

# **Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Signalwege und Funktion des Proteins PRPL2 in humanen Leukozyten**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Diplom-Biochemiker Stefan Kreideweiß

geboren am 05. November 1970 in Halle/Saale

1999

**Referent:** PD Dr. W. Müller, Inst. f. Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

**Korreferent:** Prof. Dr. A. Nordheim, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

**Tag der Promotion:** 12. Februar 1999

**Tag der Veröffentlichung:** 03/1999

## ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit gelang es, neue Informationen über Signalübertragungsvorgänge in primären humanen Leukozyten zu gewinnen.

Ausgangspunkt waren im ersten Teil der Arbeit Untersuchungen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-2 als wichtige Ziele des MAPK-Netzwerkes. Es ließ sich zeigen, daß die Phosphorylierung von ATF-2 an einer für seine Aktivität entscheidenden Position durch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal induziert wird. Von besonderer Bedeutung ist dabei der experimentelle Nachweis, daß diese Induktion durch eine Behandlung der Zellen mit therapeutischen Konzentrationen des Immunsuppressivums Cyclosporin A inhibiert wird. Darüber hinaus konnten Indizien für eine Beteiligung von ATF-2 an der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Regulation der Expression des Reparaturenzyms DNA Polymerase  $\beta$  in humanen Leukozyten gewonnen werden. Die Untersuchungen zur Identifikation der für diese Induktion verantwortlichen Kinase offenbarten erstmalig die Regulation des MAPK-Netzwerkes durch Calcium in primären humanen Leukozyten. Es konnte gezeigt werden, daß die MAP-Kinasen SAPK2a und die Kinasen der SAPK1/JNK-Familie durch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aktiviert werden. In beiden Fällen wurde die Induktion durch CsA beeinflusst. Weiterführende Experimente erbrachten den Nachweis, daß für die Aktivierung der SAPK2a durch  $\text{Ca}^{2+}$  die Kinase MKK6 verantwortlich ist. Ausgehend von diesen Experimenten wird es möglich sein, genauere Informationen zur Genregulation und deren Beeinflussung durch CsA in primären Leukozyten zu gewinnen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Resultate zur Charakterisierung des neuen Proteins PRPL2 vorgestellt. Dieses zytoplasmatische Protein ist vorwiegend im hämatopoetischen System exprimiert, es ließen sich auf Proteinebene eine sehr starke Expression in primären Leukozyten und Zelllinien des hämatopoetischen Systems zeigen, nicht jedoch in Fibroblastenzellen. Darüberhinaus wurde ein erster Hinweis auf deutliche Unterschiede im Expressionsniveau dieses Proteins zwischen primären T-Lymphozyten eines gesunden Blutspenders und den Zellen einer aus einer T-Zell-Leukämie etablierten Zelllinie gefunden. Es konnte gezeigt werden, daß PRPL2 *in vitro* selektiv mit den SH3-Interaktionsdomänen wichtiger Signalmoleküle reagiert. Weiterführende Experimente bewiesen eine *in vivo* Interaktion mit dem Protein WASP, dessen Gen in Patienten mit der Erbkrankheit Wiskott-Aldrich-Syndrom mutiert ist. Diese Resultate verdeutlichen eine mögliche Beteiligung von PRPL2 an Signalprozessen und versprechen die Gewinnung neuer Erkenntnisse über zellspezifische Regulationsvorgänge in hämatopoetischen Zellen.

**STICHWORTE:** Cyclosporin A,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege, PRPL2

## ABSTRACT

This work presents new data about the signal transduction in human primary leukocytes.

The first part shows the analysis of the activation of the transcription factors CREB and ATF-2 as targets of the MAPK-network. The phosphorylation of ATF-2 at the position Thr71 is induced by an increase of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -level in human primary leukocytes. This induction, which is important for the activity of the transcription factor, could be blocked by therapeutic concentrations of the immunosuppressant drug cyclosporin A (CsA). The attempts to identify the responsible kinases revealed for the first time the regulation of the MAPK-network by calcium in human primary leukocytes. It could be shown, that the MAP-kinases SAPK2a and SAPK1/JNK are activated by a  $\text{Ca}^{2+}$ -signal. Further experiments showed the involvement of the MAPKK MKK6 in the activation of SAPK2a by calcium. Using these data, it will be possible to obtain more information about the influence of CsA on the gene regulation in primary leukocytes.

The second part of this thesis shows results of the characterization of the novel protein PRPL2. This cytoplasmatic protein is predominantly expressed in the hematopoietic system and a strong expression on the protein level was found in primary leukocytes and hematopoietic cell lines. This thesis presents first data about differences in the expression level of PRPL2 between primary T-lymphocytes of a healthy donor and cells of a T-cell leukemia cell line. It could be shown, that PRPL2 interacts *in vitro* with the SH3-domains of important signaling molecules. Further experiments revealed the *in vivo* interaction of PRPL2 with the protein WASP, which is defect in patients with the hereditary disease Wiskott-Aldrich-Syndrome. These results demonstrate the potential involvement of PRPL2 in signal transduction processes and could be the basis for the attainment of new information about cell specific regulation processes in hematopoietic cells.

**Key words:** Cyclosporin A,  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, PRPL2

<b>1. EINFÜHRUNG UND ZIELE .....</b>	<b>8</b>
<b>2. THEORIE .....</b>	<b>9</b>
2.1 Das MAPK-Netzwerk.....	9
2.2 Ca <sup>2+</sup> als intrazellulärer Signalgeber .....	21
2.3 Cyclosporin A.....	27
2.4 Src-Kinasen und SH3-Domänen als wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomänen.....	31
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>36</b>
3.1 Chemikalien.....	36
3.2 Lösungen.....	37
3.3 Methoden.....	41
<b>4. ERGEBNISSE I: BEEINFLUSSUNG DES MAPK-SIGNALNETZWERKES DURCH CA<sup>2+</sup> UND CSA IN PRIMÄREN HUMANEN LEUKOZYTEN .....</b>	<b>60</b>
4.1 Ausgangspunkt .....	60
4.2 Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und CREB durch CsA.....	61
4.3 Aktivierung des MKK6/SAPK2-Signalweges durch Ca <sup>2+</sup> .....	66
4.4 Aktivierung des SAPK1/JNK-Weges durch Ca <sup>2+</sup> .....	70
4.5 Beeinflussung sonstiger ATF-2 phosphorylierender Kinasen durch Ca <sup>2+</sup> und Unterscheidung der Signalwege .....	71
<b>5. ERGEBNISSE II: CHARAKTERISIERUNG DES PROTEINS PRPL2.....</b>	<b>75</b>
5.1 Ausgangspunkt .....	75
5.2 Expressionsmuster auf Proteinebene.....	75
5.3 Intrazelluläre Lokalisation.....	78
5.4 <i>In vitro</i> -Interaktion mit SH3-Domänen.....	80
5.5 <i>In vivo</i> -Interaktion von PRPL2 mit SH3-Domänen enthaltenden Proteinen.....	88
5.6 Interaktion von PRPL2 mit WASP .....	92
<b>6. DISKUSSION.....</b>	<b>97</b>
6.1 Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und CREB.....	97

6.2 Aktivierung von Teilen des MAPK-Netzwerkes durch Ca <sup>2+</sup> .....	99
6.3 Expression des Proteins PRPL2 und Zellokalisation.....	104
6.4 Interaktion von PRPL2 mit SH3-Domänen .....	105
6.5 Interaktion von PRPL2 mit WASP .....	107
<b>7. LITERATUR .....</b>	<b>109</b>
<b>8. ANHÄNGE.....</b>	<b>126</b>

**Abkürzungsverzeichnis:**

BSA:	<i>bovine serum albumin</i>
CRE:	<i>cAMP response element</i>
CsA:	Cyclosporin A
DMSO:	Dimethylsulfoxid
ECL:	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGFP:	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMSA:	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK:	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
Fa:	Firma
FBS:	<i>fetal bovine serum</i>
GFP:	<i>green fluorescent protein</i>
GST:	Glutathion-S-Transferase
IL:	Interleukin
IP:	Immunpräzipitation
IPTG:	Isopropylthio- $\beta$ -D-galaktosid
IVTT:	<i>in vitro</i> Transkription und Translation
kDa:	Kilodalton
MAPK:	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MBP:	<i>myelin basic protein</i>
PAGE:	Polacrylamidgelelektrophorese
PBMC:	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PIS:	Präimmunserum
PMA:	Phorbol-12-myristat-13-azetat
RT:	Raumtemperatur
SAPK:	<i>stress activated protein kinase</i>
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
SH3:	<i>Src homology 3</i>
SRBC:	<i>sheep red blood cells</i>
TBST:	<i>Tris buffered saline Tween</i>
WASP:	<i>Wiskott-Aldrich-syndrome protein</i>
WIP:	<i>WASP-interacting protein</i>

# 1. EINFÜHRUNG UND ZIELE

Ein wichtiges Merkmal von Organismen und einzelnen Zellen ist ihre Fähigkeit, gezielt auf äußere Einflüsse zu reagieren.

Sämtliche Vorgänge im Leben einer Zelle, vom Wachstum bis hin zu Differenzierungsprozessen, werden durch ein engmaschiges extra- und intrazelluläres Kommunikationsnetzwerk kontrolliert. Damit ist jede Zelle in der Lage, auf die unterschiedlichsten äußeren Signale, wie z.B. chemische Stimuli oder auch Zell-Zell-Kontakte, zu reagieren. Solche zellulären Reaktionen umfassen Änderungen im Stoffwechsel und im Expressionsmuster von Genen. Fehler in diesen Kommunikationswegen können zu einer Entartung von Zellen und der Entwicklung von Tumoren führen.

Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über den Informationsfluß in primären humanen Leukozyten zu gewinnen. Dazu werden in den Zellen durch äußere Stimuli Ereignisse simuliert, wie sie auch bei einer Immunantwort auftreten und die Reaktion der Zellen analysiert. Besonderes Augenmerk wird dabei im ersten Teil auf die Wirkung eines Calcium-Signals auf einen wichtigen Teil des intrazellulären "*information highway*", das MAPK-Netzwerk, geworfen. Es soll untersucht werden, wie Teile dieses Netzwerkes auf ein Calcium-Signal reagieren und wie dadurch die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Es soll weiterhin der Einfluß des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) auf diese Prozesse analysiert werden. CsA ist von großer Bedeutung für die Behandlung von transplantierten Patienten um eine Abstoßung des neuen Organs zu verhindern. Die Entdeckung von CsA war richtungsweisend für die Entwicklung der Transplantationsmedizin.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit der funktionellen Charakterisierung des neuen Proteins PRPL2, das hauptsächlich im hämatopoetischen System exprimiert wird. Schwerpunkt ist dabei die potentielle Beteiligung dieses Proteins an Signalübertragungswegen in humanen Leukozyten.

## 2. THEORIE

### 2.1 Das MAPK-Netzwerk

#### 2.1.1 Allgemeines

Das MAPK-Netzwerk (siehe Abb.1) ist einer von mehreren Wegen, über die extrazelluläre Stimuli den Zellstoffwechsel und das Expressionsmuster von Genen beeinflussen. Teile dieses Netzwerkes sind in die Regulation unterschiedlichster biologischer Prozesse, wie Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse, Apoptose, Zellproliferation oder auch die Tumorentstehung, involviert (1, 2).

Generell läßt sich dieses Netzwerk interagierender Kinasen in zwei Abschnitte unterteilen:

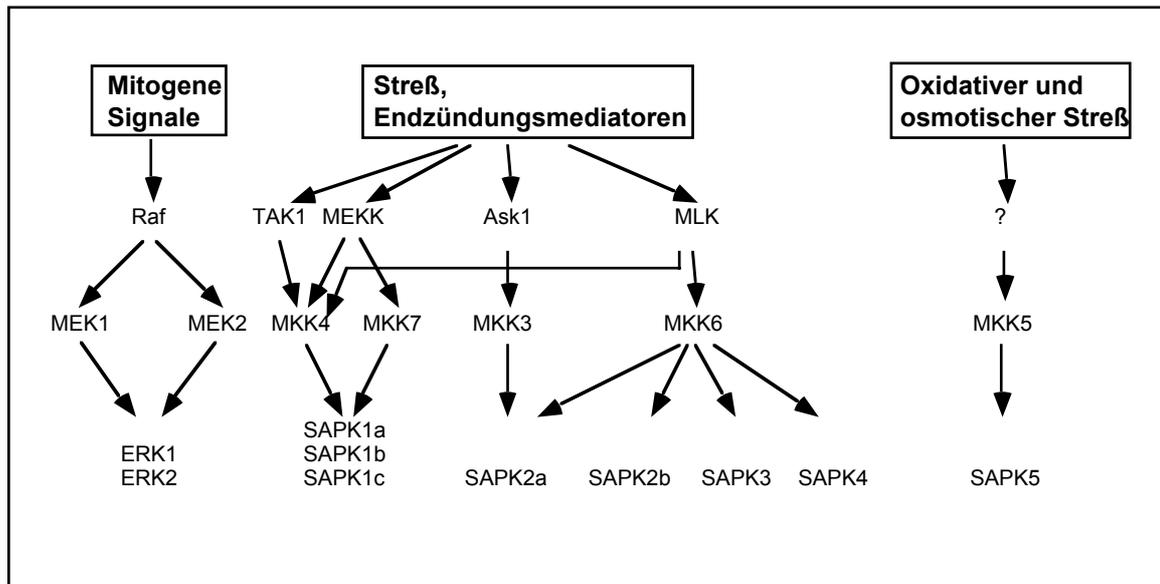
- 1) Der Signalweg, der zur Aktivierung der ERKs (*extracellular signal regulated kinase*) führt und über den vor allem mitogene Signale (z.B. Serum, Wachstumsfaktoren) und auch teilweise Differenzierungssignale vermittelt werden und
- 2) die Signalwege, die zur Aktivierung der Kinasen der JNK/SAPK1-Familie (*cJun N-terminal kinase / stress activated protein kinase*) und der p38/SAPK2-Familie führen. Hierüber werden vor allem Streß-Signale, wie z.B. die Einwirkung von Hitze und UV-Bestrahlung, und die Einflüsse von Endzündungsmediatoren, wie z.B. LPS, IL-1 und IFN $\gamma$ , übertragen.

Im folgenden sollen Grundzüge der Regulation des MAPK-Netzwerkes in humanen Zellen aufgezeigt werden.

#### 2.1.2 Die MAPK-Ebene

Die MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*) sind eine Superfamilie von Prolin-gerichteten Ser/Thr-Kinasen, d.h. sie phosphorylieren Serin- und Threonin-

Reste, die in einem jeweils spezifischen Aminosäuremotiv von einem oder mehreren Prolinen gefolgt werden. Diese Kinasen werden ihrerseits aktiviert durch eine Phosphorylierung an einem Threonin und einem Tyrosin in dem für jede Gruppe spezifischen Motiv Thr-Xaa-Tyr. Dabei ist Xaa bei den ERKs ein Glutamatrest, bei den SAPK1/JNK ein Prolin.



**Abb.1: Grundstruktur des MAPK-Netzwerkes (verändert nach (2))**

In den 80er Jahren wurde eine wachsende Anzahl von MAP-Kinasen identifiziert, und, da von verschiedenen Gruppen in unterschiedlichen Systemen und unterschiedlichen Situationen kloniert, mit verschiedenen Namen bezeichnet. In der folgenden Arbeit wird die von P. Cohen vorgeschlagene, einheitliche Nomenklatur verwendet (Tab.1).

### *ERKs*

Über die Kinasen ERK1 und ERK2 werden vor allem mitogene Signale auf den Stoffwechsel übertragen:

- eine Behandlung mit Serum induziert die ERK-Aktivität in vielen Zellen (3)

- Wachstumsfaktoren, wie PDGF (*platelet-derived growth factor* (4)) und EGF (*epidermal growth factor* (5)) aktivieren ERKs und
- der Tumorpromotor PMA aktiviert ebenfalls den ERK-Weg (6).

**Tab.1:** Nomenklatur der MAP-Kinasen, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden (2)

Name	Alternative Namen
ERK 1	p43/44 <sup>MAPK</sup>
ERK2	p41/42 <sup>MAPK</sup>
SAPK1a	JNK1
SAPK1b	JNK2
SAPK1c	JNK3
SAPK2a	p38, Mxi2, RK, CSBP
SAPK2b	p38 $\beta$
SAPK3	p38 $\gamma$ , ERK6
SAPK4	-
SAPK5	ERK5, BMK1

Daneben führen aber auch Differenzierungs- und Streß-Signale in bestimmten Situationen zu einer Aktivierung der ERKs. Beispiele hierfür sind:

- die Aktivierung von ERKs während der Differenzierung der neuronalen Zelllinie PC12 durch NGF (*nerve growth factor*) (7),
- die Aktivierung von ERK1 und ERK2 bei einem hyperosmolaren Schock von Zellen der Zelllinie 3Y1 (8) und
- die nach einer Behandlung von Neutrophilen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Anwesenheit eines Katalaseinhibitors (oxidativer Streß) beobachtete Aktivierung der ERKs (9).

### SAPK1/JNK

Die Vertreter der SAPK1/JNK-Familie (*stress-activated protein kinase* (10)) werden vor allem durch Streß-Faktoren aktiviert. Dazu zählen beispielsweise:

- eine Behandlung der Zellen mit UV-Strahlung (11),
- osmotischer Schock (12) und
- eine Behandlung der Zellen mit dem Proteinsyntheseinhibitor Anisomycin (13).

Ebenfalls aktivierend wirken bestimmte Entzündungsmediatoren (IL-1, TNF $\alpha$  (14, 15)) die auch als Streß-Signale aufgefaßt werden können.

Bislang wurden insgesamt 10 *splice*-Varianten dieser Gruppe von Kinasen identifiziert (16), wobei noch nicht geklärt ist, ob diese Formen ubiquitär oder eventuell zell- und gewebespezifisch auftreten.

### *SAPK2*

Die Vertreter der SAPK2-Gruppe werden ebenfalls durch Streß-Faktoren (z.B. UV, Hitze, osmotischer Schock) und bestimmte Zytokine (z.B. IL-1 und TNF $\alpha$ ) aktiviert.

Zu ihren bislang bekannten Substraten zählen u.a. Kinasen (MAPKAP-K2, MAPKAP-K3, Mnk1 und Mnk2) und Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk1 und Sap1; siehe Abschnitt 2.1.5.).

### *SAPK3 und SAPK4*

Diese beiden Kinasen weisen eine ca. 60%ige Identität zu den SAPK2 auf (17, 18). Sie werden ebenfalls durch Streß-Signale (osmotischer Schock, Anisomycin, UV-Strahlung) und bestimmte Zytokine (wie IL-1) aktiviert. Substrate sind u.a. die Transkriptionsfaktoren Elk1 und ATF-2 (siehe Abschnitt 2.1.5) .

### *SAPK5/ERK5*

Diese, auch als BMK1 (*big MAP kinase 1*) bezeichnete Kinase weist das für die Aktivierung wichtige Aminosäuremotiv Thr-Glu-Tyr auf, welches charakteristisch für ERK1 und ERK2 ist. Andererseits weicht BMK1 strukturell so deutlich von ERK1 und ERK2 ab, daß sie als Vertreter einer neuen Gruppe von MAP-Kinasen aufgefaßt werden muß (19).

Extrazelluläre Aktivatoren dieser Kinase sind oxidativer Streß (Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20)), Serum (21) und der Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor* (22)). Als potientiell Substrat wurde bislang der Transkriptionsfaktor MEF2 identifiziert (21).

### 2.1.3 Die MAPKK-Ebene

Die MAPK-Kinasen phosphorylieren spezifisch die einzelnen MAPK in dem für deren Aktivität wichtigen Aminosäuremotiv Thr-Xaa-Tyr und werden ihrerseits durch Ser/Thr-Kinasen phosphoryliert und aktiviert.

