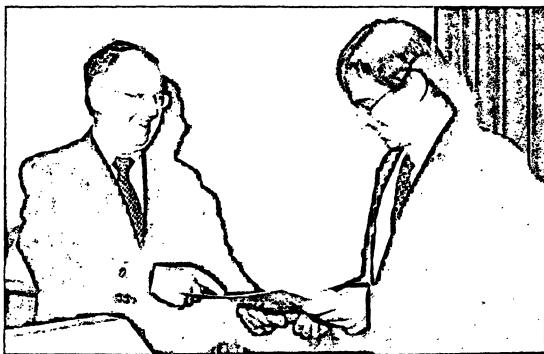


Der Hoppe-Seyler-Preis 2000 der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin wurde an Herrn Priv.-Doz. Dr. **Korbinian Brand**, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, verliehen. Die Auszeichnung wurde durch den Präsidenten der Gesellschaft, Herrn Prof. Dr. **Gerd Assmann**, im Rahmen des Kongresses für Laboratoriumsmedizin 2000 in Düsseldorf

überreicht. Der Preisträger beschäftigt sich mit der Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κB bei entzündlichen und malignen Prozessen, insbesondere IKK-Komplex-assozierter Signalübertragung bei diesen Vorgängen. Eine kurze Zusammenfassung seiner mit dem Preis ausgezeichneten Arbeiten findet sich im nachstehenden Artikel.

Dysregulation des NF-κB-Systems bei entzündlichen und malignen Prozessen - Bedeutung IKK-Komplex-assozierter Signalübertragung

Korbinian Brand



Prof. Dr. G. Assmann

Priv.-Doz. Dr. K. Brand

Transkriptionsfaktor NF-κB

NF-κB/Rel-Transkriptionsfaktoren sind zentral an der Regulation zahlreicher Gene bei entzündlichen und immunologischen Prozessen beteiligt und spielen außerdem bei Proliferation bzw. Apoptose eine wichtige Rolle [1, 2]. Eine Dysregulation des NF-κB-Systems wird sowohl bei entzündlichen als auch malignen Prozessen beobachtet. Der bisher am häufigsten identifizierte dimere NF-κB-Komplex besteht aus den Untereinheiten p50 und p65 (RelA) und wird durch Inhibitorproteine, z. B. IκB-α, -β oder -ε, im Zytosol neutralisiert. Daneben gibt es die NF-κB-Vorstufenproteine p105 und p100, die ebenfalls inhibitorische Funktionen übernehmen können. Die Aktivierung von NF-κB wird durch die Phosphomarkierung, Ubiquitinierung sowie Proteasom-vermittelte Proteolyse der IκB-Proteine initiiert [2, 3]. Dies erlaubt die Translokation des nun freigewordenen NF-κB-Dimers in den Zellkern, wo dieser Faktor an regulatorische κB-Promoter- und Enhancer-Elemente bindet und dadurch die Transkription zahlreicher Gene steuert.

Differentielle Aktivierung des IKK-Komplexes

Für die Phosphorylierung der IκB-Proteine an spezifischen Serinresten werden die vor kurzem identifizierten IκB-Kinasen IKK-α und IKK-β verantwortlich gemacht, die vermutlich in hetero- oder homodimerischer Form als Bestandteil hochmolekularer Komplexe im Zytosol auftreten [4, 5]. Diese Komplexe werden derzeit kollektiv als IκB-Kinase (IKK)-Komplex bezeichnet. Neueste Studien, in denen allerdings nur ein begrenztes Repertoire proinflammatorischer Substanzen verwendet wurde, lassen eine essentielle Rolle von IKK-β bei der Aktivierung des IKK-Komplexes vermuten [4-6]. Die Bedeutung von IKK-α ist bisher unklar, eine Beteiligung an spezifischen Signalwegen z. B. bei proliferativen Prozessen oder Differenzierungsvorgängen wird angenommen. Als weitere Komponente des IKK-Komplexes konnte das Adapterprotein IKK-γ nachgewiesen werden, dem regulatorische Funktionen zugeschrieben werden. Darüber hinaus wurden eine Reihe von assoziierten Kinase/Adapterproteinen entdeckt, z. B. NIK (NF-κB-induzierende Kinase), das als Bestandteil spezifischer IKK-Subkomplexe postuliert wird.

