpunktes (50  $\mu$ g) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. I $\kappa$ B $\alpha$  wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. (B) Um die Transaktivierung von p65 zu analysieren, wurden 293-TLR2 Zellen nach Transfektion mit der Reporterkombination pFR-Luc und pGAL4-p65 entweder mit einem Kontrollvektor oder den angezeigten Konstrukten kotransfiziert bzw. 60 min lang mit PKC $\zeta$  ps (30  $\mu$ M) preinkubiert. Die Zellen blieben entweder unstimuliert (leere Balken) oder wurden 5 h lang mit HKSA (ausgefüllte Balken) stimuliert. Die Aktivität der Luziferase ist in Form der artifiziiellen Einheit RLU (relative luciferase units) ausgedrückt. (Alle Balken repräsentieren Mittelwerte von mindestens 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.)

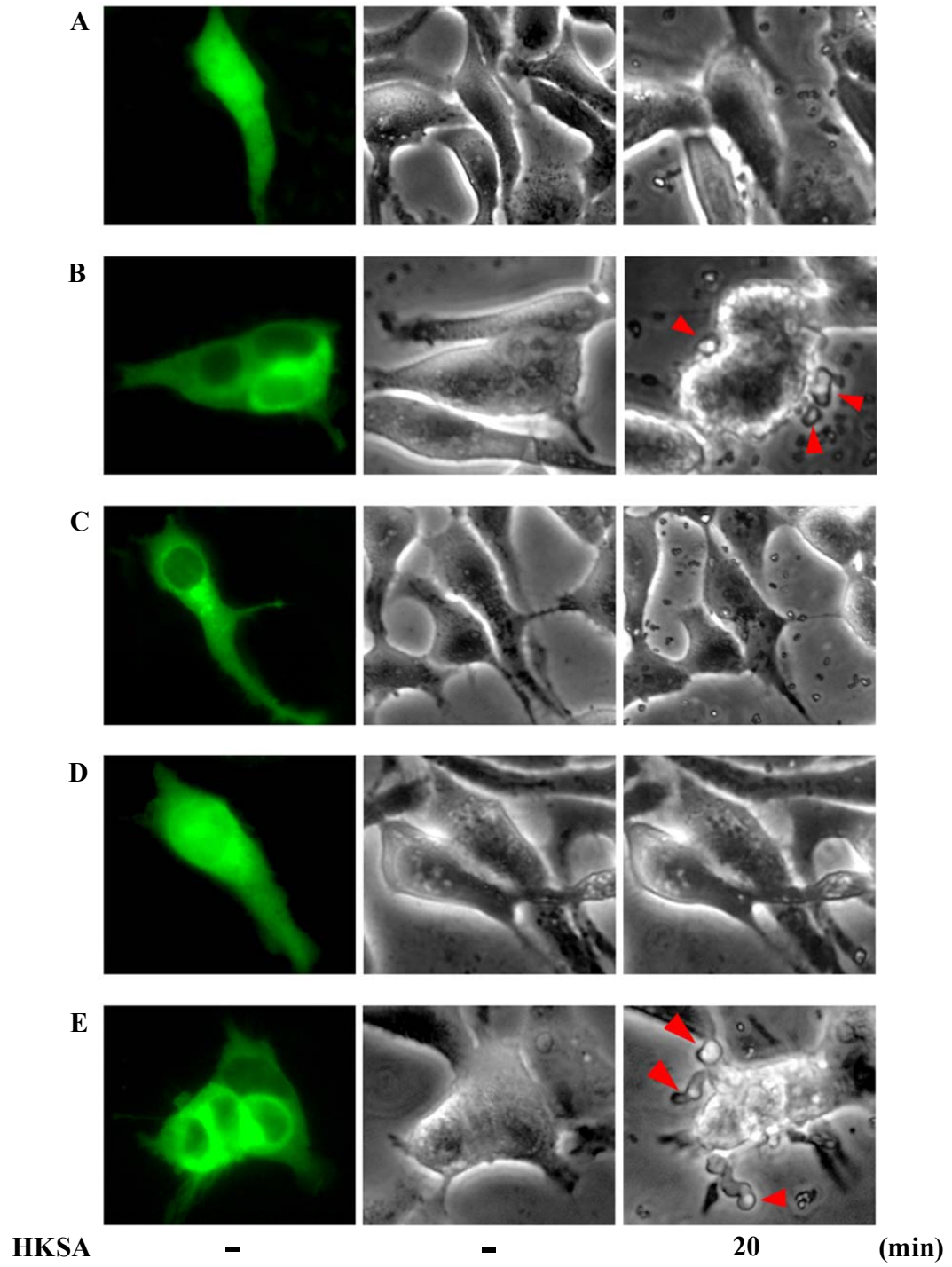
#### 4.2.5 RhoA kontrolliert das von TLR2 induzierte Membran-Blebbing

Ähnlich wie die anderen Mitglieder der Rho GTPasen Familie spielt RhoA eine zentrale, regulierende Rolle in der Reorganisation des Zytoskeletts (Hall, 1998). In diesem Zusammenhang auffallend war die Anhäufung von signifikanten morphologischen Veränderungen, wie Zellabrundung, Schrumpfungen sowie das Auftreten von dynamischen Membranausstülpungen (Membran-Blebbing) in 293-TLR2 Zellen, die mit geringen Mengen von Wildtyp RhoA (100 ng cDNA) transfiziert und anschließend stimuliert wurden. Auch bei Verwendung des löslichen Lipoproteins Malp-2 als TLR2 spezifischer Stimulus an Stelle der partikulären Suspension von hitze-inaktivierten *S. aureus* konnten vergleichbare phänotypische Veränderungen beobachtet werden. Die beschriebenen morphologischen Veränderungen beruhten auf der Stimulierung von TLR2 und traten nicht in unstimulierten, Rezeptor-exprimierenden Zellen auf. Um die Funktion von RhoA in der von TLR2 induzierten Zellkontraktion und dynamischen Bleb-Formation genauer aufzuklären, wurden geringe Mengen eines EGFP-kodierenden Expressionsvektors sowie entweder EGFP-RhoAwt oder dominant-negatives RhoA (EGFP-RhoAN19) in 293-TLR2 Zellen transfiziert. Um die im Zuge der bakteriellen Stimulierung auftretenden dynamischen, phänotypischen Veränderungen aufzuzeichnen, wurde mit Hilfe von Videomikroskopie über einen Zeitraum von 15-30 Minuten alle 60 Sekunden ein Bild aufgenommen. Die einzelnen Daten des Live-Cell-Imagings wurden schließlich zu Filmen digitalisiert und können in Kürze unter folgender Homepage abgerufen werden: <http://www.scripps.edu/imm/knaus/research.htm>.

Im Folgenden wurde von einigen der durchgeführten videomikroskopischen Experimente jeweils eine repräsentative, EGFP-exprimierende Zelle zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation ausgewählt und dargestellt (t = 0 bzw. 20 min) (Abb. 20). In 293-TLR2 Zellen, die mit EGFP-kodierendem Expressionsvektor transfiziert waren, konnten 20 min nach Stimulation mit HKSA keine dynamischen Membranausstülpungen (Membran-Blebbing) beobachtet werden. In einigen Zellen

konnten Kontraktionen festgestellt werden, die vermutlich auf Temperaturunterschiede und Kohlendioxidmangel im Kulturmedium während der fast halbstündigen Durchführung des Live-Cell-Imagings zurückzuführen sind (Abb. 20A). Auch die Expression von EGFP-gekoppeltem Rac1 induzierte keine stimulusabhängige Formation von Membran-Blebs (Daten nicht in der schriftlichen Form der Arbeit gezeigt, aber auf der zuvor angegebenen Web-Seite in Kürze als Film abrufbar). Im Gegensatz hierzu zeigten 293-TLR2 Zellen, die mit der Wildtypform von EGFP-gekoppeltem RhoA transfiziert waren, starke Kontraktionen und das Einsetzen von Zellabrunden bereits 5-10 Minuten nach Stimulation mit *S. aureus*. Das Zeitintervall dieser ersten signifikanten morphologischen Veränderungen stimmt interessanterweise genau mit dem für die Aktivierung von RhoA in diesen Zellen ermittelten Intervall überein (Abb. 13A). 12-15 Minuten nach Bakterienzugabe setzte in den mit EGFP-RhoA transfizierten Zellen dynamisches Membran-Blebbing ein (Abb. 20B). Die starke Kontraktion und die Membranausstülpungen basierten eindeutig auf der Stimulus induzierten Aktivität von RhoA, da die Expression von dominant-negativem EGFP-RhoA (RhoAN19) die beschriebenen morphologischen Effekte vollständig inhibierte (Abb. 20C).

Eine Verbindung zwischen RhoA und der Serine/Threonin Kinase ROCK im Bezug auf die Ausbildung von Membran Blebs konnte schon in PC12 und Neuroblastoma Zellen gezeigt werden (Mills et al., 1998, Hirose et al., 1998). Um beurteilen zu können, ob die durch HKSA induzierte Zellschrumpfung und Ausbildung von Membranausstülpungen auf der Aktivität von ROCK beruhten, wurden 293-TLR2 Zellen vor der Stimulation mit dem hoch spezifischen ROCK-Inhibitor Y27632 inkubiert (Ishizaki et al., 2000) (Abb. 20D). Die Inhibierung von ROCK verhinderte die Rho-abhängige Zellabrundung sowie das Auftreten von Membran-Blebbing in 293-TLR2 Zellen. Somit hängt die Formation der Blebs in 293-TLR2 Zellen von der bakteriell induzierten Aktivierung der Kinase ROCK ab. Andererseits konnte keine Involvierung von ROCK in der von TLR2 vermittelten NF- $\kappa$ B Aktivierung nachgewiesen werden