#### *MEK1/2 (MAP and ERK kinase)*

Die MAPKK MEK1 und MEK2 (auch als MKK1 und MKK2 bezeichnet) sind spezifische Aktivatoren der ERK-Familie. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der MEK1 ausreichend und notwendig für durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation (in der Zelllinie NIH 3T3) und Differenzierung (in der Zelllinie PC12) ist (23) ist.

*In vivo* wird die korrekte Interaktion der MEK mit der jeweiligen ERK vermutlich durch Interaktionsproteine vermittelt. So wurde 1998 das Protein MP1 (*MEK partner 1*) identifiziert, das *in vivo* selektiv mit MEK1 und ERK1 interagiert. Eine Überexpression dieses Proteins führte zu einer Erhöhung der Anzahl der MEK1/ERK1-Komplexe und zu einer Verstärkung der MEK/ERK-vermittelten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 (24).

#### *MKK4 und MKK7*

Die Kinase MKK4 (andere Bezeichnungen: JNKK1, SEK1) phosphoryliert und aktiviert die SAPK1/JNK-Familie. Sie wird sowohl durch Streß-Faktoren (UV-Strahlung, Hitze), als auch durch bestimmte Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ ) induziert (25, 26). Daneben ist sie auch in der Lage, SAPK2 zu aktivieren (27), allerdings erfolgt die Aktivierung von SAPK2 in den meisten Fällen über die MAPK-Kinasen MKK3 und MKK6 .

Die Kinase MKK7 wurde 1997 als neue, SAPK1/JNK-aktivierende Kinase identifiziert (28). Sie ist spezifisch für diese Kinasen und wird durch Streß-Faktoren (UV, Anisomycin, Hitzeschock) und Zytokine (z.B.  $\text{TNF}\alpha$ ) induziert (29). Wie auch im Fall der MEK1 wird die Aktivierung der SAPK1 durch MKK7 durch den Aufbau eines Multi-Protein-Komplexes begünstigt. 1998 konnte gezeigt werden, daß das Protein JIP-1 (*JNK interacting protein-1*) mit SAPK1 und MKK7 sowie den Kinasen DLK und HPK1 (siehe Abschnitt 2.2.4) interagiert. Bei der Überexpression verstärkte JIP-1 die Aktivierung von SAPK1a durch MKK7 (30).

#### *MKK3 und MKK6*

Die Kinasen MKK3 und MKK6 (andere Nomenklatur: SAPKK2 und SAPKK3) sind spezifisch für die SAPK2 (31). Beide Kinasen sind in der Lage, SAPK2 zu aktivieren, es scheint aber in den meisten Fällen eine Aktivierung der SAPK2 durch die "klassischen Stimuli", wie osmotischer Schock, LPS- und  $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung, vorwiegend über die MKK6 zu erfolgen (32, 33).

MKK6 aktiviert ebenfalls die Kinasen SAPK3 und SAPK4 (17, 18).

#### *MEK5*

Die Kinase MEK5 ist ein spezifischer Aktivator für ERK5/SAPK5 (34). Als Induktoren des MEK5/ERK5-Weges wurden bislang osmotischer und oxidativer Streß und eine Behandlung der Zellen mit EGF und Serum identifiziert (20-22).

### **2.1.4 Die MAPKKK-Ebene und andere *upstream*-Kinasen**

In den letzten Jahren wurden mehrere Ser/Thr-Kinasen identifiziert, die *upstream* der MAPKK liegen, wobei in vielen Fällen die genaue Position im MAPK-Netzwerk noch nicht bekannt ist.

### *Raf und Mos*

Die Proteine der Raf-Familie bilden eine Gruppe von Ser/Thr-Kinasen mit den Vertretern Raf-1, A-Raf und B-Raf, die wichtige Aktivatoren der Kinasen der MEK-Gruppe sind.

So ist aktiviertes Raf-1 in der Lage, MEK1 an den für deren Aktivität wichtigen Aminosäureresten Ser218 und Ser222 zu phosphorylieren (35). Für die Selektivität von Raf-1 ist vermutlich eine Prolin-reiche Sequenz in MEK1 und 2 verantwortlich, die in anderen, auf gleicher Ebene im MAPK-Netzwerk arbeitenden Kinasen, wie z.B. MKK4 und MKK3, nicht zu finden ist (36).

Andere intrazelluläre Substrate von Raf-1 sind u.a. die für die Zellzykluskontrolle wichtige Phosphatase CDC25A und das Protein I $\kappa$ B, ein Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B.

Die Aktivierung von Raf-1 erfolgt über sehr komplexe Mechanismen. Raf-1 interagiert mit der aktiven GTPase Ras, was zu einer Relokalisation des Proteins zur Zellmembran führt. Daneben wurde aber auch eine Ras-unabhängige Aktivierung von Raf-1 in mehreren Situationen beschrieben (37, 38). Neben dem Kontakt mit der Zellmembran sind Ser/Thr- und Tyr-Phosphorylierungen des Proteins für seine Aktivität sehr wichtig. Bislang wurde für mehrere Kinasen eine aktivierende Wirkung auf Raf-1 beschrieben, z. B. für die Kinase cSrc (39), die Proteinkinase C (PKC (40, 41)) und die Kinase Lck in T-Lymphozyten (42). Im Falle der Proteinkinase A (PKA) wurde sowohl eine inhibierende, als auch eine aktivierende Wirkung auf die Kinaseaktivität von Raf-1 gezeigt (43, 44).

Ebenfalls beteiligt an der Regulation von Raf-1 sind Vertreter der 14-3-3-Proteine, einer Gruppe von Proteinen, die mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren und deren biologische Aktivität beeinflussen kann (z.B. die PKC und die Tyrosin-Hydroxylase). 14-3-3-Proteine sind mit dem inaktiven, als auch mit dem aktiven Raf-1 assoziiert und wahrscheinlich sowohl daran beteiligt, Raf-1 in einem inaktiven Zustand in der Abwesenheit von aktivem Ras zu stabilisieren, als auch die aktive

Form von Raf-1 zu unterstützen (45). So konnte gezeigt werden, daß 14-3-3 $\zeta$  die Inaktivierung von aufgereinigten Raf-1 durch Phosphatasen verhindert (46).

Ein weiteres, an der Regulation von Raf-1 beteiligtes Protein ist KSR (*kinase suppressor of ras*). KSR wird in Anwesenheit von aktivem Ras vom Zytoplasma zur Zellmembran befördert, wo es in der Lage ist, die Aktivität von Raf-1 zu verstärken (47).

Die Ser/Thr-Kinase Mos ist vor allem in Zellen der Keimbahn exprimiert, wo sie entscheidend an der Reifung von Keimzellen beteiligt ist. Daneben wurde eine Expression von Mos auch in anderen Geweben gefunden und seine Beteiligung an der Muskelentwicklung beschrieben (48). Mos aktiviert MEK1 *in vitro* durch Phosphorylierung von für deren Aktivität wichtigen Aminosäureresten und die Expression des konstitutiv aktiven Mos-Enzyms in NIH3T3-Zellen führte zu einer Aktivierung von MEK1 (49).

#### MEKK

Die Gruppe der MEK-Kinasen umfaßt mittlerweile drei Vertreter, MEKK1-3, die unterschiedliche Teile des MAPK-Netzwerkes beeinflussen. So sind zwar alle drei Kinasen in Transfektionsstudien in der Lage, den ERK- und den SAPK1/JNK-Weg zu aktivieren, genauere Untersuchungen zeigten aber, daß

- MEKK1 vor allem MKK4 zu phosphorylieren und aktivieren vermag (50) und
- MEKK2 vorwiegend den SAPK1/JNK-Weg aktiviert, während MEKK3 vorwiegend den ERK-Weg aktiviert (51).

#### MLK (*mixed-lineage kinases*)

Die Vertreter dieser Gruppe (MLK1-3) sind durch eine Kinase-Domäne charakterisiert, die Homologie zu Ser/Thr- und Tyr-Kinasen aufweist und enthalten eine *Leucine zipper*-Domäne. Eine Überexpression von MLK2 führt zu einer Aktivierung von SAPK1/JNK, aber auch von SAPK2a und den ERKs (52). Es konnte gezeigt werden, daß MLK2 in der Lage ist, MKK4 zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren (53).

MKK4 ist ebenfalls ein Substrat von MLK3. Durch Ko-Immunpräzipitation von MLK3 mit MKK6 konnte gezeigt werden, daß MLK3 auch den SAPK2-Weg aktivieren kann (54).

#### *DLK (dual leucine-zipper bearing kinase)*

Die auch als MUK bezeichnete Kinase DLK enthält eine den Ser/Thr-Kinasen homologe Kinasedomäne und zwei *Leucine-zipper*-Domänen (55). Eine Überexpression der Kinase induziert die SAPK1a und SAPK2a (56); die genaue Position im MAPK-Netzwerk ist aber noch nicht geklärt.

#### *TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1)*

Diese Kinase vermittelt vermutlich die aktivierende Wirkung des Zytokins TGF $\beta$  auf die SAPK1/JNK. So konnte gezeigt werden, daß TGF $\beta$  die Kinase TAK1 induziert und eine Überexpression aktiver TAK1 MKK4 und SAPK1/JNK aktiviert (57).

#### *HPK1 (hematopoietic progenitor kinase-1)*

Diese Kinase ist in die Aktivierung der SAPK1/JNK involviert, wobei die genaue Position im MAPK-Netzwerk noch nicht endgültig geklärt ist. Ein Modell positioniert diese Kinase oberhalb von TAK1 (58).

#### *Ask1 (apoptosis-stimulated kinase 1)*

Die Kinase Ask1 phosphoryliert und aktiviert bei einer Behandlung mit TNF $\alpha$  die Kinasen MKK4 und MKK3 und bewirkt somit eine Aktivierung von SAPK1 und SAPK2 (59).

#### *Pyk2*

Pyk2 wird in neuronalen Gewebe durch ein Calcium-Signal aktiviert und es konnte eine Beteiligung an der Signalübertragung des T-Zellrezeptors gezeigt werden (60). Eine Überexpression der Kinase induziert die ERKs, wobei die genaue Position von Pyk2 im MAPK-Netzwerk noch nicht geklärt ist (61).

### 2.1.5 Intrazelluläre Ziele des MAPK-Netzwerkes

Aktivierung der MAP-Kinasen durch die in den letzten Abschnitten aufgeführten Wege setzt diese dann in die Lage, eine große Anzahl zytoplasmatischer und nukleärer Substrate zu phosphorylieren. Dieser Abschnitt ist auf die Darstellung zweier Gruppen von Substraten fokussiert: Kinasen und Transkriptionsfaktoren.

#### 2.1.5.1 Kinasen

Wichtige Zielproteine der MAP-Kinasen sind Ser/Thr-Kinasen von denen mehrere Mitglieder identifiziert werden konnten:

##### *MAPKAP-K1*

Die auch als p90<sup>rsk</sup> bezeichnete MAPKAP-K1 (*MAPK activated protein kinase 1*), wird *in vitro* durch ERK1 und ERK2 phosphoryliert und aktiviert. *In vivo* wird diese Kinase durch alle bekannten Aktivatoren des ERK-Weges aktiviert, nicht jedoch durch Streß-Stimuli. Diese Aktivierung läßt sich durch den für den ERK-Weg spezifischen Inhibitor PD 98059 (62) blockieren, nicht jedoch durch den SAPK2a-Inhibitor SB 203580 (63). Diese Ergebnisse zeigen, daß MAPKAP-K1 ausschließlich durch die ERKs aktiviert wird. Substrate der MAPKAP-K1 sind u.a. die Kinase GSK3  $\beta$  (*glycogen synthase kinase-3*) (64) und der Transkriptionsfaktor CREB (65).

##### *MAPKAP-K2*

Die Kinase MAPKAP-K2 wird *in vivo* durch alle Stimulantien aktiviert, die auch SAPK2 induzieren (66-68). Diese Stimulation läßt sich durch den SAPK2a-spezifischen Inhibitor SB 203580 inhibieren und SAPK2a konnte direkt als die für die MAPKAP-K2-Aktivierung verantwortliche Kinase identifiziert werden (68).

Bislang identifizierte Substrate für MAPKAP-K2 sind das Protein Hsp 27 (*heat shock protein 27* (67)) und die Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-2 (69).

### MAPKAP-K3

Diese auch als 3pK bezeichnete Kinase (70) wird vermutlich durch alle Gruppen von MAP-Kinasen, mit Ausnahme von SAPK3, SAPK4 und ERK5, aktiviert. Dafür sprechen folgende Punkte:

- ERK1, ERK2, SAPK2a und SAPK1/JNK sind in der Lage, MAPKAP-K3 *in vitro* zu phosphorylieren und aktivieren, und
- diese Kinase wird *in vivo* u.a. durch Serum, PMA, Anisomycin und Arsenit aktiviert (71).

Bislang wurde als *in vitro*-Substrat das Hitzeschock-Protein Hsp 27 identifiziert (71).

### MAPKAP-K4 und MAPKAP-K5

Diese beiden Kinase wurden 1997 und 1998 als neue Vertreter der MAPKAP-Kinasen charakterisiert. Während MAPKAP-K4 durch die ERKs aktiviert wird, wird MAPKAP-K5 *in vitro* durch die ERKs und SAPK2, nicht jedoch SAPK1/JNK, phosphoryliert und aktiviert. Als einziges *in vitro*-Substrat wurde für MAPKAP-K4 und MAPKAP-K5 die leichte Kette des Myosins II identifiziert (72, 73).

### Mnk1 und Mnk2

Die Kinasen Mnk 1 und Mnk2 (*MAP kinase interacting kinases 1 und 2*) werden *in vitro* sowohl von ERK1 und ERK2, als auch von SAPK2a phosphoryliert und aktiviert (74, 75). *In vivo* wird Mnk1 sowohl von ERK-Aktivatoren (Serum und PMA), als auch von SAPK2-Aktivatoren (UV-Strahlung, osmotischer Schock, Behandlung mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ ) aktiviert (74, 75).

### Msk1

Die Kinase Msk1 (*Mitogen- and stress-activated protein kinase-1*) wird *in vitro* von ERK2, SAPK2a und SAPK2b phosphoryliert und aktiviert (76). Das endogene Enzym wird durch zwei Gruppen von Stimulantien aktiviert:

- Wachstumsfaktoren und PMA. Diese Induktion kann durch den Inhibitor PD 98059, der spezifisch für MEK1 ist (62), inhibiert werden.
- Streß-Induktoren wie UV-Strahlung. Diese Induktion wird durch den Inhibitor SB 203580 inhibiert (76).

Zielproteine dieser Kinase sind die Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-1 (76).

### *PRAK*

Die Kinase PRAK (*p38-regulated/activated protein kinase*) wurde 1998 als neue, durch SAPK2a regulierte Kinase kloniert und weist eine ca. 20-30%ige Sequenzhomologie zu den Kinasen MAPKAP-K1/2/3 und Mnk1/2 auf (77). Sie wird durch SAPK2a und SAPK2b *in vivo* und *in vitro* an dem für ihre Aktivität entscheidenden Threonin 182 phosphoryliert. Als Substrat wurde bislang nur das Hitzeschock-Protein Hsp 27 identifiziert (77).

#### 2.1.5.2 Transkriptionsfaktoren

Über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren nimmt das MAPK-Netzwerk Einfluß auf die Regulation einer großen Anzahl von Genen. Dabei kann ein Transkriptionsfaktor durch diese Phosphorylierung sowohl aktiviert (z.B.: ATF-2 (78)), als auch inaktiviert werden (z.B.: HSF-1 (79)). Die Tabelle 2 faßt die bislang als Substrate für Kinasen des MAPK-Netzwerkes identifizierten Transkriptionsfaktoren zusammen. Es muß aber berücksichtigt werden, daß in vielen Fällen eine Beeinflussung eines Transkriptionsfaktors durch die aufgeführten Kinasen nur *in vitro* oder in Überexpressionsexperimenten gezeigt wurde. Daher ist die Relevanz *in vivo* nicht in jedem Fall sicher.

## 2.2 Ca<sup>2+</sup> als intrazellulärer Signalgeber

Eine temporäre Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels ist von großer Bedeutung für die Signalübertragung in vielen biologischen Systemen, von Prokaryonten bis Eukaryonten.

**Tab. 2:** Transkriptionsfaktoren als Substrate des MAPK-Netzwerkes

Transkriptionsfaktor	Kinasen	Referenz
CREB	MAPKAP-K1	(65)
	MAPKAP-K2	(69)
	Msk1	(76)
ATF-2	SAPK1,SAPK2, SAPK3,	(17, 18, 80, 81)
	SAPK4	
c-Jun	SAPK1	(11)
MEF2C	SAPK2, ERK5	(21, 82)
CHOP	SAPK2	(83)
SAP1a	ERK	(84)
	SAPK1	(84)
	SAPK2a	(85)
	SAPK3	(17)
	SAPK4	(18)
Elk1	ERK	(87)
	SAPK1	(86)
	SAPK2a	(88)
	SAPK3	(17)
	SAPK4	(18)
HSF-1	ERK, SAPK1, SAPK2	(79)
GABP	ERK, SAPK1	(89)
NF <sub>κ</sub> B	SAPK1, SAPK2	(90)
c-Myc	ERK2	(91)
Max	SAPK2a	(92)

Als Beispiele für diese Bedeutung seien hier erwähnt:

- Das Calcium bindende Protein Calcineurin ist in den  $G_0$ - $G_1$ -Übergang im Zellzyklus humaner Zellen involviert (93),
- Transkriptionsfaktoren, wie CREB, werden durch Calcium-regulierte Kinasen in ihrer Aktivität beeinflusst (siehe Abschnitt 2.2.3) und
- Calcium ist ebenfalls am Prozess der Apoptose beteiligt (94).

Im folgenden sollen einige Grundsätze der Wirkung von  $Ca^{2+}$  in der Signalübertragung aufgezeigt werden. Die Darstellung beschränkt sich dabei auf die Bedeutung von  $Ca^{2+}$  für Signalprozesse in humanen Zellen außerhalb des neuronalen Systems.

### 2.2.1 $Ca^{2+}$ -bindende Proteine und intrazelluläre Calcium-Speicher

Das bislang am besten beschriebene  $Ca^{2+}$ -bindende Strukturmotiv in Proteinen ist die "EF-Hand", benannt nach der E- und F-Region im Parvalbumin. Diese Struktur besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices, getrennt durch eine  $Ca^{2+}$ -bindende Schleife (*helix-loop-helix*-Motiv). Die Schleife enthält dabei die für die Calcium-Bindung wichtigen Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure (95).

Generell lassen sich  $Ca^{2+}$ -bindende Proteine in zwei Gruppen einteilen:

- Proteine, die den intrazellulären Calcium-Spiegel puffern, wozu zum Beispiel das Calsequestrin, das Calbindin und das Parvalbumin gehören und
- Proteine, deren enzymatische oder sonstige Funktionen durch die Calcium-Bindung reguliert werden. Dazu zählt das Calcineurin (eine Phosphatase), das Calpain (eine Protease) und die Phospholipase A2.

Diese Proteine binden  $Ca^{2+}$  entweder direkt (Calsequestrin) oder enthalten als eine Untereinheit das  $Ca^{2+}$ -bindende Proteine Calmodulin bzw. interagieren mit ihm. Calmodulin ist ein 17 kDa großes Protein, das eine EF-Hand als wichtigstes Strukturmerkmal enthält.

Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist mit ca. 100 nm in ruhenden Zellen sehr niedrig gegenüber einer extrazellulären Konzentration von ca. 2 mM. Da Calcium, im

Gegensatz zu anderen Signalgebern, nicht metabolisch abgebaut werden kann, kommt der Regulation seiner intrazellulären Konzentration eine große Bedeutung zu.