Gegenwärtig wird von uns der Effekt verschiedener Stimuli auf den endogenen IKK-Komplex sowie assoziierte Signalübertragungswege in Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen untersucht. Aktuelle Experimente unter Verwendung etablierter Stimuli wie Zytokine, bakterielle Produkte oder aktivierte Thrombozyten demonstrierten eine differentielle Aktivierung von IKK-α und -β, begleitet von charakteristischen Proteolyse-Mustern der Inhibitorproteine IκB-α, -β und -ε [6-9]. In Versuchsanordnungen mit dem Zytokin TNF als Stimulus beobachteten wir eine extrem schnelle Zunahme von IKK-Aktivität und gleichzeitig einen Abbau von IκB-α, -β und -ε [6]. Dagegen fanden wir nach Behandlung mit LPS, einem Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, sowie

aktivierten Thrombozyten und IL-1 β einen eher langsam ansteigende Kinaseaktivität [6, 9]. Interessanterweise zeigte sich, daß nach Stimulierung mit LPS sowie Phorbolester eine Aktivierung nur nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen IKK- β auftrat (was eine Aktivierung von ausschließlich IKK- β -enthaltenden Komplexen nahelegt) und damit verbunden ein Abbau von I κ B- α erfolgte [6]. Die Existenz entsprechender IKK- β /IKK- γ (aber nicht IKK- α -enthaltender Komplexe konnte von uns in monozytären Zellen nachgewiesen werden (K. Brand, unveröffentlichte Daten). Zu einem späteren Inkubationszeitpunkt wurde mit LPS zusätzlich ein zweiter Aktivitätsgipfel nach Präzipitation sowohl mit anti-IKK- β als auch anti-IKK- α gefunden, der in einem Abbau von I κ B- ϵ resultierte. Diese erneute Aktivitätszunahme war, wie Experimente mit Cycloheximid zeigten, nicht auf neu synthetisierte Proteine zurückzuführen. Im Gegensatz dazu deuten neueste Studien mit *Chlamydia pneumoniae* auf eine selektive Aktivierung ausschließlich IKK- α -enthaltender Komplexe hin [8]. Neben IKK- α , - β und - γ , den Bestandteilen des Kernkomplexes, konnte als zusätzliche Komponente endogener monozytärer IKK-Subkomplexe das Protein NIK identifiziert werden, das nicht in der Lage ist, I κ B direkt zu phosphorylieren und sich im Gegensatz zu den anderen IKK-Proteinen durch Detergenz vom Komplex abtrennen läßt [6]. Überexpressionsstudien deuten auf eine funktionelle Bedeutung von NIK bei selektiven Signalübertragungswegen hin [9].

Rolle von NF- κ B bei Entzündung und Malignität

In den letzten Jahren verdichten sich die Hinweise, daß eine Dysregulation des NF- κ B-Systems bei der Genese entzündlicher oder maligner Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt [2].

Ein Schwerpunkt unserer Untersuchungen liegt auf der Bedeutung von NF- κ B bei Arteriosklerose, einem chronisch entzündlichen Prozeß des arteriellen Gefäßsystems [1, 10-12]. Aktiviertes NF- κ B konnte *in situ* in der arteriosklerotischen Läsion z. B. in Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen nachgewiesen werden [10]. Eine Reihe von Aktivatoren bzw. Bedingungen sind in der Läsion zu finden, beispielsweise Zytokine wie TNF oder IL-1 β , minimal modifiziertes Low Density-Lipoprotein (LDL), aktivierte Thrombozyten, mikrobielle Produkte bzw. spezifische Adhäsionsprozesse, die *in vitro* in der Lage sind, das NF- κ B-System zu aktivieren [1, 8, 13-16]. Kürzlich durchgeführte Experimente zeigen charakteristische Muster der NF- κ B-Aktivierung in Kolokalisation mit *C. pneumoniae*-Antigenen in arteriosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten (K. Brand, unveröffentlichte Daten). Eine funktionelle Relevanz von NF- κ B wird sowohl bei frühen als auch späten Stadien der Arteriosklerose postuliert: Bereits an der Initialisierung und Amplifizierung des durch Gefäßschädigung entstehenden primären Signals sind NF- κ B-regulierte Zytokine und Chemokine beteiligt wie z. B. TNF, IL-1, IL-8 oder MCP-1 [1, 12-15]. Diese Mediatoren induzieren die Chemotaxis von Mo-

nozyten und Lymphozyten, deren Transmigration wiederum durch spezifische NF- κ B-gesteuerte, endotheliale Adhäsionsmoleküle, beispielsweise ICAM-1 oder VCAM-1, koordiniert wird [11, 15, 17]. Auch in späteren Stadien wird angenommen, daß NF- κ B von Bedeutung ist, z. B. bei der Produktion von Wachstumsfaktoren, Proteasen und prokoagulatorischen Proteinen sowie bei Apoptose [1, 2, 10, 12]. Resultierende Komplikationen wie Gefäßverengung, Plaqueruptur oder Thrombose sind die pathophysiologischen Grundlagen für die Entstehung koronarer und zerebraler arterieller Verschlußkrankheiten [11, 18].