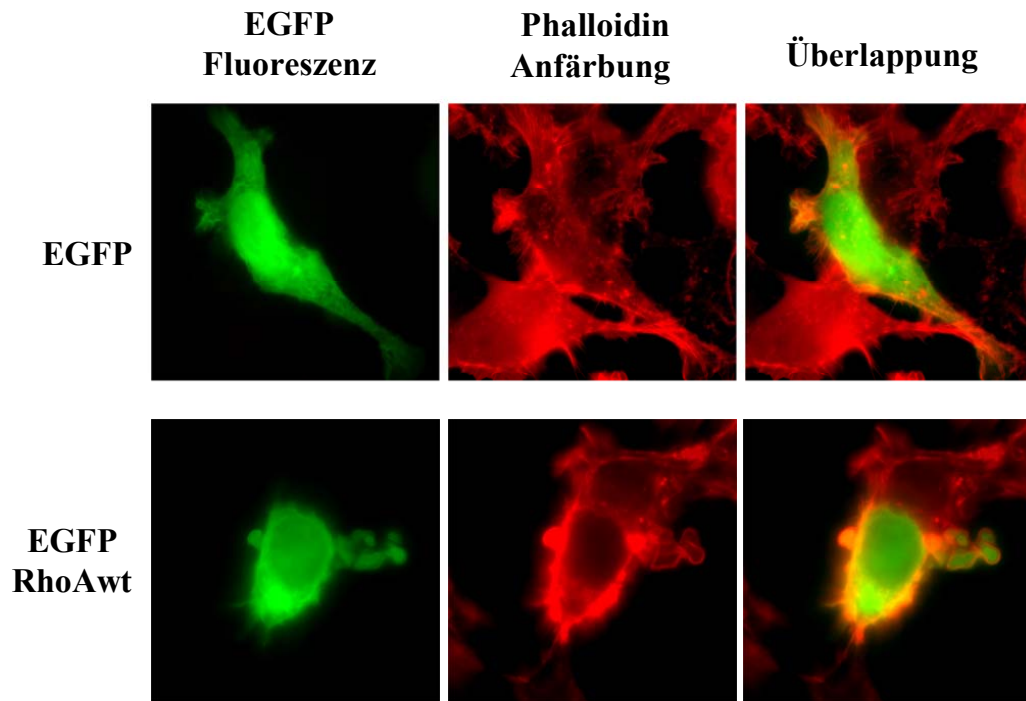
**Abb. 20: RhoA kontrolliert das von TLR2 induzierte apoptotische Membran-Blebbing mit Hilfe von ROCK**

293-TLR2 Zellen wurden entweder mit EGFP-kodierendem Expressionsvektor (A), EGFP-RhoAwt (B, D, E) oder EGFP-RhoAN19 (C) 20 h vor der Stimulation mit HKSA transfiziert. Außerdem blieben die Zellen entweder unbehandelt (A, B, C) oder wurden 30-60 min mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 (10  $\mu$ M) (D) oder dem PKC $\zeta$  Pseudosubstrat (30  $\mu$ M) vorinkubiert (E). Ab dem Zeitpunkt der Bakterienzugabe ( $t = 0$ ) wurde für einen Zeitraum von mindestens 20 min pro Versuchsansatz alle 60 s ein Bild aufgenommen. Von jedem Experiment wurde jeweils eine repräsentative, EGFP exprimierende Zelle zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ausgewählt und dargestellt ( $t = 0$  bzw. 20 min). Die linke Spalte zeigt das EGFP-Fluoreszenzbild der pro Versuchsansatz jeweils ausgesuchten Zelle zum Zeitpunkt der Stimulation ( $t = 0$ ). Die mittlere Spalte zeigt jeweils die gleiche Zelle zum Zeitpunkt der Stimulation im Phasenkontrast. In der rechten Spalte sind die Phasenkontrastbilder der Zellen 20 min nach der Stimulierung mit HKSA dargestellt. (Die roten Pfeile deuten auf Stimulus induzierte apoptotische Membran-Bleb. Mindestens zwei unabhängige Experimente wurden jeweils durchgeführt, aber die Bilder eines repräsentativen Experimentes wurden gezeigt.)

(Daten nicht gezeigt), was vermuten läßt, daß ROCK ausschließlich als Rho-Effektor in einer Signalkaskade agiert, die zu den beschriebenen morphologischen Veränderungen wie Membran-Blebbing führt. PKC $\zeta$ , die als potentiell Downstreamtarget von RhoA im p65 Transaktivierung-Signalweg identifiziert werden konnte (Abb. 17 - 19), ist dagegen nicht Bestandteil der Blebbing induzierenden Signalantwort. Tatsächlich verstärkt die Inhibierung von PKC $\zeta$  die Rho-abhängige Bleb Formation in geringem Ausmaß (Abb. 20E).

Drei Stunden nach der Stimulation mit HKSA zeigten 65-80% der EGFP-RhoAwt exprimierenden aber nur etwa 3% der mit EGFP-kodierendem Expressionsvektor transfizierten 293-TLR2 Zellen signifikantes Membran Blebbing. Um die Rho-abhängigen Veränderungen auf der Ebene des Zytoskelettes zu visualisieren, wurden die Zellen im Anschluß an die mehrstündige Stimulierungsperiode mit 4% Paraformaldehyd fixiert und die Aktinfilamente mit Phalloidin gefärbt (Abb. 21). Im Gegensatz zu den Kontrollzellen war in den stimulierten, EGFP-RhoAwt exprimierenden Zellen eine starke

Zellschrumpfung sowie die Ausbildung großer Membranausstülpungen deutlich erkennbar.



**Abb. 21: Die von RhoA regulierte Membran-Bleb Formation verläuft als kontrollierter Prozeß**

293-TLR2 Zellen wurden entweder mit EGFP-kodierendem Expressionvektor (obere Reihe) oder mit EGFP-RhoAwt (untere Reihe) 20 h lang transfiziert. Die Zellen wurden schließlich mit HKSA 3 h lang stimuliert, fixiert und mit Phalloidin gefärbt. Linke Spalte: EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen (grün). Mittlere Spalte: Phalloidinanfärbung (rot). Rechte Spalte: Überlappung beider Bilder.

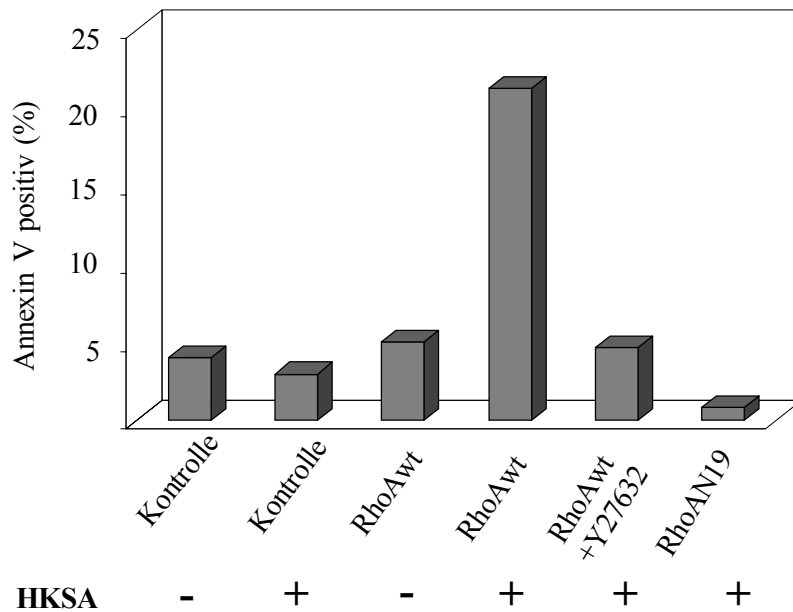
Die Anfärbung mit Phalloidin belegte, daß trotz der Rho-regulierten signifikanten Umorganisation des Zytoskelettes die Plasmamembran unzerstört blieb, was auch daran

erkennbar war, daß Zytoplasma nicht in die lokale Umgebung der Zelle ausgetreten war. Die gezeigten Daten weisen eindeutig daraufhin, daß es sich bei den von TLR2 induzierten Rho-abhängigen morphologischen Veränderungen um einen kontrollierten Vorgang handelt. So erinnert auch die Formation der Membran-Blebs an die Abschnürung sogenannter apoptotischer Körper (engl.: apoptotic bodies), die generell beim Eintreten von Apoptose in den betroffenen Zellen beobachtet werden kann.

#### ***4.2.6 Rho kontrolliert die früh-apoptischen Ereignisse durch ROCK***

Während der Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, durchlaufen die Zellen verschiedene strukturelle Veränderungen. Vor allem Störungen in der Plasmamembran, die einen Verlust der Asymmetrie in der Phospholipidschicht hervorrufen, sind charakteristisch für Zellen im früh-apoptischen Stadium (Cohen, 1993). Aminophospholipide wie beispielsweise Phosphatidylserin befinden sich in lebenden Zellen vorzugsweise an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Kommt es zur Apoptose, so relokalisieren diese Phosphatidylserinreste von der Innen- an die Außenseite der Plasmamembran. Die spezifische, hochaffine Bindung von Annexin V-Konjugaten an exponierte Phosphatidylserinreste erlaubt schließlich die Differenzierung zwischen apoptotischen (Annexin V-positiv) und nicht-apoptotischen Zellen (Annexin V-negativ). Um zu bestimmen, ob die beobachteten von TLR2 vermittelten morphologischen Veränderungen Bestandteil eines apoptotischen Prozesses sind, wurden 293-TLR2 Zellen entweder mit EGFP-kodierendem Vektor (Kontrolle) oder mit EGFP-RhoAwt bzw. EGFP-RhoAN19 transfiziert. Im Anschluß an die Stimulation mit HKSA wurden die Zellen mit einem Komplex aus Annexin V, das an Biotin gekoppelt war (Annexin V-Biotin), und Streptavidin-TriColor gelabelt und dann mit Hilfe eines FACS analysiert (Abb. 22). Nach einer Stimulationsperiode von 1h waren lediglich 3-5% der mit EGFP-

transfizierten Kontrollzellpopulation Annexin V-positiv. Die Annexinfärbung der Kontrollzellen war allerdings stimulusunabhängig und reflektierte vermutlich die



**Abb. 22: RhoA reguliert die von TLR2 induzierte apoptotische Annexinfärbung in 293-TLR2 Zellen**

FACS Analyse von 293-TLR2 Zellen: Die Zellen wurden entweder mit EGFP-kodierendem Expressionsvektor (Kontrolle) oder den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Zellen blieben weiterhin entweder unbehandelt oder wurden 30 min lang mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 (10  $\mu$ M) vorbehandelt. 293-TLR2 Zellen waren entweder unstimuliert (-) oder wurden 1 h lang mit HKSA inkubiert (+). Anschließend erfolgte eine Färbung mit Annexin V-Biotin und Streptavidin-TriColor und die Analyse am FACS. Die präsentierten Daten sind als Prozentsatz der Annexin V-positiven Zellen in der Population aller mit EGFP transfizierten Zellen ausgedrückt. Ein repräsentatives Experiment wurde jeweils dargestellt (n=2).