Der wichtigste Calcium-Speicher der Zellen ist das Endoplasmatische Retikulum (ER), das in seiner Membran zahlreiche Calcium-Transporter vom SERCA-Typ (*smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase pump*) enthält. Diese sind in der Lage, freie Calcium-Ionen aktiv unter Verwendung von ATP im ER anzureichern, wo sie von  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen, wie dem Calsequestrin, gebunden werden. Eine dabei noch offene Frage ist, ob das Calcium hier ausschließlich gespeichert wird, oder ob die Änderung des Calcium-Spiegels im ER dort ablaufende Prozesse der Proteinsortierung reguliert. Auf ein entsprechendes Signal hin kann das so gespeicherte Calcium aus dem ER entlassen werden.

Die Mitochondrien sind ebenfalls in der Lage,  $\text{Ca}^{2+}$  bis zu einer Konzentration von 0.5 mM in der mitochondrialen Matrix zu speichern. Allerdings haben die dafür verantwortlichen Calcium-Transporter eine deutlich niedrigere Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$  als die SERCA-Proteine des ER und sind daher erst bei einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $>0.5$  mM von Bedeutung (96).

### **2.2.2 Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels durch extrazelluläre Signale**

Von entscheidender Bedeutung für die temporäre Erhöhung des Calcium-Spiegels ist in den meisten Zellen der Inositol(1,4,5)-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>)-vermittelte Signalweg.

Prinzipiell sind zwei Typen von Rezeptoren auf der Zelloberfläche in der Lage, die Synthese des *second messengers* InsP<sub>3</sub> zu induzieren: die G-protein gekoppelten Rezeptoren (GCR: *G protein-coupled receptor class of seven transmembrane-spanning receptors*) und die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Dabei stimulieren die GCR das Enzym Phospholipase  $\beta$  (PLC $\beta$ ), die RTK hingegen die Phospholipase C $\gamma$ . Beide Enzymklassen katalysieren die Umsetzung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat in InsP<sub>3</sub> und Diacylglycerol (DAG).

Das InsP<sub>3</sub> diffundiert dann zum ER, wo es an den homotetrameren InsP<sub>3</sub>-Rezeptor bindet. Dieser Rezeptor umschließt eine relativ unspezifische Pore für Kationen (97) und InsP<sub>3</sub> induziert die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem ER und somit einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Neben dem ER findet man den InsP<sub>3</sub>-Rezeptor, allerdings in geringeren Mengen, auch in der Zellmembran (98).

Nach der Bildung von InsP<sub>3</sub> entstehen durch mehrere Enzyme noch andere Inositolphosphate, die vermutlich auch zu dem Calcium-Signal beitragen (99), das InsP<sub>3</sub> ist aber der entscheidende *second messenger* in diesem Signalweg.

Ebenfalls in der Membran des ER befinden sich die Ryanodin Rezeptoren (RyR), die ebenfalls eine unspezifische Kationenpore enthalten und u.a. am Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration bei der Muskelkontraktion beteiligt sind. Reguliert werden diese Rezeptoren zum Beispiel durch den *second messenger* cADP-Ribose (100).

### 2.2.3 Einfluß von Ca<sup>2+</sup> auf Transkriptionsfaktoren

Änderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sind von Bedeutung für die Regulation einer großen Anzahl von Genen. Das erste Gen, dessen Transkription als Calcium-sensitiv bestimmt wurde, kodiert für das Protein Prolactin (101). In den zurückliegenden Jahren ist die Liste immer länger geworden, Beispiele dafür zeigt die Tabelle 3.

Ein wichtiger und gut charakterisierter Transkriptionsfaktor, der durch Calcium beeinflusst wird, ist das Mitglied der bZIP-Familie CREB (*cAMP response element binding protein*), das an eine als CRE (*cAMP response element*) bezeichnete DNA-Sequenz bindet (102). Als wichtig für die Regulation der transkriptionsaktivierenden Wirkung von CREB wurden Phosphorylierungen an zwei Positionen beschrieben:

- Ser133: eine Phosphorylierung an dieser, in der transkriptionsaktivierenden Domäne gelegenen Position, aktiviert den Transkriptionsfaktor (103, 104),

**Tab.3:** Beispiele für Gene, deren Transkription durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin beeinflusst werden

Gen	Referenz
c-Fos	(105)
Metallothionein	(106)
GM-CSF ( <i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i> )	(107)
Glucagon	(108)
Phospholipase A2	(109)
<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	(110)

- Ser 142: eine Phosphorylierung an dieser Position inhibiert hingegen die Aktivität von CREB (111).

Beide Stellen werden u.a. durch Vertreter einer Gruppe von Kinasen phosphoryliert, die als CaMK (*calmodulin dependend kinases*) bezeichnet werden und selbst durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex aktiviert werden.

Dabei phosphoryliert CaMK II sowohl Ser 133 als auch Ser142, während CamK IV ausschließlich die aktivierende Position Ser133 phosphoryliert und somit CREB zu aktivieren in der Lage ist (111-113).

Neben der Beeinflussung von CREB durch Calcium wurden mittlerweile auch Effekte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren beschrieben. Ein Beispiel sind die Proteine der bHLH-Familie (*basic helix-loop-helix*). Diese Proteine binden an eine als E-Box bezeichnete Sequenz in der Promotorregion vieler Gene. Eine Beeinflussung einzelner Vertreter der bHLH-Familie durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin wird experimentell durch zwei Versuche nahegelegt:

- Aus Kernfraktionen von Thymuszellen ließen sich einzelne E-Box-bindende Proteine durch Bindung an Calmodulin-Sepharose abtrennen. Die Bindung des bHLH-Transkriptionsfaktors SEF2-1 (114) an eine entsprechende DNA-Sequenz

konnte durch Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin komplett inhibiert und durch Zugabe Calcium-chelatisierender Agentien (EDTA/EGTA) wieder hergestellt werden (115).

- In Transfektionsexperimenten in Jurkat- und K562-Zellen führte eine Behandlung mit Ionomycin (einem Calciumionophor) zur Verringerung der Aktivität des eine E-Box enthaltenden viralen SL3-3 Enhancers. (115).

Ebenfalls Calcium-sensitiv ist offensichtlich der Transkriptionsfaktor AML1, dessen Gen in den meisten Fällen der ALL (akute lymphatische Leukämie) defekt ist (116, 117). So konnte gezeigt werden, daß die AML-1 Bindungsstellen im GM-CSF-Promotor/Enhancer wichtig für die Aktivierung dieses Gens durch Calcium sind (118).

#### 2.2.4 Calcium und das MAPK-Netzwerk

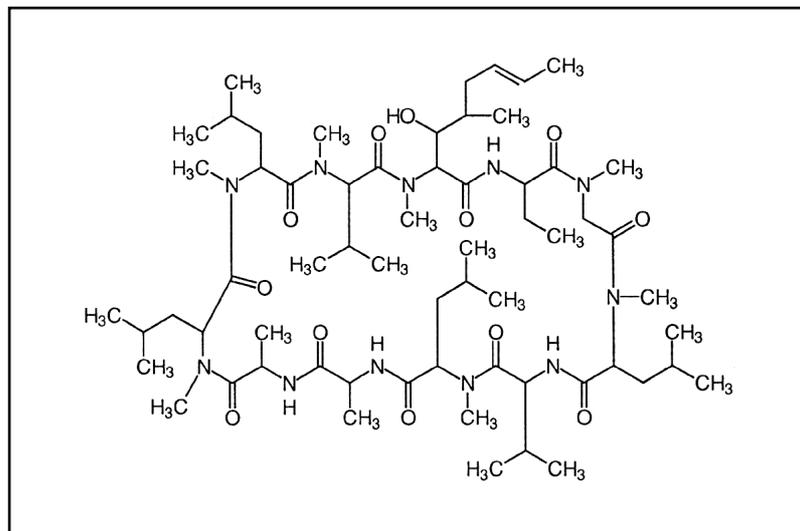
Zu Beginn der Arbeit lagen nur wenige Informationen über die Beeinflussung des MAPK-Netzwerkes durch den *second messenger* Calcium vor. So konnten Su *et al.* 1994 zeigen, daß eine simultane Stimulation von Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat mit dem Phorbolster PMA und dem Calciumionophor Ionomycin SAPK1 zu aktivieren vermag (119). Ionomycin allein hatte allerdings keinen Effekt.

In den letzten vier Jahren wurden dann jedoch immer mehr Experimente über die Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Regulation des MAPK-Netzwerkes veröffentlicht:

- Hohe Konzentrationen von Ionomycin induzieren SAPK1/JNK und SAPK2a in einer humanen B-Zelllinie (120).
- Eine Behandlung der neuronalen Zelllinie PC 12 mit Acetylcholin induziert eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und führt zu einer Aktivierung von MAPKAP-K2 via SAPK2 (121).
- Eine simultane Stimulation von Th1-Zellen der Maus mit PMA und Ionomycin induziert die Phosphorylierung von SAPK2a und SAPK1/JNK (122), der alleinige Effekt von Ionomycin wurde jedoch nicht untersucht.

## 2.3 Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) wurde aus dem Pilz *Tolypogladium inflatum* isoliert und seine immunsuppressive Wirkung erstmals 1976 beschrieben (123). Seit Anfang der 80er Jahre wird CsA im Bereich der Transplantationsmedizin eingesetzt und hat entscheidend zu deren Entwicklung beigetragen, die 1954 mit der ersten erfolgreichen Nierenverpflanzung ihren Anfang nahm. Heute wird CsA nach einer Transplantation in der Regel allein, oder in Kombination mit Cortison und neueren Immunsuppressiva, wie FK506 und Rapamycin eingesetzt. Anwendungsgebiete sind mittlerweile auch Krankheiten wie die Hautkrankheit Psoriasis und der Diabetes Typ I (124).



**Abb.2: Molekulare Struktur von Cyclosporin A.**

Nebenwirkungen des CsA sind vor allem seine Nephro- und Neurotoxizität (125-128) und eine erhöhte Tumorraten in mit CsA behandelten Patienten (129, 130).

### 2.3.1 Wirkungen von CsA auf die Zellen des Immunsystems

#### 2.3.1.1 T-Lymphozyten

CsA ist in der Lage, die Proliferation von T-Lymphozyten bei einer Immunantwort durch Inhibierung des  $G_0$ - $G_1$ -Übergangs zu blockieren. Es inhibiert die Synthese von

Interleukin 2 (IL-2 (131, 132)) und anderer wichtiger Zytokine, wie dem  $\text{IFN}\gamma$  und dem  $\text{TNF}\alpha$  (133).

Daneben werden auch andere Prozesse in T-Lymphozyten durch CsA beeinflusst. So wurde z.B. die Inhibierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Exozytose-Prozessen in T-Lymphozyten beschrieben (134).

### 2.3.1.2 B-Lymphozyten

Bei der Wirkung von CsA auf B-Lymphozyten müssen direkte von indirekten Effekten unterschieden werden. So beeinflusst CsA über die Inhibierung der IL-2-Produktion in T-Lymphozyten natürlich auch die Proliferation von B-Zellen, die auf dieses Zytokin angewiesen sind.

Daneben wurden aber auch direkte Effekte des CsA beschrieben. So inhibiert CsA die Aktivierung von B-Lymphozyten durch anti-Ig-Antikörper, oder durch eine Behandlung mit Ionomycin und PMA (135).

### 2.3.1.3 Monozyten und Makrophagen

Neben den gut beschriebenen Effekten auf T- und B-Lymphozyten liegen in geringerem Umfang auch Daten über direkte Wirkungen von CsA auf Monozyten und Makrophagen vor. So wurde ein inhibierender Effekt auf die Fähigkeit dieser Zellen, T-Lymphozyten zu aktivieren beschrieben (136). Eine Erklärungsmöglichkeit könnte die beobachtete Inhibierung der Expression bestimmter MHC-Moleküle durch CsA sein (137), ein Effekt, der aber von anderen Gruppen nicht gefunden werden konnte (138). Daher ist unklar, in welchem Umfang direkte Wirkungen von CsA auf Monozyten/Makrophagen *in vivo* von Bedeutung sind.

## 2.3.2 Molekulare Mechanismen der CsA Wirkung

### 2.3.2.1 Cyclophiline

CsA und das Immunsuppressivum FK506 binden in der Zelle an Vertreter einer Gruppe von Proteinen, die als Immunophiline bezeichnet werden (139). Dabei lassen sich 2 Gruppen unterscheiden: die Cyclophiline, an die CsA bindet und die FKBP (*FK506 binding proteins*), die FK506 binden. Von beiden Gruppen wurden bislang sieben Vertreter charakterisiert (140).

Diese Proteine weisen eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität auf und sind, von Ausnahmen abgesehen (Cyclophilin C, (141)), ubiquitär exprimiert. Die Bindung von CsA oder FK506 inhibiert die Isomeraseaktivität, es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, inwieweit dieser Effekt zur Wirkung der Immunsuppressiva beiträgt. So konnte zwar gezeigt werden, daß CsA bestimmte Faltungsprozesse im ER inhibiert (142), allerdings sind die zur vollständigen Inaktivierung der Isomeraseaktivität der Immunophilinen notwendigen Konzentrationen von CsA und FK506 höher als die in behandelten Patienten gemessenen (139).

Ein weiteres Resultat der Bindung von CsA/FK506 an die Immunophilinen ist die Dissoziation von Komplexen dieser Proteine mit anderen Interaktionspartnern. So interferiert CsA mit der Bindung des Cyclophilins CyP A mit dem Transkriptionsfaktor YY1, was zu einer Inhibition der YY1-regulierten Expression eines Reporterplasmids führte (143).

### 2.3.2.2 Beeinflussung von Signaltransduktionswegen und der Genregulation

CsA und FK506 greifen entscheidend in die Genregulation in Zellen des Immunsystems ein, wobei mehrere Effekte zu unterscheiden sind:

- die Induktion der Expression eines Gens wird inhibiert (Bsp.: *IL-2* (132)),
- die Induktion der Expression eines Gens wird verstärkt (Bsp.: *egr-1*, (144)) oder
- die Repression der Expression eines Gens wird inhibiert (Bsp.: *CD4*, (145)).

Die zugrundeliegenden Mechanismen werden jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Am besten untersucht ist die Inhibition der enzymatischen Aktivität der Phosphatase Calcineurin (PP2B) durch CsA/Cyclophilin- bzw. FK506/FKBP-Komplexe; ein Effekt, der erstmals 1991 beschrieben wurde (146, 147). Dabei sind weder die Immunsuppressiva, noch die Immunophiline allein in der Lage, Calcineurin zu binden und zu inhibieren.

Ein wichtiges Substrat des Calcineurins ist dabei der Transkriptionsfaktor NF-AT: NF-AT1 liegt in ruhenden Zellen in phosphorylierter Form zytoplasmatisch vor und wird nach einer geeigneten Aktivierung der Zellen durch Calcineurin dephosphoryliert, was seine Translokation in den Kern ermöglicht. Dort verbindet er sich mit einer kernständigen Untereinheit zu dem aktiven Transkriptionsfaktor. Dieser Aktivierungsmechanismus wird durch CsA und FK506 inhibiert, wodurch die Regulation einer großen Anzahl von Genen, darunter *IFN $\gamma$*  beeinflusst wird (148, 149). Daneben gibt es jedoch auch eine ganze Reihe von CsA/FK506-sensitiven Genen, bei deren Regulation bislang keine Beteiligung von NF-AT gezeigt werden konnte (für eine umfassende Liste CsA/FK506-sensitiver Gene siehe (140)).

Neben dem NF-AT wurden in den letzten Jahren noch andere Substrate von Calcineurin beschrieben, von denen hier stellvertretend drei erwähnt werden sollen:

- Es konnte gezeigt werden, daß die NO-Synthase, die das Signalmolekül NO synthetisiert, durch eine Dephosphorylierung durch Calcineurin aktiviert wird (150).
- Calcineurin ist in der Lage, das Protein I $\kappa$ B, einen Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, zu inaktivieren (151).
- In Jurkat-Zellen (eine humane T-Zelllinie) inhibiert CsA die durch eine Behandlung der Zellen mit PMA und Ionomycin induzierte Aktivierung von JNK1 und JNK2 (119). Dies war der erste beschriebene Effekt von CsA auf das MAPK-Netzwerk. Auch hierin ist vermutlich Calcineurin involviert; darauf deutet zumindest das für diese Induktion notwendige Ca<sup>2+</sup>-Signal (durch Behandlung mit Ionomycin) hin.

- Die Kinase DLK wird durch Calcineurin aktiviert und dieser Schritt durch CsA inhibiert (152). DLK ist in der Lage, SAPK1a und SAPK2 zu aktivieren (56).

## 2.4 Src-Kinasen und SH3-Domänen als wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomänen

### 2.4.1 Src-Kinasen: Struktur und biologische Funktionen

Die Src-Kinasen bilden eine Gruppe von Protein-Tyrosinkinase, deren Prototyp, vSrc, im *Rous sarcoma virus* identifiziert wurde (153, 154).

Nach ihrem Expressionsmuster lassen sich Src-Kinasen in drei Gruppen unterteilen:

- die Kinasen Src, Fyn und Yes, die in den meisten Geweben, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, exprimiert werden,
- die Kinasen Blk, Fgr, Hck, Lck und Lyn, die vorwiegend in hämatopoetischen Zellen vorkommen und
- die Kinasen Frk/Rak und Lyk/Bsk, die primär in epithelialen Zellen exprimiert werden.

Strukturelle Merkmale dieser Kinasen sind mehrere Homologie-Regionen (155):

- die SH4 (*src homology 4*)-Domäne, über die die Src-Kinasen mit Lipiden modifiziert werden,
- die SH2-Domäne, über die Interaktionen mit an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen erfolgt,
- die SH3-Domäne, über die Interaktionen mit Prolin-reichen Proteinen erfolgt und
- die katalytische Domäne.

Src-Kinasen sind mit einer großen Anzahl unterschiedlichster Rezeptoren assoziiert (Tab.4) und beeinflussen den Stoffwechsel in vielen verschiedenen Bereichen.

Als Beispiele für von Src-Kinasen beeinflusste biologische Prozesse seien hier erwähnt:

- Zell-Zell-Adhäsionen,

- die Zellbewegung,
- die Kontrolle des Zellzyklus,
- Apoptose und
- Differenzierungsvorgänge.

**Tab.4:** Beispiele für mit Src-Kinasen assoziierte Rezeptoren

Rezeptortyp	Beispiele	Assoziierte Src-Kinase
Rezeptor-Tyrosinkinasen	EGF-Rezeptor	Src, Fyn, Yes
	FGF-Rezeptor	Src
G Protein-gekoppelte Rezeptoren	Thrombin-Rezeptor	Src, Fyn, Yes
	Bradykinin-Rezeptor	Src, Fyn, Yes
Zytokin-Rezeptoren	IL-2-Rezeptor	Fyn, Lck, Lyn
	IL-3-Rezeptor	Fyn, Hck, Lyn
Immunrezeptoren	TCR/CD3	Fyn, Lck
	BCR	Lyn, Blk, Fyn, Fgr, Lck

#### 2.4.2 Die SH3-Domäne: Allgemeines und Struktur

Die SH3-Domäne ist eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die auch außerhalb der Src-Kinasen in einer großen Anzahl unterschiedlicher Proteine zu finden ist. Beispiele für solche Proteine zeigt die Tabelle 5.

Die SH3-Domäne besteht aus einem 5fachen  $\beta$ -Faltblatt, wobei Länge und Zusammensetzung zwischen den SH3-Domänen einzelner Proteine differieren.