Interessanterweise sind in bestimmten Regionen der arteriosklerotischen Läsion Substanzen zu finden, die das NF- κ B-System in signifikanter Weise inhibieren z. B. stärker oxidiertes LDL [13]. Während der Oxidation von LDL beobachtet man eine Zunahme von 4-Hydroxynonenal (HNE) oder Lysophosphatidylcholin, für die ebenfalls deutliche Hemmeffekte auf das NF- κ B-System nachgewiesen wurden [19, 20]. So wurde gezeigt, daß eine Präinkubation mit HNE eine selektive Hemmung der I κ B-Phosphorylierung und -Proteolyse bewirkt und damit die NF- κ B-Translokation, die κ B- sowie TNF- oder IL-8-Promotor-abhängige Transkription und die Expression von NF- κ B-Zielgenen negativ beeinflußt [19]. Eine Dysregulation im Sinne einer Inhibition von NF- κ B könnte unter bestimmten Bedingungen protektive, entzündliche Reparatur- oder Immunmechanismen stören und damit zur Chronifizierung des Geschehens und zur Bildung von Schaumzellen beitragen.

Darüber hinaus wurde von uns bei einer Reihe weiterer akut oder chronisch entzündlicher Erkrankungen der Status von NF- κ B in humanen oder murinen Geweben untersucht. Beispiele sind Sepsis-assoziierte Erkrankungen, einschließlich der akuten Verlaufsform des Toxic Oil-Syndroms, einer exogen induzierten Autoimmunerkrankung, sowie entzündliche Darm- und Hauterkrankungen [21-25].

Eine zunehmende Anzahl von Daten deutet darauf hin, daß eine Dysregulation von NF- κ B auch bei malignen Prozessen zu finden ist [2]. Von unserer Arbeitsgruppe wurde der Aktivierungsstatus von NF- κ B bei Leukämien untersucht, im speziellen bei akuter myeloischer Leukämie (AML) [26]. Diese Studie zeigte, daß eine Fehlregulation IKK-Komplex-assozierter Signalübertragung zu einer erhöhten Konzentration von aktiviertem NF- κ B im Zellkern von AML-Blasten führt, wobei ein deutlicherer Effekt in AML-FAB-M4/5-Zellen im Vergleich zu M1/2-Blasten beobachtet wurde.

Diagnostische oder therapeutische Aspekte

Es ist zu erwarten, daß unterschiedliche Moleküle, die an NF- κ B-assozierter Signalübertragung/Genregulation beteiligt sind bzw. verschiedene NF- κ B-regulierte Proteine für diagnostische und therapeutische Ansätze zum Einsatz kommen werden (z. B. bei Arteriosklerose/Restenose, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Sepsis, Tumorerkrankungen). Denkbar wäre

die Verwendung dieser Proteine als Aktivierungs- oder Prognosemarker, als Apoptoseindikator oder zur Beschreibung bestimmter Malignitätskriterien [1, 2, 10, 23, 26]. Zunehmend wird auch die Assoziation spezieller molekulargenetischer Aberrationen mit bestimmten Krankheitsprozessen beschrieben. Die erfolgreiche Anwendung verschiedener inhibitorischer Strategien, z. B. IκB-Expressionsplasmide, Transcription Factor Decoy-Strategien, Inhibitoren (Antioxidantien, Proteasenhemmstoffe) sowie spezifischer IKK-Expressionsplasmide weist auf therapeutische Aspekte hin [3, 6, 13, 15]. Das kürzliche erprobte rAAV-System (recombinant adeno-associated virus) könnte sich besonders gut *in vivo* für gentherapeutische Ansätze eignen [9].

Relevante wissenschaftliche Veröffentlichungen (seit 1996)

Für den Hoppe-Seyler-Preis wurden die Arbeiten Nr. 6, 8 und 19 eingereicht.

1. Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA. Role of nuclear factor-κB in atherogenesis. *Experimental Physiology* 1997;82:297-304.
3. Haas M, Page S, Page M, Neumann F-J, Marx N, Adam M, Ziegler-Heitbrock HWL, Neumeier D, Brand K. Effect of protease inhibitors on monocytic IκB-α and -β depletion, NF-κB activation and cytokine production. *J Leukoc Biol* 1998;63:395-404.
6. Fischer C, Page S, Weber M, Eisele T, Neumeier D, Brand K. Differential effects of LPS and TNF on monocytic IKK signalsome activation and IκB proteolysis. *J Biol Chem* 1999;274:24625-32.
7. Brand K, Fischer C, Page S, Weber M, Donath B, Neumeier D. Differential IKK complex activation and IκB proteolysis patterns in monocytic cells following LPS and TNF exposure. In: *NF-κB Regulation and Function: From Basic Research to Drug Development, Keystone Symposia, Tahoe City, USA, 2000: Abstract Book 79 (A201)*.
8. Donath B, Fischer C, Page S, Prebeck S, Eisele T, Neumeier D, Miethke T, Brand K. *Chlamydia pneumoniae* activates IκB/IKK-mediated signaling, which is inhibited by 4-HNE and following primary exposure. Eingereicht.
9. Gawaz M, Page S, Massberg S, Fischer C, Weber M, Ungerer M, Brand K. Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via IκB kinase complex activation – implications for endothelial chemotactic dysfunction. Eingereicht.
10. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kalschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-κappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;97:1715-22.
11. Brand K, Fischer C, Donath B, Baumgartner B, Neumeier D. Dysregulation des NF-κB-Systems bei Arteriosklerose. *Die Medizinische Welt* 1999;50:316-20.
13. Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kalschmidt C, Neumann F-J, Mackman N, Baeuerle PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor-κB by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1901-9.
14. Neumann F-J, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meini C, May A, Schöning A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997;95:2387-94.
15. Gawaz M, Neumann F-J, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz K-L, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schöning A, Brand K. Activated platelets induce secretion of monocyte chemotactic protein-1 and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164-71.
16. Zohlnhöfer D, Brand K, Schipell K, Pogatsa G, Schöning A, Neumann F-J. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1β-dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:353-9.
17. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Zohlnhöfer D, Schöning A, Neumann F-J. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2000;148:75-85.
18. Page S, Brandl R, Neumeier D, Brand K. Activation state of transcription factor NF-κB in acute aortic dissection. *Atherosclerosis* 1997;134:282.
19. Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, Hayn M, Ziegler-Heitbrock HWL, Neumeier D, Brand K. 4-Hydroxyxynonenal prevents NF-κB activation and TNF expression by inhibiting IκB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem* 1999;274:11611-8.
20. Engelmann B, Zieseniss S, Brand K, Page S, Lentsch A, Ulmer AJ, Gerlach E. Tissue factor expression of human monocytes is suppressed by lysophosphatidylcholine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:47-53.
21. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Schölmrich J, Gross V. Nuclear factor κB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998;115:357-69.
22. Bell SA, Page S, Baumgartner B, Berking C, Haas M, Eisele T, Neumeier D, Brand K. Involvement of nuclear factor-κB in a murine model for the acute form of autoimmune-like toxic oil syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;157:213-21.
23. Brand K, Donath B, Fischer C, Schölmrich J, Neumeier D, Rogler G. NF-κB-gesteuerte Genexpression bei entzündlichen Darmerkrankungen. *Die Medizinische Welt* 2000;51:108-12.
24. Herfarth H, Brand K, Rath HC, Rogler G, Schölmrich J, Falk W. Nuclear factor-κappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000;120:59-65.
25. Rogler G, Gelbmann M, Vogl D, Brunner M, Schölmrich J, Falk J, Andus T, Brand K. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast cultures. *Scand J Gastroenterol* 2001. Im Druck.
26. Baumgartner B, Weber M, Fischer C, Page S, Adam M, von Schilling C, Waterhouse C, Schmid C, Neumeier D, Brand K. Increased I-κappa B kinase activity is associated with activated NF-κappa B in acute myeloid blasts. Eingereicht.

Priv.-Doz. Dr. med. *Korbinian Brand*

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Technische Universität München

Klinikum rechts der Isar

Ismaninger Str. 22

81675 München

Germany

Tel.: +49-89-4140-4084

Fax: +49-89-4140-4080

E-mail: brand@klinchem.med.tu-muenchen.de