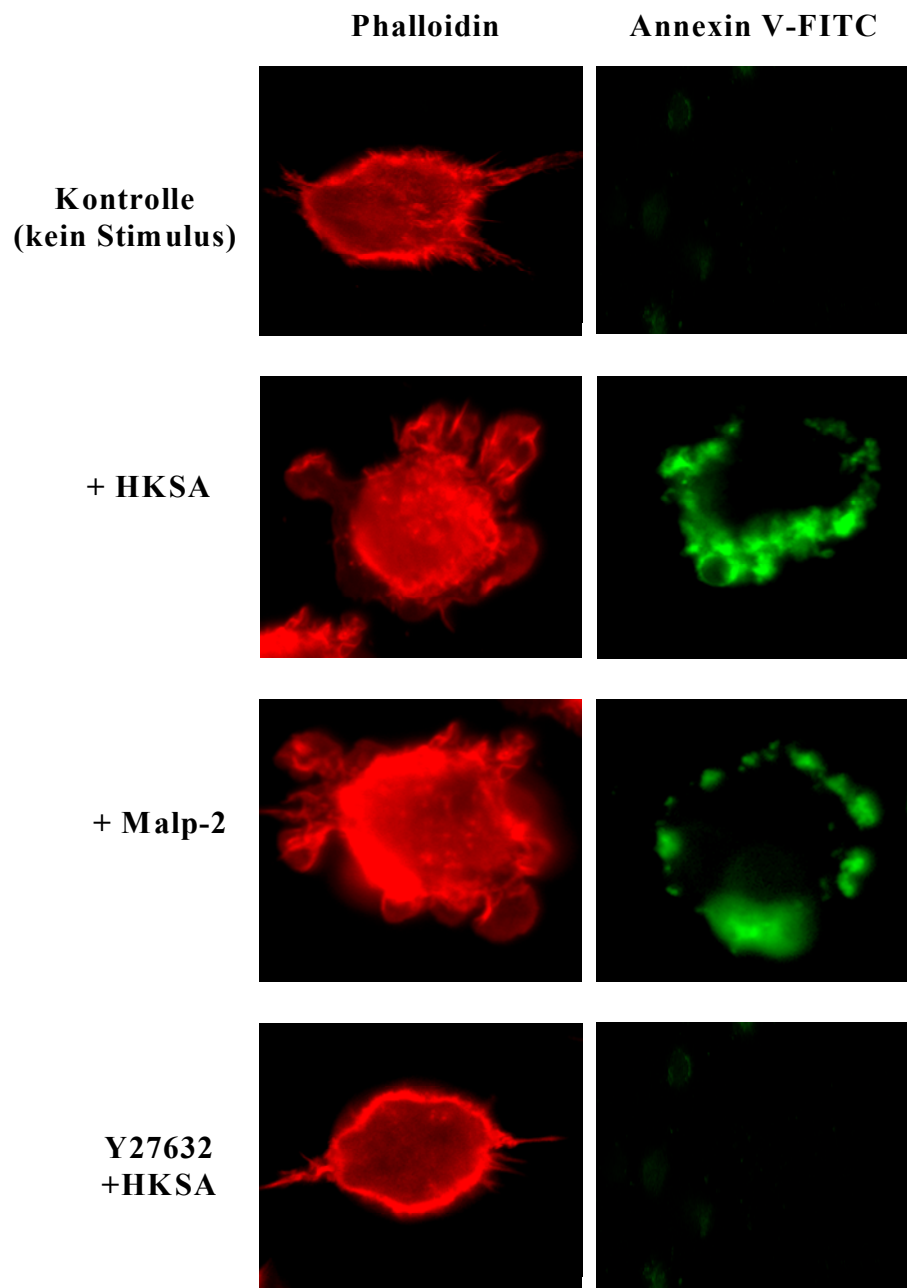
Hintergrundfärbung der eingesetzten Fluorophorkombination („Sandwich-Fluorophor“). Einen vergleichbaren Prozentsatz an Annexin-positiven Zellen wurde auch bei unstimulierten RhoA-exprimierenden Zellen detektiert. Wurden die mit RhoA

transfizierten Zellen dagegen bakteriell stimuliert, kam es zu einem 4-5 fachen Anstieg des Anteils an Annexin V-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellpopulation (Abb. 22). Zusätzliche mikroskopische Immunofluoreszenzstudien zeigten, daß zu einem späteren Zeitpunkt (nach 3-stündiger Stimulationsdauer) bereits 70-80% der RhoA-exprimierenden Zellen, aber nur weniger als 10% der Kontrollzellen als Annexin-positiv identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Durch Preinkubation mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 konnte der RhoA-abhängige Anstieg des Anteils an Annexin V-positiven Zellen eindeutig inhibiert werden (Abb. 22). Die Expression von dominant-negativem RhoA (RhoAN19) resultierte in einem Anteil an Annexin-positiven Zellen, der sich im Bereich der Hintergrundfärbung bewegte. Ähnlich wie das zuvor beschriebene Membran-Blebbing ist somit die Exponierung der Phosphatidylserinreste abhängig von der bakteriell induzierten Aktivität der Proteine RhoA und ROCK. Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die beobachteten dynamischen, morphologischen Veränderungen in 293-TLR2 Zellen Bestandteil eines apoptotischen Prozesses sind, der nach bakterieller Stimulation von TLR2 induziert und von der Signalkaskade RhoA → ROCK reguliert wird.

#### ***4.2.7 Apoptisches Membran-Blebbing in Monozyten benötigt ROCK and MLCK***

Die dargestellten Daten belegen, daß die Stimulation von TLR2 zwei unterschiedliche Signalwege initiiert: Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Induktion von früh-apoptotischem Membran-Blebbing. Allerdings muß in diesem Zusammenhang betont werden, daß die bisher beschriebenen TLR2-vermittelten und Rho-abhängigen morphologischen Veränderungen ausschließlich in epithelialen Zellen, die TLR2 stabil exprimierten, beobachtet wurden. Obwohl 293-TLR2 Zellen als leicht transfizierbare, adhärente Zellen im allgemeinen ein gutes Arbeitsmittel zum Studium der von TLR2 induzierten Signalkaskaden darstellen, sollte dennoch immer wieder berücksichtigt

werden, daß diese Zelllinie im Prinzip nur Modellstudien liefern kann. Aus diesem Grund war es wichtig zu untersuchen, ob der in den humanen monozytischen Zellen THP-1 natürlicherweise exprimierte Toll-ähnliche Rezeptor 2 vergleichbare apoptotische Ereignisse hervorruft. Unter Serumentzug gelang es erstmals, die Suspensionszellen an Glasoberflächen (Deckgläser) anzulagern. Wie mit Hilfe von Phalloidinanfärbungen festgestellt werden konnte, zeigen unstimulierte, nicht-preaktivierte THP-1 Zellen den für Monozyten bzw. Makrophagen typischen rundgeformten Phänotyp (Abb. 23). Eine 10-stündige Stimulation der Monozyten mit HKSA oder dem löslichen Lipoprotein Malp-2 verursachte jeweils drastische morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung und die Formation signifikanter Membran-Blebs. Mit Hilfe von RT-PCR konnte die endogene Expression mehrerer unterschiedlicher TLR Isoformen in THP-1 Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von zwei TLR2-spezifischen Stimuli weist aber deutlich daraufhin, daß die beobachteten Effekte auf der Stimulation von TLR2 beruhen. Eine Vorbehandlung der THP-1 Zellen mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 resultierte in der signifikanten Inhibierung des TLR2-vermittelten Membran-Blebbings, was darauf hindeutet, daß ROCK ähnlich wie in 293-TLR2 Zellen auch in die Ausbildung der Membran-Blebs in Monozyten involviert ist. Um zu beurteilen, ob es sich bei den phänotypischen Effekten um Apoptose handelt, wurden die Zellen in einem Parallelexperiment mit FITC-konjugiertem Annexin V inkubiert (Abb. 23). Sowohl die unstimulierten Kontrollzellen als auch die mit Y27632 vorbehandelten Zellen zeigten keine signifikante Annexin V-Färbung. Im Gegensatz hierzu wurden stimulierte THP-1 Zellen, die deutliches Membran-Blebbing zeigten, als Annexin V-positiv identifiziert. Interessanterweise stimmten die Annexin-positiven Regionen auf den einzelnen Zellen in hohem Maße mit den Bereichen, in denen Membranausstülpungen beobachtet werden konnten, überein (Abb. 23).

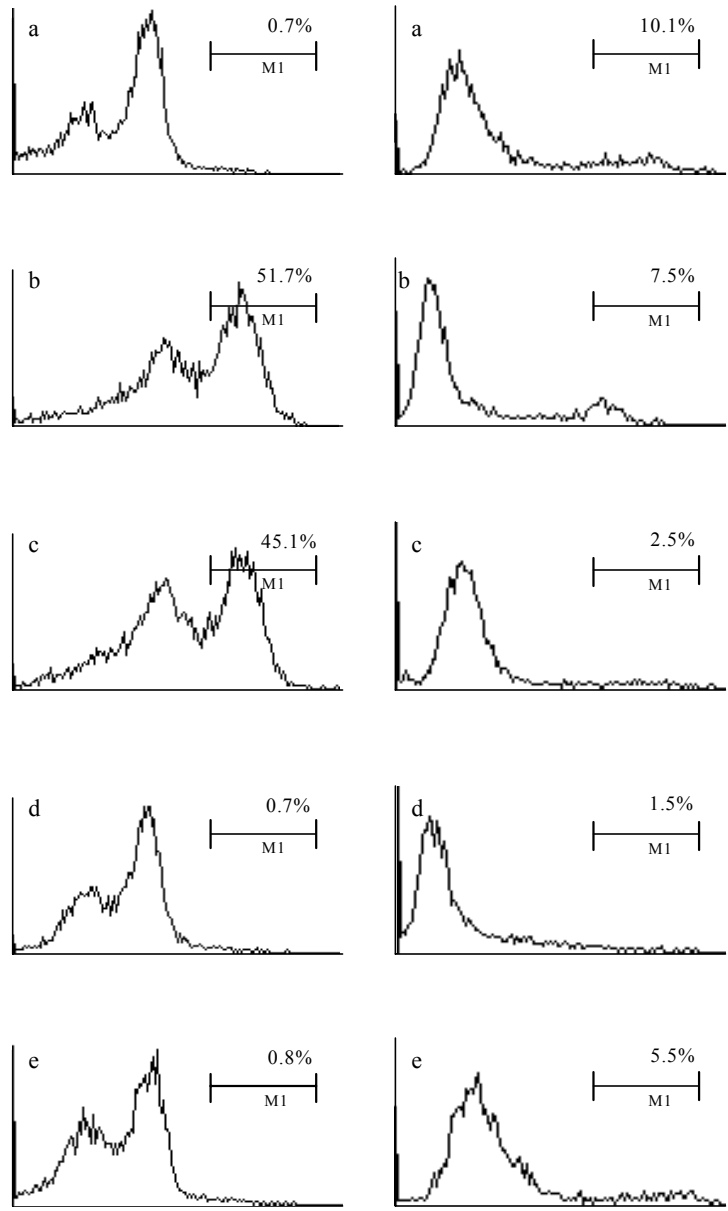


**Abb. 23: Gram-positive Stimuli induzieren apoptotisches Membran-Blebbing in Monozyten**

Immunofluoreszenz von THP1-CD14: THP-1 Zellen wurden auf Deckgläser gesät und einem 14-stündigen Serumentzug unterworfen. Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden 30 min lang mit Y27632 (10  $\mu$ M) vorinkubiert. Die anschließende 10-stündige Stimulierung erfolgte entweder mit HKSA oder dem löslichen Lipoprotein Malp-2. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Im Anschluß an die Stimulation wurden die Zellen fixiert und entweder mit Phalloidin oder Annexin V-FITC angefärbt. Linke Spalte: Phalloidinfärbung (rot). Rechte Spalte: Annexin V-färbung (grün). (Zwei unabhängige Experimente wurden jeweils durchgeführt, ein repräsentatives ist dargestellt.)