#### 2.4.3 Die SH3-Domäne: Ligandenbindung und biologische Bedeutung

SH3-Domänen binden Prolin-reiche Liganden mit einer 7-9 Aminosäuren langen Kernregion, die bei allen bislang identifizierten Liganden das Grundmotiv PXXP enthält.

Detaillierte Untersuchungen hinsichtlich des Bindungsverhaltens wurden beispielsweise für die Kinasen Src und PI3K durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß sich die Liganden in zwei Kategorien unterteilen lassen:

**Tab. 5:** Beispiele für Proteine mit SH3-Domänen

Protein	Funktion
Src-Kinasen	Kinase
PI3K	Kinase
$\alpha$ Spectrin	Bestandteil des Zytoskeletts
Grb2	Adaptor-Protein
Crk	Adaptor-Protein
Nck	Adaptor-Protein
STATs	Transkriptionsfaktoren
NADP-Oxidase-Komplex	Oxidase

- Die Liganden der Klasse I zeichnen sich durch das Motiv RXLPPZP (Z= Leu für Src und Arg für PI3K) aus, wo sich ein Arg-Rest N-terminal des Prolin-Kerns befindet und
- die Liganden der Klasse II, die ein Motiv der Struktur XPPLPXR enthalten, wo sich der Arg-Rest C-terminal der Proline befindet .

Sequenzanalysen zeigen, daß sich nahezu alle Liganden von SH3-Domänen in diese beiden Klassen (ein Arg-Rest N- bzw. C-terminal von dem Prolin-Kern) unterteilen lassen.

Für die Frage, ob ein bestimmtes Protein eine bestimmte SH3-Domäne bindet, sind hinsichtlich der Sequenz vor allem zwei Punkte bedeutsam:

- Während einige SH3-Domänen gleiche Sequenzmotive binden (bspw. Src und Fyn), gibt es deutliche Unterschiede in der bevorzugten Sequenz zwischen anderen SH3-Domänen (bspw. zwischen den Kinasen Src und Abl).

- Neben der eigentlichen Prolin-reichen Kernsequenz sind aber auch die flankierenden Aminosäuren von großer Bedeutung. So ließ sich zeigen, daß die Änderung der das eigentliche Bindungsmotiv umgebenden Aminosäuren die Affinität von SH3-Domänen zu Prolin-reichen Peptiden stark beeinflusst (156).

Wie die Tabelle 5 bereits verdeutlicht, sind Proteine mit SH3-Domänen in unterschiedliche Abschnitte des Stoffwechsels involviert. Im folgenden soll die Bedeutung von SH3-Domänen zusätzlich an mehreren Beispielen aufgezeigt werden:

#### *Beeinflussung der zellulären Lokalisation von Proteinen*

Über SH3-Domänen wird in vielen Fällen die Lokalisation von Proteinen am Zytoskelett und der Zellmembran vermittelt. So ließ sich zeigen, daß die SH3-Domäne von PLC $\gamma$  verantwortlich ist für die Bindung von PLC $\gamma$  an Mikrofilamenten (157). Im Falle des Proteins Grb2 konnte gezeigt werden, daß seine beiden SH3-Domänen essentiell für die Lokalisation an die Zellmembran sind (157).

#### *Beeinflussung der enzymatischen Aktivität von Proteinen*

Durch die Wechselwirkung mit SH3-Domänen wird die enzymatische Aktivität verschiedener Proteine beeinflusst. Ein Beispiel dafür ist die Kinase Src selbst: die Inhibierung der Kinaseaktivität erfolgt durch eine Interaktion ihrer SH2-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosin-Rest im C-terminalen Bereich und eine Interaktion der SH3-Domäne mit einer Prolin-reichen Region zwischen der SH2- und der Kinase-Domäne. Eine Mutation der SH2- oder der SH3-Domäne hebt diese Inhibierung auf (158). Die GTPase Dynamin ist ein weiteres Beispiel. Eine Interaktion mit der SH3-Domäne von Grb2 oder Src aktiviert Dynamin (159).

#### *Bindung von Substraten*

Neben der Beeinflussung der enzymatischen Aktivität scheinen SH3-Domänen auch in die Bindung von Substraten bestimmter Enzyme involviert zu sein, wie bei der

Phosphorylierung des Proteins Crk durch die Src-Kinase Abl gezeigt werden konnte (160).

#### *Interaktion mit viralen Proteinen*

Das HIV-Protein Nef weist eine Prolin-reiche Region auf, über die das Protein mit den SH3-Domänen der zellulären Kinasen Hck und Lyn zu interagieren vermag. Interessanterweise ist diese Prolin-reiche Region essentiell für die beobachtete schnellere Replikation von Nef<sup>+</sup> Viren (161).

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Applichem GmbH (Darmstadt) bezogen. Die Ausnahmen sind in der folgenden Übersicht aufgeführt:

Firma:	Chemikalien:
GibcoBRL (Karlsruhe)	RPMI 1640, Trypsin/EDTA, DMEM
Biochrom KG (Berlin)	Penicillin und Streptomycin
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	p-Cumarsäure, Glutathion, Tris, Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , Ponceau S, Luminol, MOPS
Merck KgaA (Darmstadt)	ZnCl <sub>2</sub> , NaF, Glycerolphosphat (Na-Salz), Methanol, Ethanol, Essigsäure, Magnesiumazetat, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Boehringer-Mannheim GmbH (Mannheim)	Leupeptin, Pepstatin, Aprotonin, Benzamidin
Alexis Deutschland GmbH (Grünberg)	Microcystin LR
Cytogen (Lohmar)	TC199, Ficoll Trennlösung
PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)	FBS
Calbiochem (Bad Soden)	SB 203580, Ionomycin, PMA
Pharmacia Biotech (Freiburg)	Glutathion-Sepharose 4B Protein G-Sepharose 4 ( <i>fast flow</i> )
BioRad (München)	Bradford-Reagenz

Die mit radioaktiven Isotopen markierten Substanzen wurden von den Firmen Amersham (Braunschweig) und Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen.

## 3.2 Lösungen

### 3.2.1 Zellkultur

RPMI-, DMEM-Medium:

Vor der Verwendung wurden dem Medium Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 mg/ml) und Glutamin (2 mM) zugesetzt.

TC 199-Medium:

Vor der Verwendung wurde dem Medium Glutamin mit einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt.

### 3.2.2 Wachstum und Transformation von Bakterien

a) LB-Medium (1l - Ansatz):

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
	pH 7.0

### 3.2.3 Expression von Fusionsproteinen und Aufreinigung

*Variante 1*

a) PBS:

20 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	pH 7.5
150 mM	NaCl	

b) Elutionspuffer:

50 mM	Tris/HCl	pH 8
5 mM	Glutathion (reduziert)	

*Variante 2*

a) STE-Puffer:

10 mM	Tris/HCL	pH 8
150 mM	NaCl	
1 mM	EDTA	

### 3.2.4 Lyse von Zellen

#### a) Fracelton-Lysepuffer:

10	mM	HEPES/HCl pH 8.5	100	$\mu$ M	$\text{Na}_3\text{VO}_4$
50	mM	NaCl	1	mM	Phenylmethansulfonylfluorid
30	mM	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	2.5	$\mu$ g/ml	Leupeptin
5	$\mu$ M	$\text{ZnCl}_2$	0.5	$\mu$ g/ml	Pepstatin
50	mM	NaF	2.8	$\mu$ g/ml	Aprotinin
1	%	Triton-X100	0.5	mM	Benzamidin
			1	mM	DTT

#### b) PBS:

20	mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.5
150	mM	NaCl

#### c) PBS-Waschpuffer:

50	mM	NaF
0.1	mM	$\text{Na}_3\text{VO}_4$ in PBS

#### d) IP-Puffer:

50	mM	Tris/HCl pH 7.5	0.1	%	$\beta$ -Mercaptoethanol
1	mM	EDTA	1	mM	Phenylmethansulfonylfluorid
1	mM	EGTA	2.5	$\mu$ g/ml	Leupeptin
0.5	mM	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	0.5	$\mu$ g/ml	Pepstatin
50	mM	NaF	2.8	$\mu$ g/ml	Aprotinin
5	mM	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	0.5	mM	Benzamidin
10	mM	Natriumglycerophosphat	2	$\mu$ M	Microcystin LR
1	%	Triton X-100			

### 3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### a) Acrylamid:

30	% (w/v)	Acrylamid
2.7	% (w/v)	N,N-Methylen-bis-acrylamid

#### b) SDS-Laufpuffer (10x):

250	mM	Tris
1.92	M	Glycin
1	%	SDS
		(w/v)

#### c) SDS-Probenpuffer (2x)

20	% (w/v)	Glycerin
3	% (w/v)	SDS
5	% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
0.1	% (w/v)	Bromphenolblau

#### d) Coomassie Färbelösung:

0.2	% (w/v)	Coomassie R250
42.5	% (v/v)	Methanol
5	% (v/v)	Ethanol
25	% (v/v)	Essigsäure

#### e) Entfärbelösung I:

45	% (v/v)	Ethanol
5	% (v/v)	Essigsäure

#### f) Entfärbelösung II:

8	% (v/v)	Essigsäure
5	% (v/v)	Methanol

### 3.2.6 Western Blot und Immunfärbung

#### a) Transferpuffer:

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol

#### b) TBST:

10 mM Tris/HCl pH 8.0  
150 mM NaCl  
0.05 % (v/v) Tween 20

#### c) *stripping*-Puffer:

62.5 mM Tris/HCl pH 7.6  
2 % (w/v) SDS  
0.52 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### d) Ponceau S-Färbelösung

0.1 % (w/v) Ponceau S  
0.5 % (v/v) Essigsäure

### 3.2.7 ECL (*enhanced chemiluminescence*)

#### a) Lösung 1:

100 mM Tris/HCl pH 8.5  
2.5 mM Luminol  
0.4 mM p-Cumarsäure

#### b) Lösung 2:

100 mM Tris/HCl pH 8.5  
0.02 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.2.8 GST-pulldown-assay

#### a) HN-Puffer (1.2x):

24 mM Hepes pH 7.4  
120 mM NaCl  
2.4 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.12 mM EDTA  
0.6 % (v/v) NP40  
0.12 % (v/v) Triton X-100

#### b) PBST:

1 % (v/v) Triton X-100  
in PBS

### 3.2.9 Kinase-Assays

#### MAPKAP-K2

#### a) MAPKAP-K2-Kinasepuffer:

1 M  $\beta$ -Glycerophosphat  
2 mM EGTA

#### b) ATP-Reaktionsmix

0.5 mM ATP  
50 mM MgAcetat  
0.3  $\mu$ l <sup>32</sup>P- $\gamma$ ATP (10mCi/ml) pro Reaktion

#### MKK3/MKK6

#### a) MKK3/MKK6-Kinasepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 7.5  
0.1 mM EGTA  
0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
0.1  $\mu$ M Okadeinsäure  
0.1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
10 mM Magnesiumacetat  
0.2 mM ATP

#### b) Stop-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7.5  
0.1 mM EGTA  
0.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
0.1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
1 mg/ml BSA

## c) Reaktionsmix:

10	mM	Mops pH7.0
0.125	mM	EDTA
12.5	mM	Magnesiumacetat
0.125	mM	ATP
2.5	$\mu$ M	PKI
37.5	$\mu$ M	MAPKAP-K2 Substratpeptid
0.3	$\mu$ l	$^{32}$ P- $\gamma$ ATP (10 mCi/ml) je Reaktion

**SAPK4**

## a) SAPK4-Reaktionsmix:

25	mM	Tris/HCl pH 7.5
0.1	mM	EGTA
0.33	mg/ml	MBP
10	mM	Magnesiumacetat
0.1	mM	ATP
0.3	$\mu$ l	$^{32}$ P- $\gamma$ ATP (10 mCi/ml) je Reaktion

**3.2.10 Markierung von Oligonukleotidsonden**

## Klenow-Puffer (10x):

200	mM	Tris/HCl pH 7.6
70	mM	MgCl <sub>2</sub>

**3.2.11 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)**

## a) Hamburger Puffer (10x):

100	mM	Tris/HCl pH 7.5
500	mM	NaCl
10	mM	EDTA
10	mM	DTT
0.5	% (w/v)	Trockenmilch
50	% (v/v)	Glycerin

## b) Probenpuffer (10x):

10	% (v/v)	Glycerin
0.2	% (w/v)	Xylencyanol
0.2	% (w/v)	Bromphenolblau
10	% (w/v)	Ficoll 400
40	mM	EDTA

## c) Acrylamidlösung:

30	% (w/v)	Acrylamid
2.7	% (w/v)	N,N-Methylen-bis-acrylamid

## d) TBE (50x):

500	mM	Tris pH 8.3
530	mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
25	mM	EDTA

**3.2.12 Agarosegelelektrophorese**

## a) Probenpuffer:

50	% (w/v)	Sucrose	100	mM	Tris pH 8.3
0.1	% (w/v)	Bromphenolblau	10.6	mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0.1	% (w/v)	Xylencyanol	0.5	mM	EDTA
1	mM	EDTA pH 8.0			

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Zellkulturtechniken

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten kamen die in Tabelle 6 aufgeführten etablierten Zelllinien zum Einsatz.

**Tab. 6:** Kurzbeschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Kurzcharakteristik	Medium
BJAB	Mensch	B-Zelllinie eines Burkitts Lymphoms	RPMI 1640/ 10 % FBS
Cos-1	Grüne Meerkatze	Fibroblasten-Linie aus Nierengewebe	DMEM/ 10 % FBS
HeLa	Mensch	Epithelium ähnliche Zelllinie aus einem Adenokarzinom	RPMI 1640/ 10% FBS
Jurkat	Mensch	Zelllinie einer akuten T-Zell Leukämie	RPMI 1640/ 10% FBS
U937	Mensch	Monozyten-ähnliche Zellen eines histiozytären Lymphoms	RPMI 1640/ 10% FBS

Dabei handelt es sich bei BAJB, Jurkat und U937 um Suspensionszellen, bei Cos-1 und HeLa um adhärent wachsende Zellen. Die letzteren wurden in Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) herangezogen. Nach dem Erreichen des konfluenten Stadiums wurden die Zellen durch eine Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0.25% / 1 mM; GIBCO BRL, Karlsruhe) für 5 min bei 37°C abgelöst, aus der Lösung

abzentrifugiert (200g, 5 min, RT) und mit frischem Medium in einer geeigneten Verdünnung neu ausgesät.

### 3.3.2 Präparation verschiedener Zellpopulationen des peripheren Blutes

#### *Präparation von PBMC*

Grundlage der meisten Experimente waren Zellen einer primären Zellpopulation, die im folgenden als PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) bezeichnet wird und die T- und B-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen des peripheren humanen Blutes umfaßt.

Die Präparation dieser Zellen erfolgte ausgehend von sogenannten *buffy coats* von gesunden Blutspendern durch Dichtegradientenzentrifugation in einem Ficoll-Gradienten. Dazu wurden in drei 50 ml Falcon-Röhrchen je 10 ml Ficoll ( $\rho = 1.077 \text{ g/cm}^3$ ) vorgelegt, der Inhalt eines *buffy coats* (ca. 50 ml der Zellsuspension) mit 1 ml Heparin (500 I.E./ml, Novo Nordisk Pharma GmbH) vermischt, auf 90 ml mit TC199 aufgefüllt und gleichmäßig über das Ficoll geschichtet. Durch die anschließende Zentrifugation (400xg, 30 min, RT) entstehen in dem Gradienten mehrere Banden: Bande 1 befindet sich direkt an der Grenze Ficoll/Plasma und enthält die PBMC, Bande 2 befindet sich überhalb des Erythrozyten-Pellets und enthält den Großteil der Granulozyten. Die Zellen der Bande 1 wurde abgezogen und zweimal mit TC199 gewaschen (200xg, 10 min). Anschließend wurden Zellzahl und Vitalität durch die Färbung eines Aliquots mit Trypanblau bestimmt.

#### *Präparation von T-Lymphozyten*

Die Abtrennung der T-Lymphozyten aus den PBMC erfolgte durch eine Bindung dieser Zellen an SRBC (*sheep red blood cells*, zur Verfügung gestellt von Dr. R. Schwintzer, Medizinische Hochschule Hannover). Grundlage dafür ist eine Interaktion zwischen dem Oberflächenmolekül T11TS auf den SRBC und dem Molekül CD2. Das CD2 Protein wird ausschließlich von T-Lymphozyten und ca. 50% der NK-Zellen produziert.

Die PBMC wurden mit einer Dichte von  $6.67 \times 10^6$  Zellen in TC199 aufgenommen, im Verhältnis 9:1 mit vorbereiteten SRBC vermischt und 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Rosetten abzentrifugiert (200xg, 15 min, RT) und der Ansatz zur Stabilisierung der Rosetten 30 min auf Eis inkubiert. Das Rosetten-Pellet wurde dann vorsichtig resuspendiert, der Ansatz mit 10 ml Ficoll unterschichtet und erneut zentrifugiert (400xg, 30 min, RT). Nach der Zentrifugation befinden sich die  $\text{CD2}^-$ -Zellen an der Grenze Ficoll/Medium, während sich die Rosetten aus  $\text{CD2}^+$ -Zellen und SRBC im Pellet befinden. Die  $\text{CD2}^-$ -Zellen wurden abgenommen und zweimal mit TC199 gewaschen (200xg, 10 min, RT). Die Rosetten wurden zur Lyse der SRBC in bei  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (140 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.7 mM Tris/HCl pH 7.2) resuspendiert und bis zum Aufklaren der Lösung geschwenkt (ca. 1 min). Anschließend wurde die Lösung sofort mit 30 ml TC199 verdünnt und die Zellen noch zweimal mit TC199 gewaschen (200xg, 10 min, RT). FACS-Analysen der isolierten Zellen durch Dr. A. Rühlmann (Institut für Molekularbiologie der MHH) und Dr. R. Jacobs (Institut für klinische Immunologie der MHH) ergaben, daß die  $\text{CD2}^+$  Population zu ca. 95%  $\text{CD2}^+$  Zellen und zu ca. 78%  $\text{CD2}^+/\text{CD3}^+$ -Zellen (= T-Lymphozyten) enthielt. Die  $\text{CD2}^-$  Population enthielt überwiegend B-Lymphozyten, Monocyten/Makrophagen,  $\text{CD2}^-$  NK-Zellen und weniger als 5% T-Lymphozyten.

### 3.3.3 Proteintechniken

#### 3.3.3.1 Stimulation der Zellen und Gewinnung von Ganzellextrakten

Die Blutzellen wurden mit einer Dichte von  $10\text{-}16 \times 10^6/\text{ml}$  in RPMI/0.5% FBS aufgenommen und 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit 400 nM CsA (zur Verfügung gestellt von Dr. U. Christians, Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) oder unterschiedlichen Konzentrationen des p38-Inhibitors SB 203580 inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen parallel mit DMSO, dem Lösungsmittel von CsA und SB203580, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit  $2 \mu\text{M}$  Ionomycin oder mit  $2 \mu\text{M}$  Ionomycin plus 20 ng/ml PMA induziert und weiterhin bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Als

Kontrolle wurden die Zellen wieder mit DMSO inkubiert; Ionmycin und PMA wurden als 1000x konzentrierte Vorratslösungen in DMSO verwendet. In den Fällen, wo Zellen länger als 60 min behandelt wurden, wurde an dieser Stelle FBS mit einer Endkonzentration von 10% zugesetzt, als Kontrolle wurden in solchen Fällen ein Teil der Zellen mit DMSO und 10% FBS inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 3000 rpm, 1 min, 4°C), mit PBS-Waschpuffer (4°C) gewaschen und mit Fracelton-Lysepuffer oder IP-Puffer lysiert. Zurückbleibende Zellfragmente wurden abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C, 13000rpm, 20 min, 4°C) und die Überstände in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### 3.3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts der Ganzzellextrakte erfolgte nach der Methode von Bradford (162), deren Grundlage die Bindung des Farbstoffes "Coomassie Brilliant Blue G250" an Proteine ist. Diese Bindung läßt sich leicht durch Messung der damit verbundenen Absorptionsänderung bei 595 nm quantifizieren. Zur Eichung wurde BSA eingesetzt.

#### 3.3.3.3 Antiseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren faßt die Tabelle 7 zusammen.

#### 3.3.3.4 Immunpräzipitation (IP)

##### *Immunpräzipitation von Kinasen des MAPK-Netzwerkes*

Pro Reaktion wurden 3 µg (anti-MAPKAP-K2) bzw. 5 µg (anti-SAPK4, anti-MKK3/6) Antiserum mit 10 µl Protein G-Sepharose (50%ig in PBS) für 30 min bei 4°C in PBS inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose zweimal mit IP-Puffer (4°C) gewaschen und mit einer finalen Konzentration von 50% in IP-Puffer aufgenommen. Die so mit dem Antiserum beladene Sepharose wurde dann mit 50 µg Ganzzellextrakt für 2h bei 4°C

**Tab. 7:** Übersicht über die eingesetzten Antiseren

Antiserum	Charakteristik	Bezogen von
phosphospezifisch anti-p38/SAPK2a (Tyr182)	polyklonal	New England Biolabs, Schwalbach
anti-p38/SAPK2	polyklonal	New England Biolabs, Schwalbach
phosphospezifisch anti-ATF-2 (Thr71)	polyklonal	New England Biolabs, Schwalbach
anti-ATF-2	polyklonal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• New England Biolabs, Schwalbach</li> <li>• Santa Cruz, Heidelberg</li> </ul>
phosphospezifisch anti-CREB (Ser133)	polyklonal	New England Biolabs, Schwalbach
anti-CREB	polyklonal	New England Biolabs, Schwalbach
phosphospezifisch anti-JNK/SAPK1 (Thr 183 und Tyr185)	polyklonal	New England Biolabs, Schwalbach
anti-JNK/SAPK1	polyklonal	New England Biolabs, Schwalbach
anti-MAPKAP-K2	polyklonal	Labor von Prof. Sir P. Cohen, Dundee, Großbritannien
anti-MKK6	polyklonal	Labor von Prof. Sir P. Cohen, Dundee, Großbritannien
anti-MKK3	polyklonal	Labor von Prof. Sir P. Cohen, Dundee, Großbritannien
anti-SAPK4	polyklonal	Labor von Prof. Sir P. Cohen, Dundee, Großbritannien
anti-FLAG	monoklonal bzw. monoklonal, an eine Agarose-Matrix gekoppelt	Kodak, New Haven, USA
anti-PLC $\gamma$ 1	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

**Tab. 7 (Fortsetzung):** Übersicht über die eingesetzten Antiseren

Antiserum	Charakteristik	Bezogen von
anti-cSrc	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-ERK	monoklonal	Transduction Laboratories
anti-GFP	monoklonal	Clontech, Heidelberg

inkubiert und anschließend zweimal mit IP-Puffer (+0.5M NaCl) und zweimal mit IP-Puffer gewaschen.

Alle Inkubationen wurden dabei auf einem Rad bzw. einem Schüttler durchgeführt und parallel Kontrollen ohne Antiserum mitbehandelt

#### *Immunpräzipitation von PRPL2, PLC $\gamma$ und cSrc*

##### PLC $\gamma$ und cSrc:

Die Protein G-Sepharose wurde fünfmal mit kaltem PBS (4°C) gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen (25%ig). Für jede IP wurden 100  $\mu$ g Zellextrakt mit 17  $\mu$ l Protein G-Sepharose und 5  $\mu$ l Präimmunsereum (PIS) in IP-Puffer für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C, 13000 rpm, 15 sek) und zu dem Überstand 1  $\mu$ g des jeweiligen Antiserums oder eine vergleichbare Menge PIS zugegeben und der Ansatz 2h bei 4°C inkubiert. Um die gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe abzutrennen wurden zu den Ansätzen je 40  $\mu$ l gewaschene Protein G-Sepharose gegeben und erneut für 3h bei 4°C inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler oder einem sich drehenden Rad durchgeführt. Die Sepharose wurde dann abzentrifugiert, zweimal mit IP-Puffer gewaschen und in SDS-Probenpuffer (2x konzentriert) aufgenommen.

##### PRPL2:

Die IP erfolgte analog zu PLC $\gamma$  und cSrc, es wurden jeweils 6  $\mu$ l anti-PRPL2-Antiserum oder PIS eingesetzt.

## FLAG:

Zur Immunpräzipitation von mit FLAG fusionierten Proteinen wurde ein monoklonaler anti-FLAG-Antikörper eingesetzt, der kovalent an Agarose gebunden war. Die Agarose wurde vor der IP viermal mit PBS (4°C) gewaschen und dann in PBS aufgenommen (30%ig).

Jeweils 100 µg Zellextrakt wurden mit 17 µl gewaschener Protein G-Sepharose (siehe IP von PLC $\gamma$  und cSrc) und 2 µl PIS für 30 min bei 4°C in IP-Puffer (+150 mM NaCl+0.1% NP40) inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C, 13000 rpm, 15 sek.) und zu den Überständen je 30 µl FLAG-Agarose oder 1,5 µg des monoklonalen anti-Erk-Antikörpers zugegeben. Diese Ansätze wurden 2h bei 4°C inkubiert, dann wurden der Erk-IP 40 µl gewaschene Protein G-Sepharose zugegeben und die Ansätze für weitere 3h bei 4°C inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler oder einem sich drehenden Rad. Zuletzt wurden die Agarose und Sepharose abzentrifugiert, zweimal mit IP-Puffer (+150 mM NaCl+0.1% NP40) gewaschen und in SDS-Probenpuffer (2x konzentriert) aufgenommen.

### 3.3.3.5 Kinase-Assays

#### MAPKAP-K2

Die Messung der MAPKAP-K2 Aktivität erfolgte in einem *in vitro* Kinase-Assay unter Verwendung des Peptids KKLNRTLSVA als Substrat (163). Dazu wurde der Reaktionsansatz

5 µl	immunpräzipitierte Kinase
2.5 µl	MAPKAPK-K2-Kinasepuffer
2.5 µl	50 µM PKI (TTYADFIASGRTGRRNAIHD; inhibiert Proteinkinase A (32))
2.5 µl	600 µM Substratpeptid
0.05 µl	$\beta$ -Mercaptoethanol
27.5 µl	H <sub>2</sub> O

3 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 10 µl ATP-Reaktionsmix gestartet. Nach einer 10 minütigen Reaktion bei 30°C unter leichtem Schütteln wurde der Ansatz zum Abstoppen auf P81-Filterpapier (Fa. Whatman;

2x2 cm) pipettiert und nicht umgesetztes ATP durch intensives Waschen der Filter mit 75 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5x5 min) entfernt. Die Filter wurden dann abschließend mit Aceton gewaschen, getrocknet, mit Flüssigszintillator versetzt und die Menge an eingebauter Radioaktivität in einem Szintillationsmeßgerät der Fa. Beckman gemessen. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz (Immunpräzipitation und Kinase-Assay) ohne anti-MAPKAP-K2-Antikörper mitgeführt.

### *MKK3/MKK6*

Die Bestimmung der Aktivitäten von MKK3 und MKK6 in den Ganzzellextrakten erfolgte durch Messung der Fähigkeit der immunpräzipitierten Kinasen, den Signalweg MKK3/6-p38-MAPKAP-K2 zu aktivieren. Dazu wurden den immunpräzipitierten Kinasen in einem *in vitro* Assay inaktive p38 $\alpha$  und inaktive, rekombinante GST-MAPKAP-K2 als Substrat angeboten. Die finale Aktivierung der GST-MAPKAP-K2 wurde dann über einen *in vitro* Kinase-Assay mit dem Peptid KKLNRTLSVA als Substrat und <sup>32</sup>P- $\gamma$ ATP gemessen.

5  $\mu$ l der immunpräzipitierten Kinasen wurden mit 350 ng inaktiver p38 $\alpha$  in MKK3/6-Kinasepuffer (finales Volumen 20  $\mu$ l) für 20 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 40  $\mu$ l eiskaltem Stop-Puffer abgestoppt.

Als nächstes wurden 5  $\mu$ l GST-MAPKAP-K2 (65  $\mu$ g/ $\mu$ l in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.3 % Brij-35, 0.1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 5 % Glycerol) mit 3  $\mu$ l des obigen Reaktionsansatzes und 2  $\mu$ l 50 mM Magnesiumacetat/0.5 mM ATP vermischt und 15 min bei 30°C und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 40  $\mu$ l Reaktionsmix zugegeben, der Ansatz für 10 min bei 30°C und leichtem Schütteln inkubiert und die Reaktion dann durch Aufpipettieren auf P81-Filter (je 2x2 cm) gestoppt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zum MAPKAP-K2 Assay. In einem Kontrollansatz wurde der Assay ohne die inaktive p38 $\alpha$  durchgeführt.

### SAPK4

Grundlage der Bestimmung der SAPK4-Aktivität war ein *in vitro* Assay der immunpräzipitierten Kinase mit MBP (*myelin basic protein*) als Substrat (18). Dazu wurden 5 µl immunpräzipitierte Kinase in SAPK4-Reaktionsmix (50 µl finales Volumen) für 10 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert und die Reaktion dann durch aufpipettieren des Ansatzes auf P81-Filter (2x2 cm) abgestoppt. Die weitere Behandlung erfolgte analog zum MAPKAP-K2 Assay.

In der graphischen Auswertung aller angeführten Assays sind die relativen Kinaseaktivitäten bezogen auf unbehandelte Zellen dargestellt.

#### 3.3.3.6 SDS-PAGE

Die gelelektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte unter Verwendung der Methode von Laemmli unter denaturierenden Bedingungen. Verwendet wurden die Systeme Mighty Small™ der Fa. Hofer und Mini-PROTEAN®II der Fa. BioRad, wobei Trenn- und Sammelgel folgende Zusammensetzung hatten:

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid	4 %	12.5 %
SDS	0.1 %	0.1 %
Tris/HCl pH 6.8	125 mM	--
Tris/HCl pH 8.8	--	375 mM

Zur Polymerisation wurden APS und TEMED mit einer Endkonzentration von jeweils 0.1% zugegeben.

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit 2x SDS-Probenpuffer vermischt, 2-3 min bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgegeben. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 30 mA (Hofer) oder 50 mA (BioRad), bis der Farbmarker die untere Gelkante erreicht hatte.

Als Molekulargewichtsstandard wurden entweder der „Proteinmolekulargewichtsstandard (hoher Bereich), *prestained*“ der Fa. GIBCO oder der „*Rainbow*™

*Protein Molecular Weight Marker*“ der Fa. Amersham eingesetzt. Bei der Analyse von radioaktiv markierten Proteinen wurde ein mit  $^{14}\text{C}$  markierter Molekulargewichtsstandard der Fa. Amersham verwendet.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder für einen Western Blot eingesetzt oder mit dem Farbstoff "Coomassie Brilliant Blue" gefärbt. Dafür wurde das Gel 15 min bei RT in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend 15 min mit der Entfärbelösung I und über Nacht mit der Entfärbelösung II bei RT inkubiert.

### 3.3.3.7 Western Blot

Für die Western Blot-Analysen wurde die Nitrozellulosemembran Optiran BA-S85 der Fa. Schleicher und Schuell (Dassel) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte in zwei unterschiedlichen Verfahren in zwei verschiedenen Apparaturen:

#### *Variante I:*

Für die in den Abbildungen 5-7 und 10 gezeigten Experimente erfolgte der Blot als "semi dry blot" mit der *TRANS-BLOT SD cell* der Fa. Bio-Rad (München). Dabei erfolgte der Transfer der Proteine in folgendem Aufbau:

- Kathode
- 3x Filter (3MM-Papier der Fa. Whatman), in Transferpuffer getränkt
- Gel
- Membran, in Transferpuffer getränkt
- Filter wie in 2.
- Anode

Bedingungen für den Transfer: konstant  $0.8 \text{ mA/cm}^2$  für 2h.

#### *Variante II:*

Für die in den Abbildungen 12-14, 19-22 und 24 gezeigten Experimente wurde ein Tank-Blot in der Apparatur "MiniTrans Blot" der Fa. Bio-Rad durchgeführt. Der Transfer erfolgte in folgendem Aufbau:

- Kathode
- 3MM-Papier, in Transferpuffer eingeweicht
- Gel
- Membran, in Transferpuffer eingeweicht
- Filter wie in 2.
- Anode

Bedingungen für den Transfer: 120 V konstant für 70 min in Transferpuffer.

### 3.3.3.8 Immunfärbung

Die Immunfärbung der Membranen erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Blocken der unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen durch Inkubation der Membran für 1 h in TBST/5% Milchpulver bei RT,
2. Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST/5% Milch bzw. TBST/5% BSA (im Falle der phosphospezifischen Antikörper), 12-14 h bei 4°C oder 1h bei RT,
3. 3x5 min mit TBST waschen,
4. Inkubation mit dem sekundären Antikörper, 1:2500 in TBST/5% Milch verdünnt, 1 h bei RT,
5. 3x5 min mit TBST waschen.

Zur Analyse wurde das ECL (*enhanced chemiluminescence*) System verwendet. Dazu wurde die Membran für 1 min mit einer 1:1-Mischung der ECL-Lösungen 1 und 2 inkubiert und anschließend die Signale durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm oder unter Verwendung der Chemilumineszenzkamera LAS-1000 der Fa. Fuji (Tokyo, Japan) detektiert.

Um die gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde der Blot 40 min bei 65°C in *stripping*-Puffer inkubiert, dann mit TBST gespült und 3x6 min in TBST gewaschen.

Zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen wurde die Membran in einzelnen Fällen noch mit dem Farbstoff Ponceau S gefärbt. Dazu wurde die Membran 5-10 min

in der Ponceau-Färbelösung bei RT inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt.

### 3.3.3.9 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden die folgenden Fusionsproteine verwendet:

Fusionsprotein	Organismus	Anmerkungen
GST-PLC $\gamma$ 1 (SH3-Domäne)	<i>Homo sapiens</i>	-
GST-p85 (SH3-Domäne)	<i>Homo sapiens</i>	-
GST-GAP (SH3-Domäne)	<i>Homo sapiens</i>	-
GST-Crk (SH3-Domäne)	<i>Homo sapiens</i>	-
GST-cSrc (SH3-Domäne)	<i>Gallus gallus</i>	Bis auf eine Aminosäure identisch zum humanen Protein (Position 45 der SH3-Domäne: Ser (human)/Thr ( <i>Gallus gallus</i> ))
GST-NSrc (SH3-Domäne)	<i>Gallus gallus</i>	Enthält eine Insertion eines 6-Aminosäure-Peptides in der SH3-Domäne
GST-cSrc (komplett)	<i>Mus musculus</i>	Hoch homolog zum humanen Protein, Unterschiede in nur 6 Aminosäuren außerhalb der SH3-Domäne

Bezogen wurden die Expressionsvektoren für diese Proteine vom Labor von Prof. Dr. C. A. Cartwright (*Stanford University School of Medicine*; c-Src (komplett)) und vom Labor von Dr. G. Superti-Furga, EMBL Heidelberg). Die Gene für die Fusionsproteine standen dabei unter Kontrolle eines *tac*-Promoters.

Die Expression der Proteine erfolgte in dem *E.Coli*-Stamm BL21 (DE3)pLysS, die Transformation der Zellen wird im Abschnitt 3.3.4.5 beschrieben. Die anschließende Aufreinigung erfolgte in zwei Varianten:

*Variante I:*

Eine 20 ml über-Nacht-Kultur der transformierten Bakterienzellen (siehe Abschnitt 3.3.4.5) wurde in 600 ml LB-Medium (60 µg/ml Ampicillin) überführt und der Ansatz für 2h bei 37°C inkubiert. Die Induktion des *tac*-Promotors erfolgte dann durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1.2 mM. Die Zellen wurden dann für weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend abzentrifugiert (Beckman Rotor JA-10, 15 min, 5000 rpm, RT) und in 15 ml PBS (4°C) resuspendiert. Aufgeschlossen wurden die Zellen durch eine Ultraschall-Behandlung (5x45 sek., je 30 sek Pause; 4°C) und es wurde zusätzlich Triton X-100 zu 1% (v/v) zugesetzt. Die Zellbruchstücke wurden dann durch eine Zentrifugation abgetrennt (Beckman Rotor JA 20, 5 min, 10000 rpm, 4°C).

Die Isolation der Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von 5 ml Glutathion-Sepharose (Pharmacia) zum Überstand. Die Sepharose wurde vorher nach Herstellerangabe in PBS gequollen, mit PBS gewaschen und 50%ig in PBS aufgenommen.

Der Ansatz wurde für mehrere Stunden auf einem sich drehenden Rad bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, die Sepharose abzentrifugiert (5 min, 114g, 4°C), dreimal mit PBS (4°C) gewaschen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 1 ml Elutionspuffer und einer 2 min-Inkubation bei RT. Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert (15 sek. 500g), der Überstand abgenommen und diese Elution noch dreimal wiederholt.

Den Eluaten wurde Glycerin zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) zugesetzt und sie wurden bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Aliquots der Eluate zusammen mit bekannten Mengen an BSA auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, das Gel mit Coomassie gefärbt und die Intensität der Banden verglichen.

Diese Variante wurde zur Aufreinigung aller Fusionsproteine außer GST-cSrc(komplett) eingesetzt. Durchgeführt wurde sie von Patricia Delany-Heiken am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

*Variante II:*

Alle zum Aufbruch der Bakterienzellen und zur Aufreinigung des Proteins eingesetzte Lösungen enthielten 1 mM PMSF.

Eine 10 ml über-Nacht-Kultur der transformierten Bakterien wurde in 200 ml LB-Medium (60 µg/ml Ampicillin) überführt und der Ansatz 4h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde IPTG bis zu einer Konzentration von 0.96 mM zugegeben und die Inkubation für 2h bei 30°C fortgesetzt. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (Sorvall Rotor GS3, 5000 rpm, 15 min, 4°C), das Pellet in 20 ml STE-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und 1h bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde Lysozym mit 0.1 mg/ml zugegeben, der Ansatz 20 min bei 4°C auf einer Wippe inkubiert und dann DTT zu einer Endkonzentration von 20 nM zugesetzt. Um die Lyse der Zellen zu vervollständigen, wurden dann 3.5 ml einer Lösung von 10% Sarcosyl in STE-Puffer zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und durch eine Injektionsnadel gezogen (3x Typ 20G1, 2x Typ 23G1). Daran schloß sich noch eine Ultraschallbehandlung (4°C) mit folgenden Parametern an :

- 1) Gerät: Sonifier 250 der Fa. BRANSON (Dietzenbach)
- 2) Zeit: 5x20 sek. (je 30 sek. Pause)
- 3) *Output*: 4
- 4) *Duty cycle*: 40%

Die verbliebenen Zellbruchstücke wurden anschließend abzentrifugiert (Sorvall Rotor SS34, 15 min, 10000 rpm, 4°C).

Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurde der Überstand mit 0.5 ml Glutathion-Sepharose versetzt (Vorbereitung wie in Version I) und über Nacht auf einer Wippe bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Sepharose abzentrifugiert (5 min, 114g, 4°C), dreimal mit PBS gewaschen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Zum Abschätzen der Menge des gebundenen Proteins wurde ein Aliquot wie in Version I beschrieben auf einem SDS-PAGE-Gel getestet.

Diese Version der Proteinisolation wurde zur Aufreinigung des GST-cSrc (komplett)-Fusionsproteins verwendet.