Zusätzlich zu den Immunofluoreszenzstudien wurden die stimulusinduzierten Membranstörungen der THP-1 Zellen mittels FACS untersucht (Abb. 24). Hierbei wurde eine Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) durchgeführt, um die Exposition von Phosphatidylserin in intakten Zellen zu detektieren. Generell gibt die Intensität der PI-Färbung Aufschluß über die Integrität der Plasmamembran und erlaubt so die Differenzierung zwischen nekrotischen und früh-apoptotischen Zellen innerhalb der Annexin V-positiven Zellpopulation. Nach der 10-stündigen Stimulation mit HKSA oder Malp-2 waren schätzungsweise jeweils 50% der Gesamtzellpopulation Annexin V-positiv (Abb. 24, b und c). Der relative Anteil an Zellen, der nach Stimulation mit PI gefärbt war, variierte zwischen 2-8% und unterschied sich nicht signifikant von dem Prozentsatz an PI-positiven Zellen innerhalb der unstimulierten Population. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen repräsentierten die Mehrheit der Annexin V-positiven Zellen somit früh-apoptotische und nicht nekrotische Zellen. Die Vorbehandlung der THP-1 Zellen mit Y27632 inhibierte die stimulusinduzierte Annexin V-Färbung nahezu vollständig (Abb. 24, d), was betont, daß ROCK auch in Monozyten in die apoptotischen Ereignisse involviert ist. Da die Phosphorylierung von MLC (engl.: myosin light chain) essentiell für die Ausbildung von dynamischen Membran-Blebs ist (Mills et al., 1998), wurde analysiert, ob die von TLR2 vermittelten morphologischen Veränderungen auf der Phosphorylierung von MLC beruhen.





Annexin V-FITC

Propidiumiodid

**Abb. 24: Die von TLR2 induzierte apoptotische Annexin V-Färbung wird in Monozyten von ROCK und MLCK kontrolliert**

FACS Analyse von THP1-CD14: Die Monozyten blieben entweder unbehandelt (a, b, c) oder wurden 30 min lang vorinkubiert mit Y27632 (10  $\mu$ M) (d) oder dem für MLCK spezifischen Inhibitor ML-7 (20  $\mu$ M) (e). Die Zellen waren entweder unstimuliert (a) oder wurden mit HKSA (b, d, e) bzw. Malp-2 (c) 10 h lang stimuliert. Im Anschluß wurden die Monozyten gleichzeitig mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid (PI) inkubiert. Linke Spalte: Annexin V-Färbung. Rechte Spalte: PI-Färbung. M1 repräsentiert den Prozentsatz an positiv gefärbten Zellen innerhalb der Gesamtzellpopulation. Die Färbung mit PI erlaubt eine Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen innerhalb der Annexin V-positiven Zellpopulation. (Zwei unabhängige Experimente wurden jeweils durchgeführt, ein repräsentatives ist dargestellt.)

Im allgemeinen wird MLC von MLCK (engl.: myosin light chain kinase) und/oder von ROCK phosphoryliert (Mills et al., 1998, Totsukawa et al., 2000, Amano et al., 2000). Die Aktivität von MLCK in Zellen kann mit dem spezifischen Inhibitor ML-7 blockiert werden. Die Vorbehandlung von THP-1 Zellen mit ML-7 führte zu einer Inhibierung der Phosphatidylserin-Exponierung, die auf eine Involvierung von MLCK und MLC in der von TLR2 initiierten strukturellen Membranveränderungen schließen läßt. Da die Stimulation von TLR2 durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  hervorruft, das durch Stimulierung von TNFR (Tumornekrosefaktor Rezeptor) den Zelltod in vielen verschiedenen Zelltypen induzieren kann, mußte eine Involvierung von TNF $\alpha$  in der beobachteten Apoptose ausgeschlossen werden. Hierzu wurde produziertes und von THP-1 Zellen freigesetztes TNF $\alpha$  mit einem spezifischen Antikörper abgeblockt. Da der Gebrauch dieses Antikörper keinen Effekt auf die Annexin V-Färbung in den Monozyten hatte (Daten nicht gezeigt), kann davon ausgegangen werden, daß die beschriebenen apoptotischen Ereignisse direkt durch eine von TLR2 induzierte Signalkaskade verursacht werden.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Die Rolle von Rac1 in der TLR2-induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung**

Humane Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) sind in der Lage, unterschiedlichste Bestandteile von Bakterien zu erkennen und somit die primäre Immunantwort einzuleiten. Obwohl die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die sich anschließende Produktion von proinflammatorischen Zytokinen für eine effiziente primäre Immunität grundlegend sind, besteht immer noch weitgehend Unklarheit bei den von TLRs initiierten intrazellulären Signalwegen. Aufgrund ihrer Homologie zum IL-1R (Interleukin-1 Rezeptor) wurde bisher angenommen, daß auch TLRs die Signalkaskade bestehend aus MyD88, IRAK, TRAF6 und IKK, die zur Proteolyse des Inhibitors I $\kappa$ B und schließlich zur Freisetzung von NF- $\kappa$ B führt, aktivieren (O'Neill, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Daten weisen jedoch eindeutig daraufhin, daß bei der bakteriellen Stimulierung von TLR2 zusätzliche, für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B essentielle, Signalwege induziert werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die von TLR2 induzierte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Gentranskription einen parallelen Signalweg benötigt, der von Rac1, einem Mitglied der Ras Superfamilie der kleinen GTPasen, kontrolliert wird. Eine Funktion der Rho GTPasen in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde für die Agonisten TNF- $\alpha$  und Il-1 $\beta$  bereits zuvor beschrieben (Perona et al., 1997, Singh et al., 1999). Weiterhin konnte in Zelllinien, in denen aktives Rac1 die Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten induziert, die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B bei Überexpression von dominant-negativem Rac1 blockiert werden (Sulciner et al., 1996). In diesem Fall wurde davon ausgegangen, daß Rac die Phosphorylierung von I $\kappa$ B über einen redox-abhängigen Signalweg reguliert. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Daten demonstrieren allerdings, daß der von TLR2 aktivierte Rac1-abhängige Signalweg die Transkriptionsaktivität der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65/RelA gezielt reguliert, ohne die Degradierung von I $\kappa$ B zu beeinflussen.

Im Zuge der Stimulierung mit HKSA bindet Rac1 transient an den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Vav1 in THP-1 Zellen. Der Zeitverlauf der Komplexbildung der beiden Proteine stimmt dabei sehr gut mit der für die Aktivierung von Rac1 ermittelten Zeitspanne überein. Die zur Tyrosinphosphorylierung von Vav und der darauffolgenden Aktivierung von Rac1 führenden Ereignisse sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Studien anderer Gruppen zeigten, daß vor allem Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Src- und Syk-Familie bei der *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierung von Vav eine entscheidende Rolle spielen (Bustelo, 2000). Eine Involvement dieser Kinasen in die Phosphorylierung und Aktivierung von Vav1 in Folge bakterieller Stimulation von THP-1 Zellen kann aufgrund der Verwendung spezifischer pharmakologischer Inhibitoren allerdings ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Einige Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität wie beispielsweise der EGF-R (engl.: epidermal growth factor receptor) oder der NGF-Rezeptor Trk (engl.: tyrosine receptor kinase) können im autophosphorylierten Zustand mit Vav direkt assoziieren und den Austauschfaktor so vermutlich auch phosphorylieren (Bustelo, 2000). Da der Toll-ähnliche Rezeptor 2 keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzt, ist es wahrscheinlich, daß die TLR2-induzierte Vav Phosphorylierung von einer aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinase vollzogen wird. An der Identifizierung dieser Rezeptor-Tyrosinkinase wird derzeit gearbeitet, und sie bleibt so im Rahmen dieser Arbeit noch ungeklärt.

Neben Rac1 ist auch die Aktivität von PI-3K für die von TLR2 vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B essentiell. Tatsächlich erfolgt die Stimulus-induzierte Aktivierung von Rac1 unabhängig von der Aktivität der Kinase, so daß PI-3K als Downstreamtarget von Rac1 in der zur NF- $\kappa$ B Aktivierung führenden Signalkaskade identifiziert werden konnte. Die biochemisch aktive GTP-gebundene Form von Rac1 kann direkt an die regulatorische Untereinheit p85 binden und so die Aktivität der PI-3K erhöhen (Zheng et al., 1994; Bokoch et al., 1996). Eine Involvement von PI-3K in der bakteriell induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung wurde schon aufgrund früherer Studien

vermutet (Reddy et al., 1997; Sizemore et al., 1999). In diesen Fällen war die Kinase entweder in die Regulation der nukleären Translokation und des DNA-Bindevermögens von NF- $\kappa$ B oder in die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors involviert. Die Funktion der PI-3K variiert vermutlich in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Zelltyp und eingesetzten Stimulus. Denn in der bakteriell induzierten, TLR2-vermittelten Signalantwort reguliert PI-3K durch direkte Beeinflussung der Aktivität von p65 ausschließlich die Transaktivierung von NF- $\kappa$ B.

Kürzlich wurde ein Signalweg gefunden, der das Transaktivierungspotential von p65 spezifisch erhöht, sobald die Transkriptionsuntereinheit an ihre Konsensussequenz bindet (Sizemore et al., 1999; Jefferies & O'Neill, 2000). Die Phosphorylierung von p65, die die Interaktion mit den Koaktivatorproteinen p300 und CBP ermöglicht, nimmt dabei eine Schlüsselfunktion ein. Ob die im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Rac1  $\rightarrow$  PI-3K Kaskade die Transkriptionsaktivität von p65 mittels Phosphorylierung kontrolliert, ist noch nicht vollständig geklärt. Vorläufige Daten (nicht gezeigt) deuten aber daraufhin. Abschließend soll noch einmal hervorgehoben werden, daß es sich bei der postulierten Rac1-abhängigen Signalkaskade nicht um eine Alternative zur herkömmlichen MyD88  $\rightarrow$  IKK Kaskade handelt. Vielmehr deuten die ermittelten Daten daraufhin, daß beide von TLR2 induzierten Signaltransduktionswege nur durch Kooperation eine effiziente NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription ermöglichen.