### 3.3.3.10 Gekoppelte *In vitro* Transkription und Translation (IVTT)

Die IVTT eines Protein erfolgte unter Verwendung der TNT-Methode der Fa. Promega mit <sup>35</sup>S-Methionin. Als Quelle für die Transkriptions/Translations-Maschinerie wurde dabei Retikulozytenlysat in dem unten angegebenen Ansatz verwendet.

Dieser Ansatz wurde 80 min bei 37°C inkubiert, anschließend ein Aliquot im SDS-Gel analysiert und der Rest in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

25	µl	Lysat
2	µl	TNT-Puffer
1	µl	RNA-Polymerase (T7 oder T3)
1	µl	1 mM Aminosäuremix ohne Methionin
1	µl	RNAsin
4	µl	<sup>35</sup> S-Methionin
x	µl	DNA (1 µg)
(16-x)	µl	H <sub>2</sub> O

### 3.3.3.11 GST-*pull-down*-assay

Dieser Assay wurde zur Analyse von *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Grundlage ist die spezifische Bindung von Fusionsproteinen von GST (Glutathion-S-Transferase) und den SH3-Domänen verschiedener Proteine an mit Glutathion beladener Sepharose.

Das Protokoll dieses Assays orientiert sich an (164).

Die Glutathion-Sepharose (Pharmacia) wurde zuerst mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in PBS aufgenommen (50%). 40 µl dieser *beads* wurden dann mit 1 µg GST-Fusionsprotein in 100 µl PBST für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit PBS (4°C) gewaschen (4x) und zusammen mit dem *in vitro*-transkribierten/translatierten Protein mit 125 µl 1,2x HN-Puffer für 3 h bei 4°C inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurde auf einem Rad bzw. Schüttler durchgeführt. Zum Abschluß wurde die Sepharose mit 1,2x HN-Puffer (4°C) gewaschen (5x) und in SDS-Ladungspuffer (2fach konzentriert) aufgenommen. Die Ansätze wurden dann 3 min bei 95°C inkubiert, abzentrifugiert und die Überstände in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, bis der Frontmarker die untere Gelkante erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel getrocknet und mit Hilfe eines Phosphoimagersystems der Fa. Fuji ausgewertet, oder auf einen Röntgenfilm exponiert.

Die Pulldown-Assays unter Verwendung von Ganzzellextrakten erfolgten ebenfalls nach diesem Protokoll mit folgenden Modifikationen:

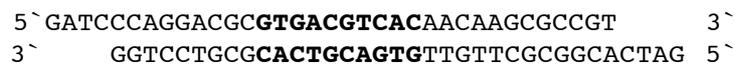
- Menge der GST-Fusionsproteine: je 5 µg
- Menge Zellextrakt: 150 µg
- Inkubationszeit der beladenen Sepharose mit dem Zellextrakt: 4h, 4°C
- Anzahl der Waschschriffe in 1.2x HN-Puffer: 3.

### 3.3.4 DNA-Techniken

#### 3.3.4.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotidsonden

Zur Analyse der *in vitro* Bindung bestimmter Proteine an Promotorsequenzen wurden folgende Oligonukleotidsonden aus dem DNA Polymerase β Promotor eingesetzt (Position -57 bis -27 des humanen Promotors; die CRE-Sequenz ist markiert):

a) CRE:



b) mCRE (mutierte CRE-Sequenz):



Die radioaktive Markierung erfolgte durch Auffüllen der Stränge in einer DNA-Polymerase-Reaktion unter Verwendung der Klenow-Polymerase und von <sup>32</sup>P-αdATP in folgendem Ansatz:

7.0 µl	Oligonukleotid (3 pmol)
38.0 µl	H <sub>2</sub> O
6.0 µl	10x Klenow-Puffer
2.0 µl	<sup>32</sup> P-αdATP (10 mCi/ml)
2.0 µl	10 mM dCTP
2.0 µl	10 mM dTTP
2.0 µl	10 mM dGTP
1.0 µl	Klenow-Polymerase (Fa. Boehringer Mannheim)

Dieser Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und die freien Nukleotide anschließend über eine Sephadex-Säule, wie vom Hersteller angegeben, abgetrennt (165). Die

Messung der Einbaurrate erfolgte mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers der Fa. Beckman.

#### 3.3.4.2 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Der EMSA ist ein Verfahren zur *in vitro* Analyse von DNA-Protein-Komplexen, dessen Grundlage die unterschiedliche Mobilität von freier DNA und DNA-Proteinkomplexen in einem nativen Polyacrylamidgel ist.

Dazu wurden jeweils 2-4  $\mu$ l Ganzzellextrakt mit der jeweiligen DNA-Sonde 30 min bei RT in folgendem Ansatz inkubiert:

1 $\mu$ l	Hamburger Puffer (10x)
0.1 $\mu$ l	1 M DTT
0.5 $\mu$ l	poly(dIdC) (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)
x $\mu$ l	DNA-Sonde (20000 cpm)
(8.4-x) $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
2-4 $\mu$ l	Ganzzellextrakt

Dabei wurde poly(dIdC) zur Absättigung von unspezifischen DNA-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Der Ansatz wurde dann mit 1  $\mu$ l Probenpuffer (10x konzentriert) gemischt und in einem 5%igem Polyacrylamidgel mit 0.5% TBE als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 10-12 V/cm aufgetrennt. Der Lauf wurde abgestoppt kurz bevor der 2. Marker (Xylencyanol) die untere Gelkante erreicht hatte, das Gel getrocknet und mit Hilfe eines Phosphoimagersystems der Fa. Fuji (Tokyo, Japan) ausgewertet, oder auf einen Röntgenfilm exponiert.

Wenn die Wirkung von Antiseren untersucht wurde, wurden die einzelnen Ansätze ohne die Oligonukleotidsonde 30 min bei RT mit 2  $\mu$ l des jeweiligen Antiserums inkubiert, anschließend die Sonde zugegeben und wie oben angegeben weiter inkubiert.

#### 3.3.4.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für den Restriktionsverdau des Plasmids pEXL (Anhang 5) wurden die Restriktionsendonukleasen XmnI und NdeI (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Dabei wurden jeweils 10  $\mu$ g DNA mit 40 U des Enzyms in NEBuffer #4

(Ndel) oder NEBuffer #2(Xmnl) und 100 µg/ml BSA (Xmnl) bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde je ein Aliquot in einer DNA-Agarosegelelektrophorese analysiert und in den restlichen Ansätzen die Enzyme durch Inkubation bei 65°C für 20 min inaktiviert

#### 3.3.4.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Proben für die Elektrophorese wurden mit Ladungspuffer (10x konzentriert) vermischt und in einem 0.8%igen Agarosegel (0.8% (w/v) Agarose in TBE) aufgetrennt. Dem Gel wurde zur Detektion der DNA 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, als Laufpuffer diente TBE. Der Ladungspuffer enthielt als Marker Bromphenolblau und Xylencyanol, die Gelläufe wurden bei konstant 80V durchgeführt.

#### 3.3.4.5 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien erfolgte durch Hitzeschock, eingesetzt wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (Genotyp: siehe Anhang 1).

Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 0.1 µg DNA zugegeben. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis und anschließend für 45 sek bei 42°C inkubiert. Dann wurden 800 µl LB-Medium zugesetzt, der Ansatz für 1h unter leichten Schütteln bei 37°C inkubiert, in 10-20 ml LB-Medium (60 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C auf einem sich drehenden Rad inkubiert.

#### 3.3.4.6 Transfektion von eukaryontischen Zelllinien

Die Transfektion der HeLa und Cos-1 Zellen erfolgte durch Elektroporation in dem GenePulser II der Firma BioRad (München).

Die Zellen wurden am Tag vorher 1:2 mit frischem RPMI verdünnt, vor der Transfektion gezählt und mit einer Dichte von  $3 \times 10^7$  Zellen/ml in RPMI ohne Serum aufgenommen. Jeweils 0.5 ml der Zellsuspension wurden mit 20 µg DNA vermischt und in einer Elektroporationsküvette (BioRad) 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte anschließend mit  $U=180V$  und  $R=950 \mu F$  (HeLa) bzw.  $U=$

250V und  $R=500\mu\text{F}$  (Cos-1), gefolgt von einer Inkubation von 5 min auf Eis. Der Ansatz wurde dann mit 10 ml RPMI/10% FBS in eine Zellkulturschale überführt und die Zellen im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation des Proteins PRPL-2 wurden HeLa-Zellen mit einem Expressionsvektor für ein Fusionsprotein EGFP-PRPL2, oder einem Expressionsvektor für EGFP transfiziert (Vektorkarten: siehe Anhang 2). Das Protein GFP (*green fluorescent protein*) ist Bestandteil eines Biolumineszenzsystems der Qualle *Aequorea victoria* (166, 167) und produziert bei Anregung eine grüne Fluoreszenz. Dieses Phänomen ist Spezies-unabhängig und benötigt keine Kofaktoren. Für in der Arbeit beschriebenen Experimente wurde die als EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) bezeichnete Version eingesetzt, deren Anregungsmaximum bei ca. 490 nm und deren Emissionsmaximum bei ca. 510 nm liegt (168).

Die Analyse der Expression des Fusionsproteins erfolgte nach 24h mit dem Mikroskop Axiovert 25 CFL der Firma Carl Zeiss Jena mit folgenden Parametern:

- Vergrößerung: 400x
- Beleuchtung: Halogenlampe (6V, 25W) oder Quecksilberdampfampe HBO50 mit Filtersatz "Blauanregung" (450-490 nm)
- Kamera: Spiegelreflexkamera RICOH KRION.

## 4. ERGEBNISSE I: Beeinflussung des MAPK-Signalnetzwerkes durch $\text{Ca}^{2+}$ und CsA in primären humanen Leukozyten

### 4.1 Ausgangspunkt

Als Modellsystem für die in diesem Teil beschriebenen Experimente wurden die folgenden Zellpopulationen des menschlichen peripheren Blutes verwendet:

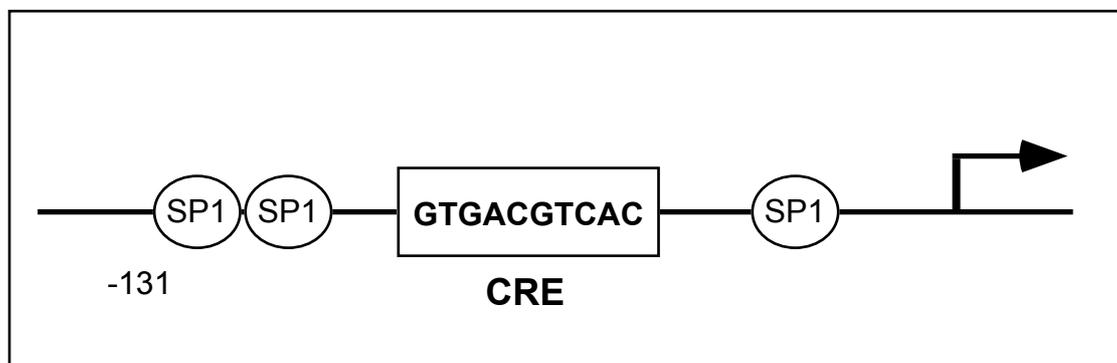
- PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*): Diese Population enthält die Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen des Blutes.
- $\text{CD2}^+$  Zellen: Diese Zellen, eine Subpopulation der PBMC, bestehen zum größten Teil aus T-Lymphozyten sowie den  $\text{CD2}^+$  NK-Zellen.

Zur Induktion der Zellen wurden der Phorbolster PMA und das Calciumionophor Ionomycin verwendet. Dadurch lassen sich Ereignisse simulieren, wie sie auch bei der Aktivierung der Zellen im Laufe einer Immunantwort auftreten: die Aktivierung von Vertretern der Proteinkinase C-Familie (durch PMA) und eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (durch Ionomycin). Die Reaktion der Zellen wurde zusätzlich in Anwesenheit von 400 nM Cyclosporin A analysiert. Diese Konzentration liegt in einem Bereich, wie er auch in CsA-therapierten Patienten zu finden ist (Serumkonzentrationen zwischen 200 und 800 nm).

Im Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover gelang der Nachweis, daß das Gen, das für das Enzym DNA-Polymerase  $\beta$  kodiert, in humanen  $\text{CD2}^+$  Zellen durch Ionomycin induziert wird (C. Ahlers, Dr. A. Rühlmann). Diese Induktion läßt sich durch CsA inhibieren. Von großem Interesse ist nun die Frage, welche Signalwege in diesen Effekt involviert sind und welche neuen Aussagen über die Beeinflussung bestimmter intrazellulärer Signalkaskaden durch ein Calciumsignal und das Immunsuppressivum CsA möglich sind.

## 4.2 Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und CREB durch CsA

Der DNA-Polymerase  $\beta$ -Promotor (Abb. 3) ist ein Promotor ohne TATA-Box und enthält eine zentrale CRE (*cAMP response element*)-Sequenz und drei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1 (169). Es ist bekannt, daß die CRE-Sequenz essentiell für die Regulation des *pol* $\beta$ -Promotors ist (170, 171). An diese Sequenz binden Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB-Familie, eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors CREB in die Regulation des *pol* $\beta$  Promotors wurde bereits in anderen Systemen gezeigt (172).



**Abb.3: Struktur des DNA Polymerase  $\beta$  Promotors.**

Dargestellt sind die zentrale CRE-Sequenz und die Bindungsstellen für den SP1-Transkriptionsfaktor.

Aus diesen Gründen sollte zuerst die Frage beantwortet werden, ob auch in primären CD2<sup>+</sup> Zellen die Transkriptionsfaktoren ATF-2/CREB potentiell an der beobachteten Regulation der Expression von DNA-Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) beteiligt sind.

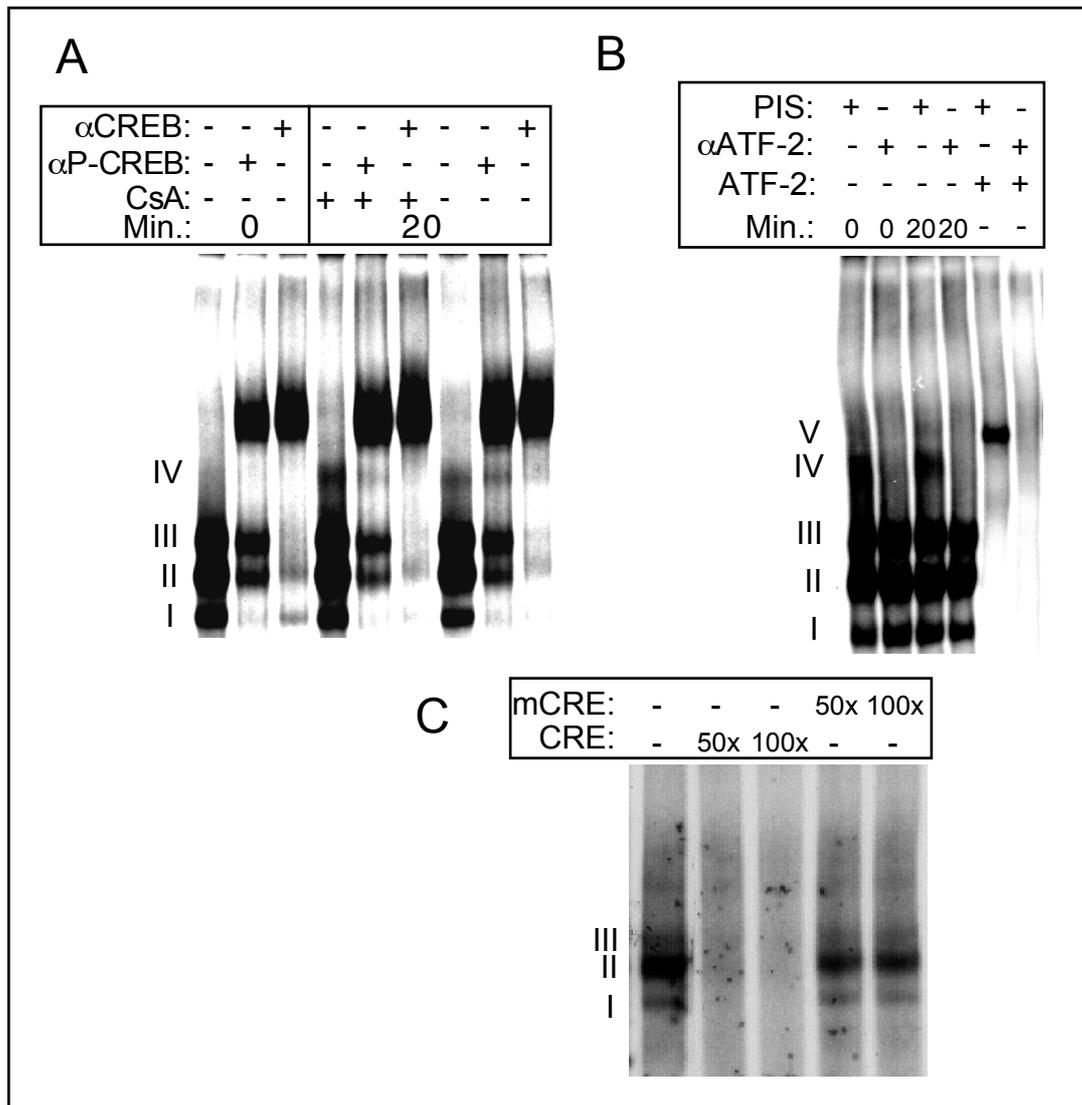
Dafür wurde zuerst die Bindung der endogenen Proteine an den Promotor *in vitro* analysiert. Dazu wurde in einem EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) die Bindung von Proteinen aus Ganzzelextrakten von CD2<sup>+</sup> Zellen an ein Oligonukleotid mit der CRE-Sequenz des DNA-Polymerase  $\beta$ -Promotors (Position -57 bis -27 des humanen Promotors) untersucht (Abb. 4A). Eingesetzt wurden Extrakte von unstimulierten Zellen sowie von Zellen, die für 20 min mit 2  $\mu$ M Ionomycin in Anwesenheit oder Abwesenheit von 400 nM CsA induziert wurden.

Die Abbildung 4A zeigt deutlich die Bildung von drei Protein-DNA-Komplexen (I-III) an dem Oligonukleotid und die schwächere Bildung eines vierten Komplexes (IV). Die Bildung dieser Komplexe wird nicht signifikant durch eine Induktion der Zellen beeinflusst. Die starke Induktion des Komplexes IV konnte in Wiederholungen des Experimentes nicht bestätigt werden. Ebenso konnte kein deutlicher Effekt von CsA festgestellt werden.

Um zu zeigen, daß die Komplexbildung spezifisch an der CRE-Sequenz erfolgt, wurde untersucht, ob sich die Bildung der Komplexe durch einen Überschuß an nicht markiertem Oligonukleotid gegenüber dem radioaktiv markierten Oligo inhibieren läßt. Wie die Abb. 4C zeigt, läßt sich die Bildung der Komplexe tatsächlich durch einen Überschuß an nicht markiertem Oligonukleotid (CRE) inhibieren, andererseits hat selbst ein 100facher Überschuß an nichtmarkierten, mutierten Oligonukleotid (mCRE: mutierte CRE-Sequenz) gegenüber dem markierten CRE-Oligonukleotid keinen signifikanten Einfluß auf die Bindung der Komplexe.

Die sich anschließende Frage, welche Proteine diese einzelnen Komplexe enthalten, wurde durch den Einsatz von Antiseren gegen CREB ( $\alpha$ CREB) sowie gegen an der Position Ser133 phosphoryliertes CREB ( $\alpha$ P-CREB; siehe Abschnitt 2.2.3) beantwortet. Die Abb. 4A zeigt deutlich, daß alle 4 Komplexe nahezu komplett in ihrem Laufverhalten durch das  $\alpha$ CREB-Antiserum beeinflusst werden und daß die Komplexe, zumindest teilweise, auch durch das  $\alpha$ P-CREB-Serum beeinflusst werden. Dies verdeutlicht, daß alle 4 Komplexe CREB und unterschiedliche Mengen phosphoryliertes CREB enthalten.

Um zu entscheiden, ob auch der endogene Transkriptionsfaktor ATF-2 an die CRE-Sequenz bindet, wurde ein Antiserum gegen ATF-2 ( $\alpha$ ATF-2) eingesetzt und das Laufverhalten der Komplexe mit *in vitro*-transkribierten und translatierten ATF-2 verglichen. Unter Einsatz größerer Mengen Ganzzellextrakt (72  $\mu$ g) konnte die Exis-



**Abb.4: Die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und CREB binden an die CRE-Sequenz des humanen DNA-Polymerase  $\beta$ - Promotors.**

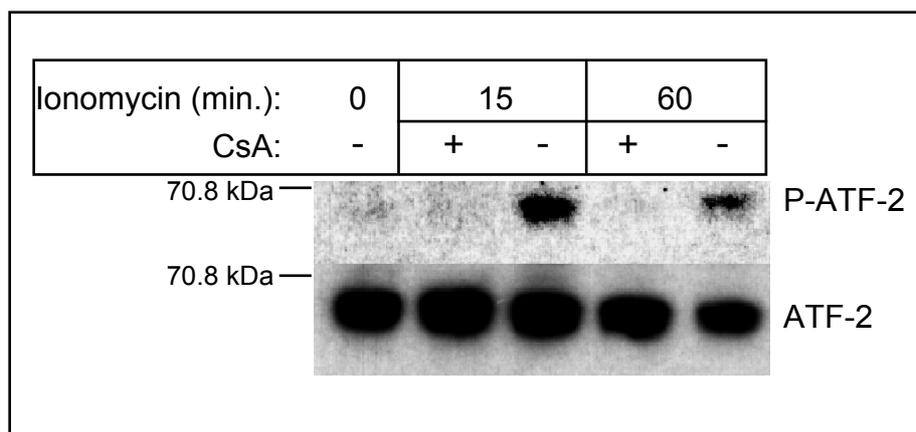
**A)** EMSA-Experimente unter Verwendung einer radioaktiv markierten Oligonukleotidsonde, die die CRE-Sequenz des *pol $\beta$* -Promotors (Position -57 bis -27) enthält. Für dieses Experiment wurden Ganzzellextrakte von CD2<sup>+</sup> Zellen verwendet, die unstimuliert (0) waren, oder für 20 min mit 2  $\mu$ M Ionomycin in Anwesenheit oder Abwesenheit von 400 nM CsA stimuliert wurden. Zur Identifizierung bestimmter Proteinkomplexe wurden die Proben mit einem anti-CREB-Antiserum ( $\alpha$ CREB), oder einem für die phosphorylierte Form von CREB (Ser133) spezifischen Antiserum ( $\alpha$ P-CREB) vorinkubiert. **B)** EMSA mit derselben Oligonukleotidsonde wie in A) und Ganzzellextrakten von CD2<sup>+</sup> Zellen, die unstimuliert waren, oder mit 2  $\mu$ M Ionomycin für die angegebenen Zeitpunkte ("Min") stimuliert wurden. Zur Identifizierung von Komplexen wurden einzelne Proben mit einem anti-ATF-2-Antiserum ( $\alpha$ ATF-2), oder einem Präimmunserum ("PIS") vorinkubiert. *In vitro* transkribiertes und translatiertes ATF-2 wurde als Kontrolle eingesetzt. **C)** EMSA mit der in A) erwähnten Oligonukleotidsonde und Ganzzellextrakten von mit 2  $\mu$ M Ionomycin (20 min) stimulierten CD2<sup>+</sup> Zellen. Zu den einzelnen Proben wurde zur Konkurrenz nichtmarkierte Sonde (CRE bzw. mCRE) in einem 50fachen oder 100fachen Überschuß zur markierten Sonde zugesetzt.

tenz eines fünften Komplexes (V) nachgewiesen werden (Abb. 4B), der auf der selben Höhe im Gel wie exogenes ATF-2 läuft. Sowohl der Komplex V, als auch der Komplex IV werden durch den Einsatz des  $\alpha$ ATF-2-Antiserums beeinflusst. Da Komplex IV sowohl durch ein  $\alpha$ CREB-Antiserum (Abb. 4A), als auch durch ein  $\alpha$ ATF-2-Antiserum (Abb. 4B) erkannt wird, liegt der Schluß nah, daß dieser Komplex ein ATF-2/CREB-Heteromeres enthält.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß sowohl endogene CREB-Homomere, als auch CREB/ATF-2-Heteromere unabhängig vom Phosphorylierungszustand in der Lage sind, an den Polß-Promotor zu binden.

ATF-2 und CREB werden durch Phosphorylierungen beeinflusst, wobei die transkriptionsaktivierende Wirkung von ATF-2 durch Phosphorylierung an der Position Thr 71 induziert (78) wird. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt die Phosphorylierungszustände der endogenen Faktoren in CD2<sup>+</sup> Zellen analysiert.

Die Abb. 5 zeigt Western-Blots unter Verwendung von Ganzzellextrakten von unstimulierten CD2<sup>+</sup> Zellen und Zellen, die für 15 bzw. 60 min mit 2  $\mu$ M Ionomycin in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von 400 nM CsA induziert wurden.



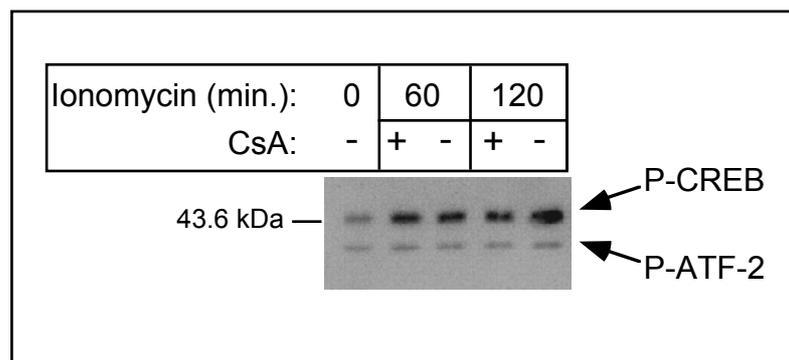
**Abb. 5: Ionomycin induziert die Phosphorylierung von ATF-2 an der Position Thr 71.**

Western Blot-Analyse von Ganzzellextrakten von CD2<sup>+</sup> Zellen, die unstimuliert waren, oder für die angegebenen Zeitpunkte mit 2  $\mu$ M Ionomycin +/- 400 nM CsA inkubiert wurden. Die Blots wurden mit einem für die an Thr71 phosphorylierte Form von ATF-2 spezifischen Antiserum (oben), oder mit einem anti-ATF-2-Kontrollantiserum (unten) inkubiert.

Für die Western-Blots wurden ein für an Thr71 phosphoryliertes ATF-2 spezifisches Antiserum (oben), oder ein anti-ATF-2-Kontrollserum (unten) eingesetzt. Das Experiment zeigt deutlich die Induktion der Phosphorylierung des Thr71 im endogenen ATF-2 durch Ionomycin. Insgesamt wurde in mehr als 60% der untersuchten Blutproben eine Induktion der Phosphorylierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  gefunden. Diese Induktion wurde in der Mehrzahl der Fälle durch CsA zu mehr als 50% inhibiert.

Der Transkriptionsfaktor CREB wird durch eine Phosphorylierung an der Position Ser133 aktiviert (104).

Die Abbildung 6 zeigt den Phosphorylierungszustand von endogenem CREB an dieser Position in  $\text{CD2}^+$  Zellen. Für den darin dargestellten Western-Blot wurden Ganzzelextrakte von unstimulierten, oder von mit 2  $\mu\text{M}$  Ionomycin für 60 bzw. 120 min



**Abb. 6: Effekt von Ionomycin und CsA auf den Phosphorylierungszustand von endogenem CREB in  $\text{CD2}^+$  Zellen.**

Western Blot-Analyse von Ganzzelextrakten von  $\text{CD2}^+$  Zellen, die unstimuliert waren, oder für die angegebenen Zeitpunkte mit 2  $\mu\text{M}$  Ionomycin +/- 400 nM CsA inkubiert wurden. Für den Blot wurde ein für die an Ser133 phosphorylierte Form von CREB spezifisches Antiserum eingesetzt, das mit der phosphorylierten Form von ATF-1 kreuzreagiert.

stimulierten Zellen verwendet. Zwar wird die Phosphorylierung von CREB an Ser133 geringfügig durch Ionomycin induziert, allerdings zeigt sich kein starker CsA-Effekt. Auch die Wiederholungen des Experimentes zeigten keinen Effekt von CsA auf die Phosphorylierung von CREB.

Das eingesetzte Antiserum erlaubt, auf Grund einer Kreuzreaktivität, zusätzlich auch eine Aussage über den Phosphorylierungszustand des verwandten Transkriptionsfaktors ATF-1. Dessen Phosphorylierung wird aber offensichtlich nicht durch eine Behandlung mit Ionomycin beeinflusst.

### 4.3 Aktivierung des MKK6/SAPK2-Signalweges durch $\text{Ca}^{2+}$

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, daß der endogene Transkriptionsfaktor ATF-2 an die CRE-Sequenz des *polβ*-Promotors in Form eines CREB/ATF-2-Heteromers binden kann und das die für die Aktivität entscheidende Phosphorylierung an der Position Thr71 durch Ionomycin induziert wird. Die Sensitivität dieser Induktion gegenüber CsA wurde gezeigt.

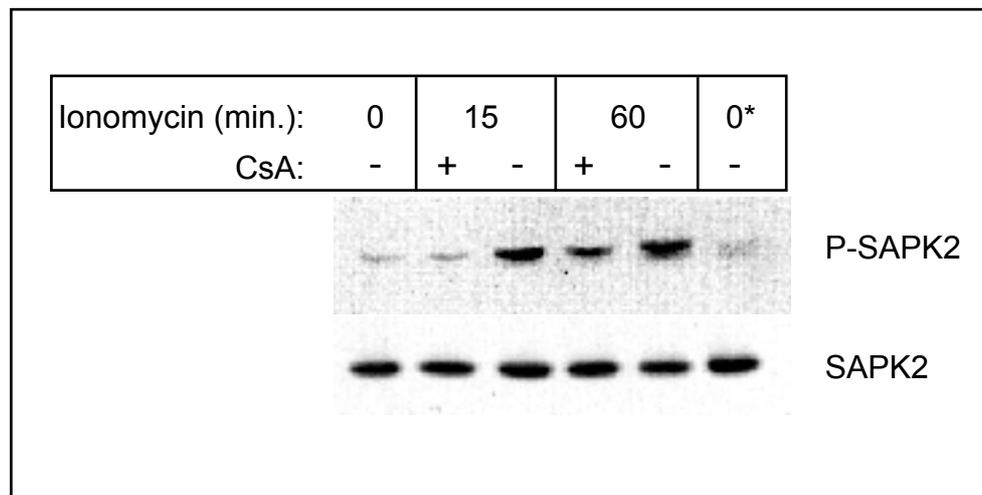
Die sich anschließende Frage war die nach der Identität der beteiligten Kinasen.

Eine Gruppe von Kinasen, die zumindest *in vitro* ATF-2 an Thr71 zu phosphorylieren vermögen, sind die SAPK2 (81). Deshalb wurde die Aktivität der endogenen Kinase SAPK2a in  $\text{CD2}^+$  Zellen analysiert. Dazu wurden zwei Ansätze gewählt:

- Es wurde zum einen der Phosphorylierungsgrad der endogenen Kinase untersucht. SAPK2a wird durch Phosphorylierungen an den Positionen T180 und Tyr182 aktiviert (173),
- und es wurde der Aktivitätszustand der Kinase MAPKAP-K2 analysiert. Diese Kinase wird durch SAPK2a phosphoryliert und somit aktiviert.

Die Abbildung 7 zeigt Western-Blots von Ganzzellextrakten unstimulierter und mit  $2\ \mu\text{M}$  Ionomycin stimulierter  $\text{CD2}^+$  Zellen. Diese Induktion erfolgte in Anwesenheit oder Abwesenheit von  $400\ \text{nM}$  CsA. Für diese Western-Blots wurde ein für an Tyr182 phosphorylierte SAPK2a spezifisches Antiserum (oben) oder ein anti-SAPK2a-Kontrollserum (unten) eingesetzt. Dieses Experiment offenbarte eine deutliche Induktion der Phosphorylierung von SAPK2a durch Ionomycin. CsA inhibiert diese Induktion zu ca. 50%.

Zur Analyse der Aktivität der endogenen MAPKAP-K2 wurden CD2<sup>+</sup> Zellen mit 2  $\mu$ M Ionomycin oder mit der Kombination 2  $\mu$ M Ionomycin plus 20 ng/ml PMA in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von CsA für 20 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, MAPKAP-K2 immunpräzipitiert und die Aktivität dieser Kinase in einem *in vitro*-Assay gemessen. Die Abb. 8 zeigt das Resultat als relative MAPKAP-K2-Kinaseaktivität bezogen auf unstimulierte Zellen. Das Experiment zeigt eine deutliche Induktion der MAPKAP-K-2-Aktivität durch Ionomycin, die durch eine



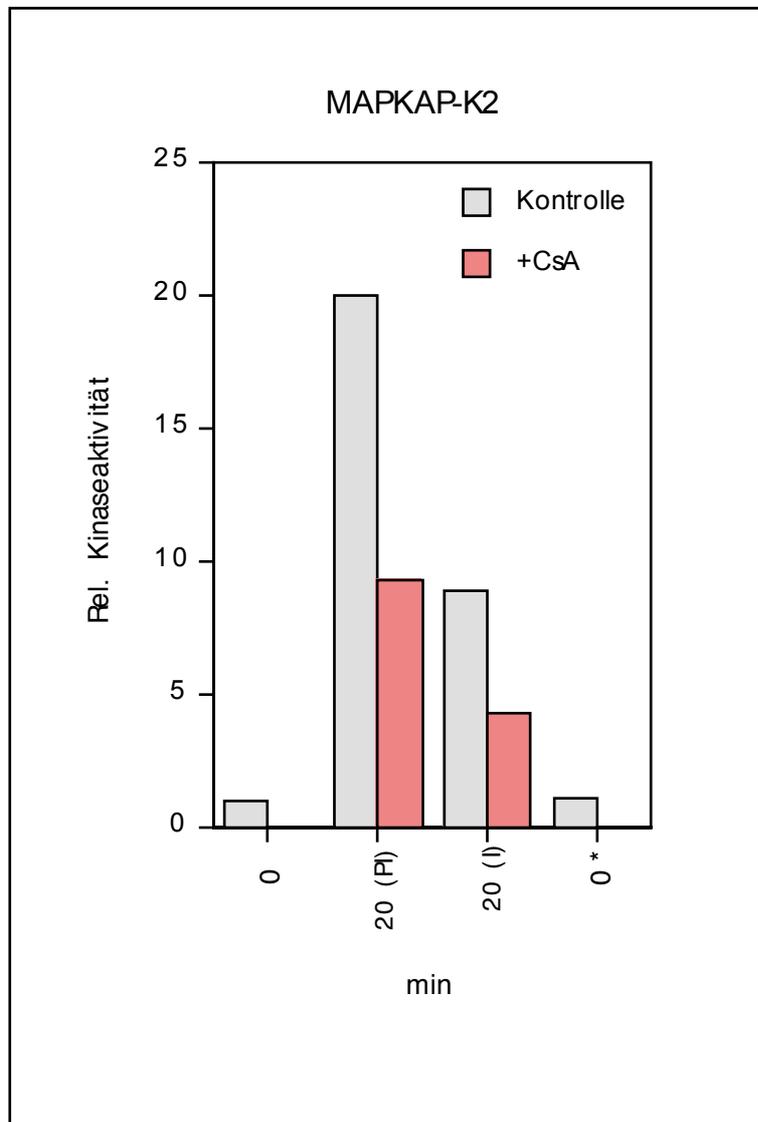
**Abb.7: Ionomycin induziert die Phosphorylierung von SAPK2a an Tyr 182.**

Western Blot-Analyse von Ganzzelextrakten von CD2<sup>+</sup> Zellen, die unstimuliert waren, oder für die angegebenen Zeitpunkte mit 2  $\mu$ M Ionomycin +/- 400 nM CsA inkubiert wurden. Die Blots wurden mit einem für die an Tyr182 phosphorylierte Form der SAPK2a spezifischen Antiserum, oder einem anti-SAPK2a-Kontrollantiserum inkubiert.

gleichzeitige Behandlung mit PMA sogar noch verstärkt wird. In beiden Fällen inhibiert Cyclosporin A die Induktion zu ca. 50%.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß *in vivo* vor allem zwei Kinasen für die Phosphorylierung und Aktivierung von SAPK2a verantwortlich sind: MKK3 und MKK6 (siehe Abschnitt 2.1.3). Aus diesem Grund wurde als nächstes die Aktivität dieser Kinasen nach einem Ionomycin-Stimulus untersucht. Dazu wurden CD2<sup>+</sup> Zellen mit 2  $\mu$ M Ionomycin oder mit 2  $\mu$ M Ionomycin plus 20 ng/ml PMA in Anwesenheit oder

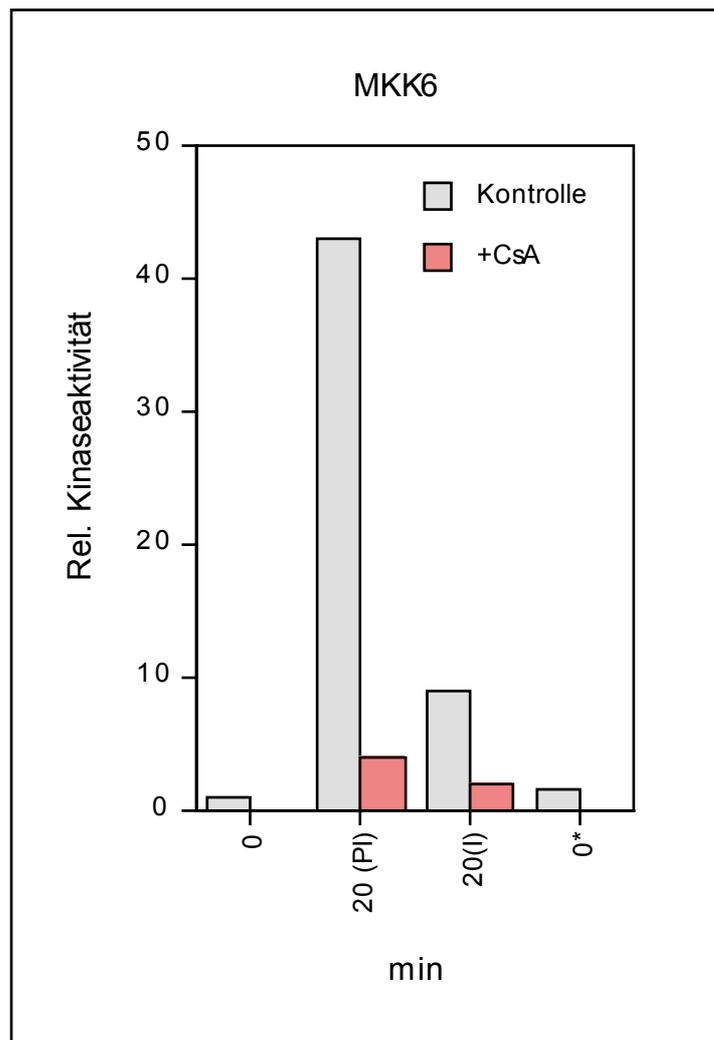
Abwesenheit von CsA induziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die endogenen Kinasen immunpräzipitiert und ihre Fähigkeit gemessen, den SAPK2a/MAPKAP-K2-Weg *in vitro* zu aktivieren (siehe Material und Methoden).