## ***5.2 Die Bedeutung der RhoA $\rightarrow$ PKC $\zeta$ Kaskade für die NF- $\kappa$ B Aktivierung***

Genau wie Rac1 ist auch die GTPase RhoA an der bakteriell induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß RhoA ebenfalls eine Signalkaskade kontrolliert, die ausschließlich die Transaktivierung von NF- $\kappa$ B reguliert, ohne die Degradierung des zytoplasmatischen Inhibitors I $\kappa$ B zu beeinflussen.

Allerdings fungierte RhoA weder als Aktivator noch als Effektor für Rac1 in der TLR2-vermittelten Signaltransduktionskaskade zu NF- $\kappa$ B. Die Stimulus-induzierte Aktivierung von Rho erfolgte außerdem unabhängig von PI-3 Kinase, was demonstriert, daß RhoA die nukleäre Transaktivierung von p65 unabhängig von der dargestellten Rac1  $\rightarrow$  PI-3K Signalkaskade kontrolliert.

Wie bereits erwähnt, wird vermutet, daß die Phosphorylierung von p65 die Transkriptionsaktivität und die Interaktion mit spezifischen Enhancer-Elementen verstärkt (Sizemore et al., 1999). Zu den potentiellen Kinasen, die in die p65 Phosphorylierung involviert sind, gehören die GSK-3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase 3beta) (Hoeflich et al., 2000), die MAPKs (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) p38, p42 and p44 (Van der Berghe et al., 1998), Akt (Sizemore et al., 1999) und die atypische PKC Isoform  $\zeta$  (Leitges et al., 2001). Innerhalb dieser Gruppe von Kinasen ist jedoch bisher nur für PKC $\zeta$  eine direkte Interaktion mit p65 gezeigt worden. So phosphorylierte die atypische PKC Isoform die Transkriptionsuntereinheit p65 in embryonischen Fibroblasten, die mit unterschiedlichen Zytokinen inkubiert wurden. Die von PKC $\zeta$ -defizienten Mäusen gewonnenen Fibroblasten zeigten dagegen eine signifikant reduzierte  $\kappa$ B-abhängige Transkriptionsaktivität nach Zytokinstimulierung, ohne Defekte bei der I $\kappa$ B Degradierung oder der nukleären Translokation von NF- $\kappa$ B aufzuweisen (Leitges et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine transiente Assoziation von PKC $\zeta$  mit RhoA bei TLR2 Stimulierung mit Gram-positiven Bakterien gefunden werden. Der Proteinkomplex ist eindeutig stimulusabhängig und zerfällt, sobald Rho deaktiviert wird. Darüberhinaus ist auch PKC $\zeta$  in die gezielte Regulation der Transkriptionsaktivität von p65 involviert, so daß die Kinase als potentielles Downstreamtarget in einer von RhoA kontrollierten Signalkaskade angenommen wird. Aktuelle Studien belegen, daß innerhalb der PKC Familie nur die Gruppe der atypischen PKCs selektiv an das „Scaffold Protein“ p62 bindet (Sanz et al. 1999, Sanz et al., 2000). Die direkte Interaktion zwischen p62 und dem Adapterprotein TRAF6, das eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion von IL-1R and TLR2 spielt, bildet vermutlich die Grundlage für die Involvierung der atypischen PKCs in verschiedene

NF- $\kappa$ B Aktivierungskaskaden. Möglicherweise kann so der von TLR2 initiierte Rho-abhängige Signalweg mit der MyD88  $\rightarrow$  IKK Kaskade kooperieren und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B entsprechend effizient regulieren.

### ***5.3 Die Bedeutung der RhoA $\rightarrow$ ROCK Kaskade für die bakteriell induzierte Apoptose***

Die Mitglieder der Familie der Rho GTPasen sind aufgrund ihrer Fähigkeit, sowohl auf die Gentranskription als auch auf das Aktin-Zytoskelett einwirken zu können, in der Lage, eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen miteinander zu koordinieren. So wurde eine Beteiligung von RhoA an der Ausbildung von Streßfasern und apoptotischen Membranveränderungen (Membran-Blebbing) in unterschiedlichen Zellsystemen beschrieben (Donovan et al., 1997, Subauste et al., 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Daten zeigen, daß RhoA nicht nur zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B unter Beteiligung von PKC $\zeta$  benötigt wird, sondern auch in das von TLR2 induzierte apoptotische Membran-Blebbing involviert ist. Der ROCK-Inhibitor Y27632 blockierte die stimulusabhängige Bleb-Formation in 293-TLR2 and in THP-1 Zellen, so daß eine Beteiligung des prominenten RhoA-Effektors ROCK an den beobachteten früh-apoptotischen Membranstörungen in beiden Zelllinien angenommen werden kann. Durch Phosphorylierung von Downstreamtargets kann aktives ROCK vermehrte Zellkontraktilität, die Ausbildung von Membran-Blebs und schließlich die Abschnürung von apoptotischen Körpern hervorrufen. Vor allem die Phosphorylierung von MLC (engl.: myosin light chain), die von MLCK (MLC-Kinase) vollzogen wird, ist für die Ausbildung von dynamischen Membran-Blebs essentiell (Mills et al., 1998). ROCK kann entweder durch Aktivierung von MLCK (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996) direkt oder durch Inaktivierung von MLC Phosphatase (Totsukawa et al., 2000) indirekt zur

Phosphorylierung von MLC beitragen. Hier konnte gezeigt werden, daß die Inhibierung von MLCK mit dem selektiven Inhibitor ML-7 die apoptotischen Membranveränderungen in THP-1 Zellen blockierte.

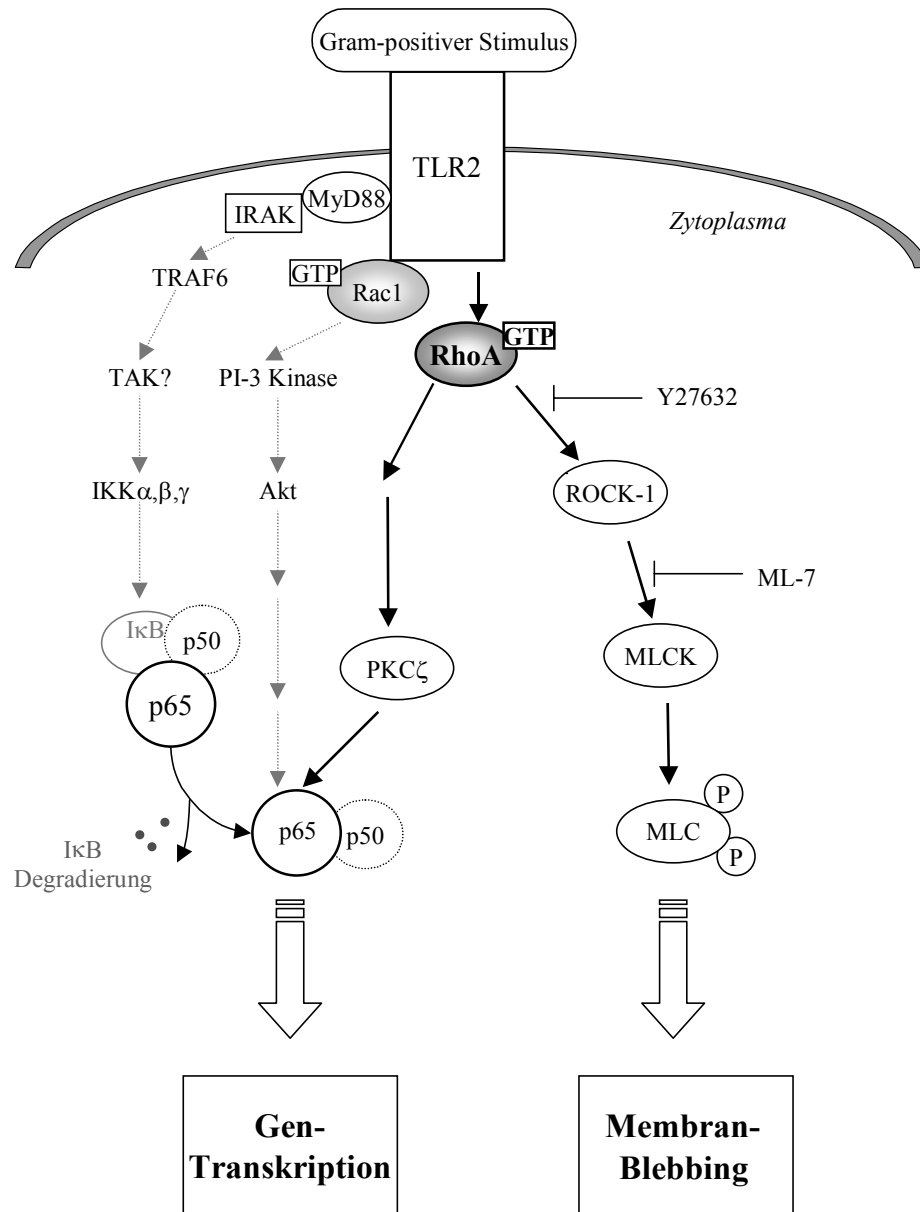
Während die Schlüsselstellung von ROCK bei der Formation von Membran-Blebs allgemein akzeptiert ist, wird die Aktivierung der Kinase und ihre Funktion für die Externalisierung der Phosphatidylserinreste kontrovers diskutiert. Zwei erst kürzlich erschienene Studien zeigten, daß ROCK-1 in der Anfangsphase der Apoptose von Caspase-3 am C-Terminus gespalten und so unabhängig von RhoA konstitutiv aktiviert wird (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). Andere Untersuchungen dagegen belegten, daß Rho ROCK in PC12 Zellen aktiviert und somit apoptotisches Membran-Blebbing induziert wird (Mills et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte im betrachteten früh-apoptotischen Stadium (bis zu 3 Stunden nach Stimulierung in 293-TLR2 Zellen und bis zu 10 Stunden nach Stimulierung in Monozyten) keine durch Caspasen induzierte Spaltung von ROCK-1 beobachtet werden. Die Spaltung von ROCK wurde mittels Immunoblotting von Zellysaten, die von unbehandelten und bakteriell stimulierten Zellen erhalten wurden, überprüft (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war die Tatsache, daß Membran-Blebbing in 293-TLR2 Zellen durch Transfektion von dominant-negativem RhoA inhibiert wurde. Vergleichbare Experimente waren in THP-1 Zellen aufgrund der moderaten Transfektionseffizienz schwer durchführbar. Anstelle einer Transfektion mit dominant-negativen Konstrukten wurden die Monozyten deshalb mit dem zellwandpermeablen Tat-C3 Protein inkubiert. Das C3 Protein ist ein Toxin, das RhoA in der Effektorregion ADP-ribosyliert und so die Beeinflussung des Zytoskelettes durch Rho unterbindet. Die zweistündige Vorinkubation miteingeschlossen dauerte die Gesamtinkubationszeit des Toxins etwa 12 Stunden, was die Fähigkeit zur Adhärenz der THP-1 Zellen erheblich beeinträchtigte (Daten nicht gezeigt). Mikroskopische Immunfluoreszenzstudien demonstrierten, daß von den ca. 20% übrig gebliebenen adhärenen Zellen keine einzige apoptotische Membran-Blebs aufwies, sondern die für eine Inhibierung von RhoA charakteristischen „spinnenartigen“



Ausläufer zeigte (Sebbagh et al., 2001). Zusammenfassend ergeben die präsentierten Daten ein detailliertes Bild von einer Signalkaskade bestehend aus RhoA, ROCK und MLCK, die nach bakterieller Stimulierung von TLR2 apoptotisches Membran-Blebbing induziert. Die Inhibierung von RhoA, ROCK und MLCK blockierte außerdem die Externalisierung von Phosphatidylserinresten, so daß eine biochemische Verbindung zwischen der Bleb Formation und Störungen in der Asymmetrie der Phospholipidschicht der Plasmamembran angenommen wird. Die Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid belegte, daß es sich bei nahezu allen Annexin-positiven Zellen um früh-apoptotische Zellen handelte. Die Stimulierung von TLR2 mit Gram-positiven Bakterien in Monozyten und epithelialen Zellen führt demnach in erster Linie zu Apoptose und nicht zu Nekrose. Der Eintritt von Nekrose an sich löst bereits eine Immunantwort aus und hätte so während einer bakteriellen Infektion ein Fortschreiten des Entzündungsprozesses zur Folge.

#### ***5.4 RhoA als Knotenpunkt in der dualen Signaltransduktion von TLR2***

Jüngste Studien belegen, daß TLR2 zwei unterschiedliche, entweder parallel verlaufende oder nacheinander geschaltete Signalwege initiiert, wobei einer in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B resultiert und der zweite Apoptose einleitet (Aliprantis et al., 1999, Aliprantis et al., 2000). Entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten divergiert das von TLR2 ausgehende Signal auf der Ebene der kleinen GTPase RhoA, die als Schlüsselfigur im Zuge bakterieller Stimulation zwei unterschiedliche Signalwege reguliert: NF- $\kappa$ B Aktivierung und früh-apoptotisches Membran-Blebbing (Abb. 25). Diese Hypothese wird vor allem von der Tatsache gestärkt, daß direkte Downstreamtargets von Rho jeweils nur in einen der beiden Signalwege involviert sind: Die Aktivität von ROCK wird nicht zur



**Abb. 25: Schematisches Modell zur Beschreibung der Schlüsselfunktion von RhoA in der Signaltransduktion von TLR2**

Gram-positive Stimuli führen zur TLR2-vermittelten Aktivierung der GTPase RhoA, die daraufhin zwei unterschiedliche zelluläre Signalantworten auslöst. Einerseits ist RhoA durch Regulation der p65 Transaktivierung an der Produktion proinflammatorischer Zytokine beteiligt. Dieser Signalweg involviert PKC $\zeta$  und ist nicht Bestandteil der zur Aktivierung von p65 führenden Rac1-abhängigen Signalkaskade oder des MyD88  $\rightarrow$  IKK Signalweges, der in der Degradierung von I $\kappa$ B resultiert. Andererseits kontrolliert eine zweite RhoA-abhängige Kaskade bestehend aus dem Rho-Effektor ROCK und MLCK das von TLR2-vermittelte früh-apoptotische Membran-Blebbing.

TLR2-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B benötigt, ist andererseits aber essentiell für die Ausbildung von Membran-Blebs, so daß ROCK ausschließlich in der zur Apoptose führenden Kaskade als Rho-Effektor fungiert. PKC $\zeta$  konnte dagegen zwar als potentielles Downstreamtarget von Rho im p65-Transaktivierungssignalweg identifiziert werden, beeinflusste das Rho-abhängige Membran-Blebbing jedoch nicht.

Wahrscheinlich initiiert TLR2 die NF- $\kappa$ B Aktivierung und die apoptotische Signalantwort nicht gleichzeitig, sondern nacheinander geschaltet. I $\kappa$ B $\alpha$  degradiert bereits innerhalb von 10-15 Minuten in THP-1 und nach etwa 30-40 Minuten in bakteriell stimulierten 293-TLR2 Zellen. Dagegen war das von TLR2 vermittelte Membran-Blebbing in THP-1 Zellen erst 9-10 Stunden nach Stimulation signifikant erkennbar. In 293-TLR2 Zellen, die nicht mit RhoAwt transfiziert wurden, induzierte die Inkubation mit bakteriellem Lipoprotein den Zelltod sogar erst nach ca. 50 Stunden (Aliprantis et al., 1999). Es ist wichtig, hierbei herauszustellen, daß der endogene Rho Gehalt in 293-TLR2 Zellen vergleichsweise niedrig ist. Durch Supplementierung der Zellen mit mehr RhoA (Transfektion von RhoAwt) wird der Eintritt der Apoptose um das 40-Fache beschleunigt, ist aber immer noch vollkommen stimulationsabhängig. Diese Beobachtungen lassen insgesamt darauf schließen, daß unter physiologischen Bedingungen die von TLR2

induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B dem Einsetzen der früh-apoptotischen Signalantwort zeitlich vorgeschaltet ist.

Die Kontrolle zweier zeitlich verschobener und funktionell gegensätzlicher Signalantworten durch denselben Rezeptor erscheint zunächst fragwürdig und spekulativ. Tatsächlich ist diese Dualfunktion aber nicht nur für TLR2, sondern auch für TNFR1 (Tumornekrosefaktor Rezeptor) und den Imd Signalweg (engl.: Immune deficiency) in *Drosophila* beschrieben worden (Hoffmann & Reichhart, 2002). Besonders zwischen den in Säugetieren vorkommenden Rezeptoren TLR2 und TNFR1 ist eine große Homologie erkennbar: Beide Rezeptoren rekrutieren Adaptormoleküle, die eine „Death domain“ besitzen (MyD88, TRADD). Diese Adaptern können über FADD die Verbindung zu Caspasen schaffen und bei Überexpression Apoptose sogar stimulusunabhängig induzieren. Neben der Induktion von Apoptose sind die erwähnten Rezeptoren auch in der Lage, NF- $\kappa$ B zu aktivieren. Tatsächlich stellt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B einen Hauptregulationspunkt zwischen Überlebenssignalen und apoptotischen Signalantworten dar (Karin & Lin, 2002). NF- $\kappa$ B induziert die Transkription zahlreicher Gene, deren Produkte Apoptose inhibieren können. Seine anti-apoptotische Aktivität kann dagegen in vielerlei Hinsicht wieder aufgehoben werden. So unterbindet beispielsweise eine von Caspasen vermittelte Abspaltung der IKK-Phosphorylierungsstellen die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  und damit die Freisetzung von NF- $\kappa$ B. In THP-1 Zellen korrelierte interessanterweise der für die I $\kappa$ B $\alpha$  Spaltung gefundene Zeitpunkt sehr genau mit dem Eintreten der früh-apoptotischen Membranveränderungen (Daten nicht gezeigt), was belegt, daß beide von TLR2-induzierten Signalkaskaden zeitlich genau aufeinander abgestimmt verlaufen. Neben der Caspase-bedingten Zersetzung von I $\kappa$ B $\alpha$  kann auch die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 bei Eintritt von Apoptose gespalten werden, so daß ein Protein entsteht, das zwar an DNA bindet, aber keine Transkription mehr vollziehen kann (Levkau et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der anti- und pro-apoptotische Effekt von TLR2 auf der Aktivität der GTPase RhoA beruht und

vollkommen stimulusabhängig ist. Auch in die Signaltransduktion von TNFR scheint RhoA involviert zu sein. Allerdings ist hier die zelluläre Funktion der kleinen GTPase noch unklar. Allgemein kann man vermuten, daß entweder beide Rezeptoren bei Stimulierung gleiche intrazelluläre Signalwege aktivieren oder aber daß ein sogenannter „Feedback Loop“ zwischen TLR2 und TNFR1 besteht. Die letzte Möglichkeit kann durch Blockierung des bei der Aktivierung von TLR2 produzierten Zytokins TNF $\alpha$  mit einem spezifischen Antikörper in unserem Fall allerdings ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Theoretisch wäre es außerdem möglich, daß die von TLR2 induzierte Produktion anderer Zytokine, Chemokine oder Peptidmediatoren spezifische „Death Receptors“ an der Zelloberfläche von Monozyten aktivieren. Entsprechend der Studien von Aliprantis und Mitarbeitern (1999; 2000), die die TLR2-induzierte Apoptose auch in Gegenwart eines Translationsinhibitors feststellten, ist dies aber eher unwahrscheinlich.

### ***5.5 Die Bedeutung von Apoptose für die primäre Immunantwort***

Die rasche Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die daraus resultierende Produktion proinflammatorischer Zytokine bei der Invasion infektiöser Organismen bildet die Grundlage für eine effektive primäre Immunantwort. Ab einem gewissen Punkt wird diese Immunantwort jedoch terminiert und vom spezifischeren, adaptiven Immunsystem abgelöst. Apoptose ist eine Möglichkeit, die Immunantwort durch Eliminierung überflüssiger Zellen generell herunterzuregulieren (Mahidhara et al., 2000). So ist beispielsweise der programmierte Zelltod notwendig, um die durch Lymphozyten ausgelöste Immunantwort zu beenden und um autoreaktive Lymphozyten zu entfernen (Surh et al., 1994). Beim septischen Schock, einer pathologischen Dysregulation des Immunsystems, ist der Eintritt der Apoptose dagegen gestört. Die Lebenszeit der normalerweise kurzlebigen Neutrophilen ist während einer Sepsis aufgrund verzögerter

Apoptose verlängert und führt so zu einer Ausweitung des Entzündungsprozesses. Gleichzeitig zeigen epitheliale Zellen und Zellen der Epithelialschranken bei bakterieller Infektion vermehrt Apoptose, was in einer Gewebeerstörung lebenswichtiger Organe resultieren kann (Mahidhara et al., 2000). Insgesamt ist die von TLR2 induzierte Apoptose durch Kontrolle der Lebensdauer phagozytierender Zellen ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der primären Immunantwort bei bakteriellen Infektionen.

Es ist derzeit noch unklar, ob auch andere Mitglieder der TLR Familie eine Rho-abhängige duale Signalkapazität, die in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der Induktion von Apoptose resultiert, zeigen. Obwohl mehrere Studien vermuten lassen, daß auch eine Inkubation mit LPS zum Zelltod führen kann, sind die hierzu verantwortlichen Signaltransduktionswege noch vollkommen unklar. Möglicherweise repräsentiert aber die Induktion von Apoptose durch Toll-ähnliche Rezeptoren einen evolutionär konservierten Mechanismus des primären Immunsystems. Die Verknüpfung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Zytokinproduktion mit einer sich anschließenden apoptotischen Signalantwort auf der Ebene der kleinen GTPase RhoA stellt ein gutes Beispiel für die effiziente Regulation der primären Immunantwort dar und eröffnet gleichzeitig einen neuen Einblick in die Funktion von Toll Rezeptoren. Um die genaue mechanistische Grundlage der dualen Signalkapazität von TLR2 zu verstehen, wird es wichtig sein, die zeitlichen und räumlichen Dynamiken der RhoA Aktivierung genauer zu analysieren. Insgesamt kann die weitere Untersuchung der dargestellten Signalwege einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung neuer anti-inflammatorischer Strategien zur therapeutischen Behandlung der Pathophysiologie von Sepsis und chronischen Entzündungsprozessen im allgemeinen liefern.

## 6. Zusammenfassung

Aufgrund der großen Sequenzhomologie zum Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) wurde bisher angenommen, daß Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) und der IL-1R nach Stimulation ähnliche intrazelluläre Signalwege zur Einleitung der Immunantwort induzieren. Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Daten weisen jedoch eindeutig daraufhin, daß bei der bakteriellen Stimulierung von TLR2 zusätzliche Signalwege induziert werden, die von den Rho GTPasen Rac1 und RhoA kontrolliert werden.

Im Zuge der Stimulierung mit *S. aureus* wurde der Guaninnukleotid-Austauschfaktor Vav1 in der monozytischen Zelllinie THP-1 tyrosinphosphoryliert und somit biochemisch aktiviert. Der phosphorylierte Austauschfaktor assoziierte mit Rac1 in einem Zeitverlauf, der gut mit der für die Aktivierung von Rac1 ermittelten Zeitspanne übereinstimmte. Die Tyrosinphosphorylierung von Vav stellte eine essentielle Grundlage für die bakteriell induzierte, transiente Rac1 Aktivierung dar. Eine Inhibierung der Rac Aktivität blockierte die von TLR2 initiierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in 293-Zellen, die stabil mit TLR2 transfiziert waren (293-TLR2), ohne dabei die Degradierung des zytoplasmatischen Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  oder das DNA-Bindevermögen des Transkriptionsfaktors zu beeinflussen. Mit Hilfe des Reporterplasmides Gal4-p65 konnte nachgewiesen werden, daß Rac1 unter Beteiligung von Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K) die Transaktivierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 gezielt reguliert.

Ähnlich wie Rac1 wurde auch RhoA nach bakterieller Stimulation von TLR2 transient aktiviert. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß RhoA die TLR2-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B ebenfalls über die gezielte Kontrolle der Transkriptionsaktivität von p65 reguliert, ohne die I $\kappa$ B $\alpha$  Degradierung zu beeinflussen. Allerdings fungierte RhoA weder als Aktivator noch als Effektor für Rac1 in der TLR2-vermittelten Signaltransduktionskaskade zu NF- $\kappa$ B. Die stimulusabhängige Aktivierung von RhoA erfolgte außerdem unabhängig von PI-3 Kinase, was demonstriert, daß RhoA die nukleäre

Transaktivierung von p65 unabhängig von der dargestellten Rac1 → PI-3K Signalkaskade kontrolliert. Stattdessen konnte eine transiente Assoziation der atypischen PKC Isoform  $\zeta$  mit RhoA nach TLR2 Stimulierung mit Gram-positiven Bakterien gefunden werden. Darüberhinaus war auch PKC $\zeta$  in die Regulation der Transkriptionsaktivität von p65 involviert, ohne die RhoA Aktivierung zu beeinflussen, so daß die Kinase als potentielles Downstreamtarget in einer von RhoA kontrollierten Signalkaskade angenommen wird. Möglicherweise kooperieren der von TLR2 initiierte Rho-abhängige Signalweg und die Rac1 → PI-3K Signalkaskade mit der bisher beschriebenen MyD88 → IKK Kaskade, um die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die anschließende Produktion proinflammatorischer Zytokine nach bakterieller Stimulation entsprechend effizient zu regulieren.

Neben der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die im allgemeinen anti-apoptotisch wirkt, kann TLR2 auch pro-apoptotische Signale induzieren. Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Daten zeigen, daß RhoA nicht nur zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B unter Beteiligung von PKC $\zeta$  benötigt wird, sondern im Gegensatz zu Rac1 auch in das von TLR2 induzierte früh-apoptotische Membran-Blebbing involviert ist. Außerdem blockierte der ROCK-Inhibitor Y27632 und der MLCK-Inhibitor ML-7 die apoptotischen Membranveränderungen. Zusammenfassend ergeben die präsentierten Daten ein detailliertes Bild von einer Signalkaskade bestehend aus RhoA, ROCK und MLCK, die nach bakterieller Stimulierung von TLR2 apoptotisches Membran-Blebbing induziert. Die Inhibierung von RhoA, ROCK und MLCK blockierte auch die Externalisierung von Phosphatidylserinresten, so daß eine biochemische Verbindung zwischen der Bleb Formation und Störungen in der Asymmetrie der Phospholipidschicht der Plasmamembran angenommen wird.

Entsprechend der erhaltenen Daten divergiert somit das von TLR2 ausgehende Signal auf der Ebene der kleinen GTPase RhoA, die somit als Schlüsselfigur im Zuge bakterieller Stimulation zwei unterschiedliche Signalwege reguliert: NF- $\kappa$ B Aktivierung und früh-apoptotisches Membran-Blebbing. Diese Hypothese wurde vor allem von der Tatsache gestärkt, daß direkte Downstreamtargets von Rho jeweils nur in einen der beiden



Signalwege involviert waren: ROCK wird nicht zur TLR2-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B benötigt, ist andererseits aber essentiell für die Ausbildung von Membran-Blebs. PKC $\zeta$  konnte dagegen zwar als potentiell Downstreamtarget von Rho im p65-Transaktivierungssignalweg identifiziert werden, beeinflusste das Rho-abhängige Membran-Blebbing jedoch nicht.

Die gezeigten Daten lassen insgesamt darauf schließen, daß unter physiologischen Bedingungen die von TLR2 induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B dem Einsetzen der früh-apoptotischen Signalantwort zeitlich vorgeschaltet ist. Die apoptotische Signalantwort könnte demnach dazu dienen, die primäre Immunantwort zu terminieren. Möglicherweise repräsentiert die duale Signalantwort von Toll-ähnlichen Rezeptoren einen evolutionär konservierten Mechanismus des primären Immunsystems. Die Verknüpfung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Zytokinproduktion mit einer sich anschließenden apoptotischen Signalantwort auf der Ebene der kleinen GTPase RhoA stellt insgesamt ein gutes Beispiel für die effiziente Regulation der Immunantwort dar. Gleichzeitig eröffnen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten einen neuen Einblick in die Komplexität und Funktion von Toll-ähnlichen Rezeptoren.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe, K., Rossman, K. L., Lui, B., Ritola K. D., Chiang, D., Campbell, S. L., Burrridge, K., and Der, C. J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1 and RhoA. *J. Biol.Chem.* 275, 10141-10149
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675-680
- Aliprantis, A.O, Ruey-Bing, Y., Weiss, D.S., Godowsli, P., and Zychlinsky, A. (2000). The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J.* 19, 3325-3336
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739
- Amano M., Chihara K., Nakamura K., Kaneko T., Matsura Y., and Kaibuchi, K. (1999). The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates Rho-kinase activity. *J. Biol. Chem.* 274, 32418-32424
- Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res.* 261, 44-51.
- Arbibe, L., Mira, J.P., Teusch, N., Kline, L., Guha M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch, R.J., and Knaus, U.G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF- $\kappa$ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immun.* 1, 533-540
- Aspenström, P. (1999). Effectors for the RhoGTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 95-102
- Baeuerle, P.A. (1998). I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 95, 729-731
- Baldwin, A. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev. Immunol.* 14, 649-683
- Bernard, V., Bohl, B., and Bokoch, G. (1999). Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J. Biol. Chem.* 274, 13198-13204

- Bird, T.A., Schooley, K., Dower, S.K., Hagen, H., and Virca, G.D. (1997). Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B by interleukin 1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 32606-32612
- Bishop, A.L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348, 241-255.
- Bokoch, G.M., Vlahos, C.J., Wang, Y., Kanaus, U.G., and Traynor-Kaplan, A.E. (1996). Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. J.* 315, 775-779
- Bowie, A. & O'Neal, L. A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: Signal generators for proinflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508-514
- Brighthill, H.D. et al. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285, 732-736
- Bustelo, X. R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol. Cell. Biology* 20, 1461-1477
- Campos et al. (2001). Activation of Toll-like receptor 2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167, 416-423
- Carpenter, C.L., and Cantley, L.C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Biol.* 8, 153-156
- Chang, J.-H., Pratt, J.C., Sawasdikosol, S., Kapeller, R., and Burakoff, S.J. (1998). The small GTP-binding protein Rho potentiates AP-1 transcription in T cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4986-4993
- Cohen, J.J. (1993). Apoptosis. *Immunol. Today* 14, 126-130
- Coleman, M.L., Sahai E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK1. *Nat. Cell Biol.* 3, 339-345
- Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostroem, A. A., Gutkind, J. S. and Bustelo X. R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the Vav protooncogene product. *Nature* 385, 169-172
- Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D.R., and Simon, H.-U. (2002). Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat. Med.* 8, 61-67.

- Diaz-Meco, M.T., Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M.T., Alcamí, J., Payá, C.V., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J-L., and Moscat, J. (1993). A dominant negative protein kinase C  $\zeta$  subspecies blocks NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4770-4775
- Diaz-Meco, M.T., Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M.T., Alcamí, J., Payá, C.V., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J-L., and Moscat, J. (1993). A dominant negative protein kinase C  $\zeta$  subspecies blocks NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4770-4775
- Donovan, F.M., Pike, C.J., Cotman, C.W., and Cunningham, D.D. (1997). Thrombin induces apoptosis in cultered neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J. Neuroscience* *17*, 5316-5326
- Donovan, F.M., Pike, C.J., Cotman, C.W., and Cunningham, D.D. (1997). Thrombin induces apoptosis in cultered neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J. Neuroscience* *17*, 5316-5326
- Dreikhausen, U., Varga, G., Hofmann, F., Barth, H., Aktories, K., Resch, K., and Szamel, M. (2001). Regulation by rho family GTPases of IL-1 receptor induced signaling: C3-like chimeric toxin and Clostridium difficile toxin B inhibit signaling pathways involved in IL-2 gene expression. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1610-1619.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103
- Hemmi et al. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR-7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 196-200
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., and Takeda, K. et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745
- Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., and Narumiya, S. (1998). Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Cell Biol.* *141*, 1625-1636
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O. and Woodgett, J.R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* *406*, 86-90.

- Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.-M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* 3, 121-126.
- Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M., and Narumiya S. (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* 57, 976-983
- Jefferies, C.A, and O'Neill, L.A.J. (2000). Rac1 regulates interleukin 1-induced nuclear factor  $\kappa$ B activation in an inhibitory protein  $\kappa$ B-dependent manner by enhancing the ability of the p65 subunit to transactivate gene expression. *J. Biol. Chem.* 275, 3114-3120
- Jimenez et al. (1995). Induction of apoptosis in H1H3t3 cells after serum deprivation by overexpressing of rho-p21, a GTPase protein of the ras superfamily. *Oncogene* 10, 811-816
- Karin, M. and Lin, A. (2002). NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221-227.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621-663
- Katoh, H. et al. (1998). Constitutively  $\alpha$ 12, G  $\alpha$ 13 and G $\alpha$ q induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 28700-28707
- Kim, S.O., and Han, J. (2001). Pan-caspase inhibitor zVAD enhances cell death in RAW246.7 macrophages. *J. Endotoxin Res.* 7, 292-296
- Kim, S.O., Ono, K., and Han, J. (2001). Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L1095-L1105
- Kimura et al. (2000). Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 275, 17233-17236
- Lacal, J. C., and McCormick, F. (1993). *The ras Superfamily of GTPases*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 259-282
- Leitges, M., Sanz, L., Martin, P., Duran, A., Braun, U., García, Camacho, F., Diaz-Meco, M.T., Rennert, P.D., and Moscat, J. (2001). Targeted disruption of the  $\zeta$ PKC gene results in the impairment of the NF- $\kappa$ B pathway. *Molecular Cell* 8, 771-780

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorso-ventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983
- Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C.M., Ross, R., and Raines, E.W. (1999). Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF- $\kappa$ B-loop. *Nature Cell Biol.* 1, 227-233
- Mahidhara, R., and Billiar, T.R. (2000). Apoptosis in sepsis. *Crit. Care Med.* 28, N105-N113
- Medzhitov, R. and Janeway, C. Jr. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 8, 452-456
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397
- Medzhitov, R. & Janeway C. (2000) Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173, 89-97
- Mercurio, F. and Manning, A.M. (1999). Multiple signals converging on NF- $\kappa$ B. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 226-232
- Mills, J.C., Stone, N.L., Erhardt, J., and Pittman R.,N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* 140, 627-636
- Mira, J.P., Bernard, V., Groffen, J., Sanders, L.C., and Knaus, U.G. (2000). Endogenous hyperactive Rac3 controls proliferation in breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 185-189
- Moores, S. L., Selfors, L. M., Fredericks, J., Breit, T., Fujikawa, K., Alt, F. W., Brugge, J. S. and Swat W. (2000) Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors. *Mol. Cell. Biology* 20, 6364-6373
- Moores, S. L., Selfors, L. M., Fredericks, J., Breit, T., Fujikawa, K., Alt, F. W., Brugge, J. S., and Swat W. (2000). Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors. *Mol. Cell. Biology* 20, 6364-6373
- Mühlradt, P.F., Kieß, M., Meyer, H., Süßmuth, R., and Jung, G. (1997). Isolation, structure elucidation, and synthesis of a Macrophage Stimulatory Lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J. Exp. Med.* 185, 1951-1958

- Nobes, C. & Hall, A. (1994). Regulation and function of the Rho family of small GTPases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 77-81
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995). A downstream target of Rho1 small GTP-binding protein is Pkc1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the Map kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 5931-5938
- O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 44, RE1.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez, P.I., Bravo, R., and Lacal, J.C. (1997). Activation of the nuclear factor- $\kappa$ B by Rho, Cdc42 and Rac1 proteins. *Genes & Dev.* 11, 463-475
- Puls, A., Eliopoulos, A.G., Nobes, C.D., Bridges, T., Young, L.S., and Hall, A. (1999). Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell Sci.* 112, 2983-2992.
- Puls, A., Schmidt, S., Grawe, F. and Stabel, S. (1997). Interaction of protein kinase C $\zeta$  with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 6191-6196.
- Rawadi, G., Zugaza, J.L., Lemercier, B., Marvaud, J.C., Popoff, M., Bertoglio, J., and Roman-Roman, S. (1999). Involvement of small Rho-GTPases in *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins-mediated activation of macrophages. *J. Biol. Chem.* 274, 30794-30798
- Reddy, S.A.G., Huang, J.H., and Liao, W.S.-L. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 29167-29173
- Reid, T. et al. (1996). Rhotekin, a putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN and Rhophilin in the Rho binding domain. *J. Biol. Chem.* 271, 13556-13560
- Ren, X-D., Kiosses, W.B. & Schwartz, M.A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO Journal* 18, 578-585 response. *Nature* 406, 782-787
- Romero, F., and Fischer, S. (1996). Structure and function of Vav. *Cell Signal.* 8, 545-553

- Sanz, L., Diaz-Meco, M.T, Nakano, H., and Moscat, J. (2000). The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF- $\kappa$ B activation by the IL-1-Traf6 pathway. *EMBO J.* *19*, 1576-1586
- Sanz, L., Sanchez, P., Lallena, M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* *18*, 3044-3053
- Schiff, D.E. et al. (1997). Phagocytosis of Gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J. Leuko. Biol.* *62*, 786-794
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C.J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* *274*, 17406-17409
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., and Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK 1 induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* *3*, 346-352
- Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E.I., Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- $\kappa$ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* *80*, 321-330
- Singh, R., Wang, B., Shirvaikar, A., Khan, S., Kamat, S., Schelling, J.R., Konieczkowski, M., and Sedor, J.R. (1999). The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J. Clin. Invest.* *103*, 1561-1570
- Sizemore, N., Leung, S., and Stark, G.R. (1999). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF- $\kappa$ B p65/RelA subunit. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4798-4805
- Soh et al. (1999). *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1313-1324
- Subauste, M.C., Von Herrath, M., Benard, V., Chamberlain, C.E., Chuang, T.H., Chu, K., Bokoch, G.M., and Hahn, K.M.. (2000). Rho family proteins modulated rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J. Biol. Chem.* *275*, 9725-9733
- Sulciner, D.J., Irani, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Goldschmidt, C.P., and Finkel, T. (1996). Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 7115-7121
- Symons, M. and Settleman, J. (2000). Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol.* *10*, 415-419



- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y., and Matsumura, F. (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* *150*, 797-806.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 103-110
- Van Aelst, L., and D-Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* *11*, 2295-2322
- Van, A.D., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* *274*, 787-789
- Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Boone, E., De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Fiers, W., and Haegeman, G. (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor  $\kappa$ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* *273*, 3285-3290
- Werts, C., Tapping R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowsky, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* *2*, 346-352
- Wojciak-Stothard, B., Entwistle, A., Garg, R., and Ridley, A.J. (1998). Regulation of TNF- $\alpha$ -induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J. Cell Physiol.* *176*, 150-165.
- Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Neidigh, K.B.W., and Vandenplas, M.L. (2000). Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: Relationship to differentiation and survival in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4494-4504
- Yang, R.-B, Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W. I., Gurney A.L., and Godowski, P.J. (1998). Toll-like receptor 2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* *395*, 284-288
- Zheng, Y., Bagrodia, S., and Cerione, R.A. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J. Biol. Chem.* *269*, 18727-18730

**Abkürzungsverzeichnis**

β-Gal	β-Galaktosidase
293-TLR2 Zellen	Humane embryonale Nierenzellen, die stabil mit dem Toll-like receptor 2 transfiziert sind
aa	Amino acids
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	Dominant negativ
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)
FBS	Fötales bovines Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G418	Geneticin (Antibiotikum als Selektionsmarker)
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	Green-fluorescent protein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Hour(s)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethylsulfonsäure
HKSA	Heat-killed <i>Staphylococcus aureus</i>
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton

---

LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol/Liter (Konzentration)
MALP-2	2-kD großes Macrophagen-aktivierendes Lipopeptid
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
p65	Transkriptionsuntereinheit des Rel-Heterodimers
PAK	p21-activated kinase
PBD	p21-binding domain
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PH	Pleckstrin Homologie
PI-3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBD	RhoA binding domain
RLU	Relative luciferase units (artifizielle Einheit des Luziferase-Reporterassays)
ROCK	Rho-Kinase
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
THP-1 Zellen	Humane Monozyten (Zelllinie)
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Trk	Tyrosin-Rezeptorkinase (NGF-Rezeptor)
TSRI	The Scripps Research Institute
wt	Wildtyp

**Lebenslauf**

von Nicole Elisabeth Teusch, geb. am 25.05.1972 in Trier

29.05.1991	Abitur am Cusanus-Gymnasium in Wittlich; Note: 1.2
Nov. 1991 – Dez. 1998	Studium der Fächer Biologie (Diplom) und Chemie (Staatsexamen) an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
Okt. 1993	Zwischenprüfung in Chemie (Anorganische Chemie)
April 1994	Zwischenprüfung in Biologie (Botanik und Zoologie) Beide Prüfungen zusammen werden als Vordiplom im Fachbereich Biologie anerkannt. Gesamtnote des Vordiploms: 1.5
Mai 1997 – Juni 1998	Diplomarbeit in Biologie am Max-Planck-Institut für Chemie in Mainz unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Kesselmeier Thema: „Austausch des klimarelevanten Spurengases Carbonylsulfid (COS) zwischen Böden und Atmosphäre“ Note: 1.0
Nov. 1998	Auszeichnung der Diplomarbeit durch die Deutsche Shell AG
21.12.1998	Diplom-Hauptprüfung in Biologie in den Fächern Zoologie, Molekulargenetik, Physiologische Chemie, Botanik; Note: 1.0 Gesamturteil des Diploms: Mit Auszeichnung
April 1999 – Feb. 2000	Arbeiten zur Dissertation am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund
ab März 2000	Arbeiten zur Dissertation am Scripps Research Institute in La Jolla, USA unter der Anleitung von Prof. Dr. U. Knaus
ab August 1999	Doktorandenstipendium des Boehringer-Ingelheim Fonds