**Abb.8: Ionomycin und PMA-Ionomycin induzieren MAPKAPK-2 in CD2<sup>+</sup> Zellen.**

CD2<sup>+</sup> Zellen waren unstimuliert (0), oder wurden für 20 min mit 2  $\mu$ M Ionomycin (I) oder mit 2  $\mu$ M Ionomycin plus 20 ng/ml PMA (PI) +/- 400 nM CsA inkubiert. Der 0\*-Wert bezeichnet Zellen, die für 20 min mit DMSO, dem Lösungsmittel von Ionomycin und PMA, inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, die endogene MAPKAP-K2 immunpräzipitiert und ihre Aktivität in einem *in vitro*-Assay gemessen. Dargestellt sind die relativen Kinaseaktivitäten bezogen auf unstimulierte Zellen. Dieses Experiment ist repräsentativ für die Mehrzahl der Messungen.

In Abb. 9 ist das Ergebnis für MKK6 dargestellt. Das Experiment zeigt eine deutliche Aktivierung von MKK6 durch Ionomycin, die durch eine gleichzeitige Stimulation mit PMA noch erheblich verstärkt wird. In beiden Fällen wird die Aktivierung durch eine Behandlung mit CsA inhibiert. Eine Aktivierung von MKK3 durch Ionomycin bzw. Ionomycin plus PMA konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 9: Aktivierung von MKK6 durch Ionomycin und PMA+Ionomycin in CD2<sup>+</sup> Zellen**

CD2<sup>+</sup> Zellen wurden für 20 min mit 2  $\mu$ M Ionomycin ("I") oder mit 2  $\mu$ M Ionomycin plus 20 ng/ml PMA ("PI") +/- 400 nM CsA inkubiert. Der 0\*-Wert bezeichnet Zellen, die für 20 min mit DMSO, dem Lösungsmittel von Ionomycin und PMA, inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, die endogene MKK6 immunpräzipitiert und ihre Aktivität in einem *in vitro*-Assay gemessen. Dargestellt sind die relativen Kinaseaktivitäten bezogen auf unstimulierte Zellen ("0")

Eine Wiederholung mit Zellen eines anderen Blutspenders erbrachte ein ähnliches Ergebnis.

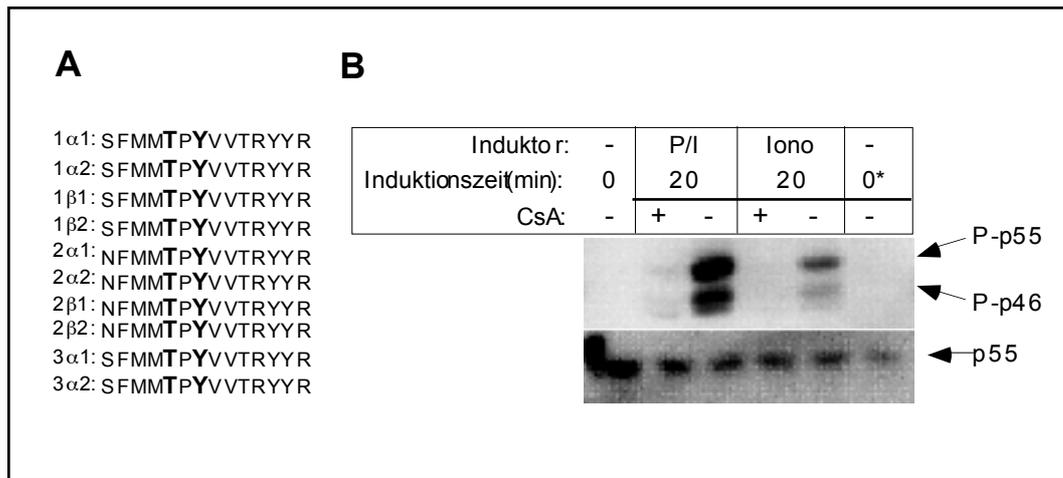
Diese Experimente zeigen, daß SAPK2a durch Ionomycin induziert wird und das diese Aktivierung über MKK6 läuft. Die Sensitivität dieser Induktion gegenüber CsA konnte gezeigt werden.

#### 4.4 Aktivierung des SAPK1/JNK-Weges durch $\text{Ca}^{2+}$

Ebenso wie die SAPK2 können auch die Kinasen der SAPK1/JNK-Gruppe ATF-2 am Thr71 phosphorylieren und analog zu den SAPK2 werden SAPK1/JNK1 ebenfalls durch Phosphorylierungen (Positionen Thr183 und Tyr 185 in SAPK1a und SAPK1b) aktiviert (80). Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungszustand der endogenen SAPK1/JNK1 als Maß für ihre Aktivität analysiert. Verwendet wurde dafür ein Antiserum, das spezifisch für die doppelphosphorylierte Form der SAPK1/JNK ist und alle *splice*-Varianten erkennt (Abb. 10 A). Die Abb. 10 B zeigt einen Western-Blot unter Verwendung von Ganzzellextrakten unstimulierter und von mit Ionomycin und Ionomycin plus PMA stimulierter  $\text{CD2}^+$  Zellen. Die Aktivierung erfolgte dabei in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von CsA. Für den Western-Blot wurde zum einen das Phosphoprotein-spezifische Antiserum (oben), oder ein anti-SAPK1/JNK Kontrollserum (unten) eingesetzt.

Abbildung 10 B zeigt eine deutliche Induktion der Phosphorylierung der 55 kDa großen Isoformen (JNK  $1\alpha1$ ,  $1\beta1$ ,  $2\alpha1$ ,  $2\beta1$ ) und der 46 kDa großen Isoformen (JNK  $1\alpha2$ ,  $1\beta2$ ,  $2\alpha2$ ,  $2\beta2$ ) der SAPK1/JNK-Familie. Diese Aktivierung wird durch gleichzeitige Stimulation der Zellen mit PMA erheblich verstärkt. Eine Differenzierung zwischen den einzelnen *splice*-Varianten ist allerdings nicht möglich. In beiden Fällen wurde diese Induktion durch CsA inhibiert.

Ein solcher Ionomycin-Effekt wurde allerdings nur 50% der untersuchten Blutproben gefunden. Eine Inhibierung der Induktion durch Ionomycin wurde in nur einem von drei Fällen gefunden. Beides weist darauf hin, daß diese Effekte kein generelles Phänomen in primären humanen Leukozyten sind, sondern von unbekanntem Spendereigenschaften abhängen.



### Abb.10: Induktion der Phosphorylierung von SAPK1/JNK durch Ionomycin und Ionomycin+PMA

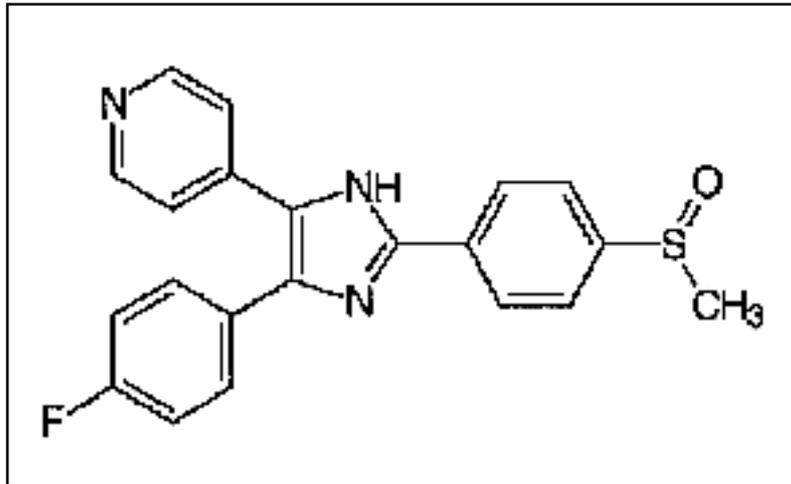
**A)** Sequenzvergleich der bislang bekannten *splice*-Varianten der SAPK1/JNK. Dargestellt ist der Abschnitt, gegen den das in B) verwendete phospho-spezifische Antiserum gerichtet ist. Hervorgehoben sind die Aminosäurepositionen, die bei einer Aktivierung der Kinasen phosphoryliert werden. **B)** Western Blot-Analyse von Ganzzellextrakten von CD2<sup>+</sup> Zellen, die unstimuliert waren, oder für die angegebenen Zeitpunkte mit 2  $\mu$ M Ionomycin ("Iono") oder mit 2  $\mu$ M Ionomycin plus 20 ng/ml PMA ("P/I") +/- 400 nM CsA inkubiert wurden. Der 0\*-Wert bezeichnet Zellen, die für 20 min mit DMSO, dem Lösungsmittel von Ionomycin, PMA und CsA, inkubiert wurden. Der Blot wurde mit einem Antiserum, das spezifisch für die doppelt-phosphorylierte Formen aller SAPK1/JNK spezifisch ist (oben), oder mit einem anti-SAPK1-Kontrollserum (unten) inkubiert.

## 4.5 Beeinflussung sonstiger ATF-2 phosphorylierender Kinasen durch Ca<sup>2+</sup> und Unterscheidung der Signalwege

Weitere Kinasen, die in der Lage sind, ATF-2 am Thr71 zu phosphorylieren, sind die MAP-Kinasen SAPK3 und SAPK4 (siehe 2.1.2). SAPK3 wird vorwiegend in der Muskulatur exprimiert (174).

Um die Aktivität der SAPK4 in den CD2<sup>+</sup> Zellen zu bestimmen, wurde die Kinase aus unstimulierten, bzw. mit Ionomycin oder Ionomycin plus PMA stimulierten Zellen immunpräzipitiert und für einen *in vitro* Kinase-Aktivitätsassay mit dem Protein MBP (*myelin basic protein*) als Substrat eingesetzt. Es wurde dabei keine Aktivierung der SAPK4 durch die aufgeführten Stimuli gefunden (Daten nicht gezeigt).

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, daß sowohl die SAPK2a, als auch, unter bestimmten Umständen, die SAPK1/JNK durch Ionomycin CsA-sensitiv induzierbar sind. Um nun zu klären, welche der Kinasen tatsächlich in die induzierte Phosphorylierung von ATF-2 involviert ist, wurde der Inhibitor SB 203580 eingesetzt.



**Abb.11: Molekulare Struktur von SB 203580** (63)

Diese Substanz inhibiert SAPK2a mit einem  $IC_{50}$  von 50-100 nM. Andererseits werden SAPK3 und SAPK4 selbst bei sehr hohen Konzentrationen (100  $\mu$ M) nicht entscheidend beeinflusst (17, 18). Die Aktivität verschiedener Isoformen der SAPK1/JNK wird ebenfalls durch den Inhibitor reduziert, allerdings erst bei Konzentrationen von 50  $\mu$ M und höher (175). Die Aktivität von 15 weiteren Kinasen wird durch die Substanz selbst in hohen Konzentrationen nicht beeinflusst (63). SB 203580 ist daher sehr gut geeignet, um die verschiedenen Signalwege zu unterscheiden.

Um diese Unterscheidung vornehmen zu können, wurden mehrere Aspekte untersucht:

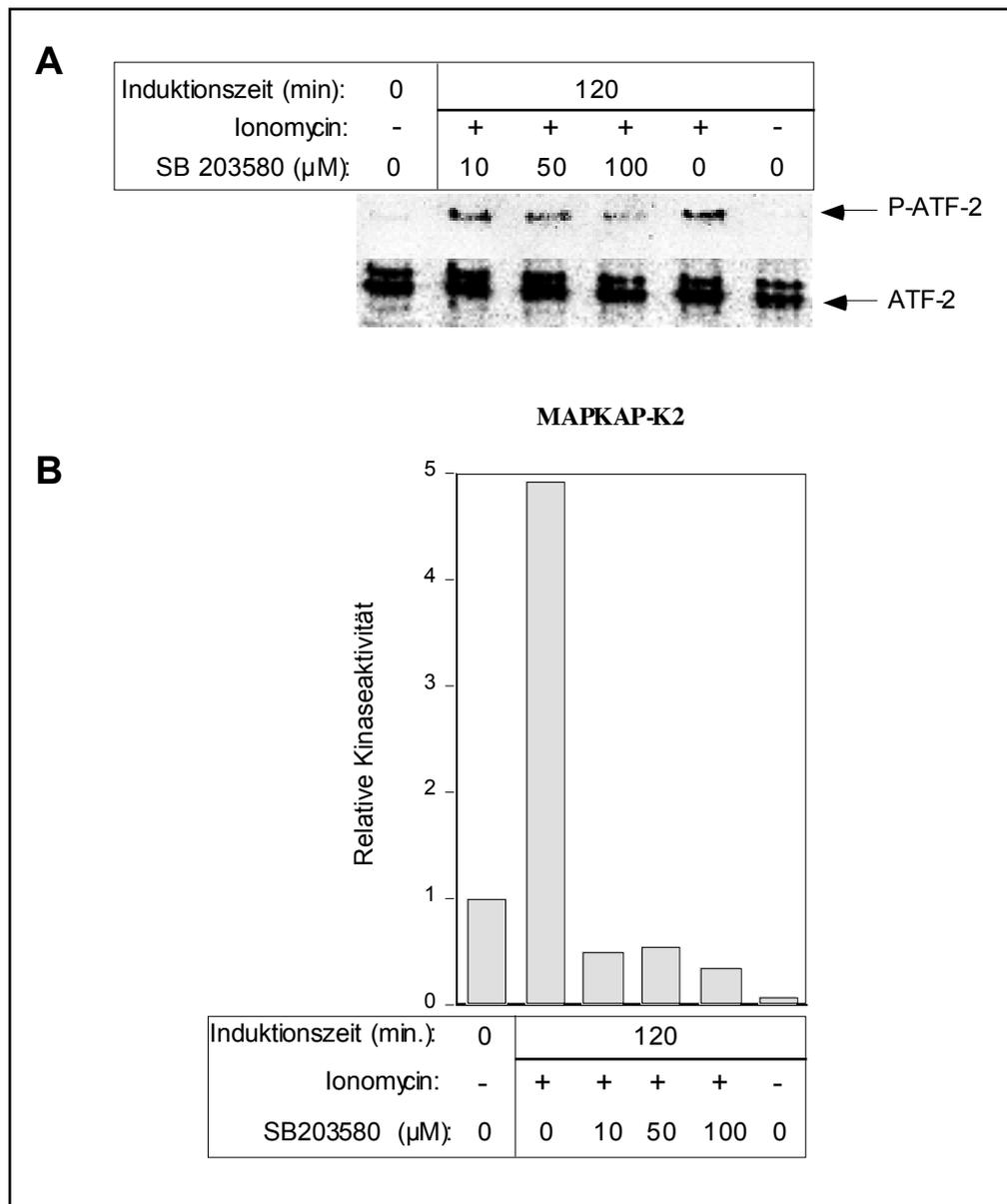
- der Effekt von SB 203580 auf die Ionomycin-vermittelte Induktion des *po1 $\beta$* -Gens,
- der Effekt von SB 203580 auf die durch Ionomycin induzierten Phosphorylierung von ATF-2,

- der Effekt von SB 203580 auf die Aktivierung von MAPKAP-K2 als bekanntes Substrat von SAPK2a.

Die Induktion der Transkription von *polβ* durch Ionomycin wurde durch 10  $\mu$ M SB 203580 nicht beeinflusst und erst durch eine InhibitorKonzentration von 100  $\mu$ M deutlich reduziert (A. Rühlmann, Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse für die anderen beiden Punkte zeigt die Abb. 12: Die Phosphorylierung des endogenen ATF-2 wurde erneut in einem Western Blot unter Verwendung des für die phosphorylierte Form des ATF-2 spezifischen Antiserums untersucht. Eingesetzt wurden dabei Ganzzellextrakte von PBMC, die unstimuliert waren, oder für 120 min mit 2  $\mu$ M Ionomycin in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen des Inhibitors inkubiert wurden. Wie die Abbildung zeigt, wurde die induzierte Phosphorylierung von ATF-2 erst durch eine Konzentration des Inhibitors von 100  $\mu$ M reduziert (Abb. 12 A).

Als Kontrolle für die Wirkung von SB 203580 wurde die Aktivität von MAPKAP-K2 in den Ganzzellextrakten gemessen. Die Abb.12 B zeigt, daß die Induktion der Kinaseaktivität bereits durch 10  $\mu$ M Ionomycin inhibiert wird.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, daß einerseits der SAPK2a-Wege bereits durch 10  $\mu$ M SB 203580 inhibiert wird, andererseits aber für eine deutliche Reduktion der induzierten Phosphorylierung von ATF-2 und der induzierten Transkription von *polβ* aber eine Konzentration des Inhibitors von 100  $\mu$ M nötig ist. Dies bedeutet, daß der MKK6/SAPK2a-Signalweg nicht an der Ionomycin-induzierten Phosphorylierung von ATF-2 und an der Ionomycin-induzierten Aktivierung des *polβ*-Gens beteiligt ist.



**Abb. 12: Einfluß des Inhibitors SB 203580 auf die induzierte Phosphorylierung von ATF-2 und die Aktivierung von MAPKAP-K2.**

Für diese Experimente wurden Ganzzellextrakte von PBMC eingesetzt, die unstimuliert waren, oder für 120 min mit 2  $\mu\text{M}$  Ionomycin in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen von SB 203580 inkubiert wurden.

**A)** Western Blot unter Verwendung eines für die an Thr71 phosphorylierte Form spezifischen Antiserums oder eines anti-ATF-2-Kontrollserums. In diesem Experiment wurde, im Gegensatz zu Abb.5, ein anti-ATF-2-Kontrollserum der Fa. Santa-Cruz verwendet.

**B)** Aus den Ganzzellextrakten wurde MAPKAP-K2 immunpräzipitiert und ihre Aktivität in einem *in vitro* Assay gemessen. Dargestellt ist die relative Kinaseaktivität bezogen auf unstimulierte Zellen.

Eine Wiederholung der Experimente mit den Zellen eines anderen Blutspenders ergab ein ähnliches Resultat.

## 5. ERGEBNISSE II: Charakterisierung des Proteins PRPL2

### 5.1 Ausgangspunkt

1994 wurde am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover aus einer cDNA-Bank humaner Tonsillen die cDNA für ein bis dahin unbekanntes Protein kloniert (176, 177). Die vorläufige Bezeichnung für dieses Protein ist PRPL2 (*prolin-ri<sub>c</sub>h p<sub>r</sub>otei<sub>n</sub> L<sub>2</sub>*), die komplette Sequenz ist in Abbildung 23 dargestellt.

Die cDNA kodiert für ein 493 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 54 kDa. Untersuchungen mit mRNA-Proben von 50 humanen Geweben zeigten ein sehr spezifisches Expressionsmuster: eine sehr starke Expression der mRNA wurde im hämatopoetischen System (Knochenmark, Milz, Thymus, Lymphknoten und periphere Leukozyten), in der Niere und im Blinddarm, sowie in Abschnitten des Gehirns (Okzipitallappen und *Medulla oblongata*) gefunden. In den übrigen Geweben wurde keine, oder eine nur sehr niedrige, Expression gefunden (Dr. A. Rühlmann, Institut für Molekularbiologie der MHH; Daten nicht gezeigt).

Im folgenden sollen meine Daten zur weiteren Charakterisierung des Proteins dargestellt werden.

### 5.2 Expressionsmuster auf Proteinebene

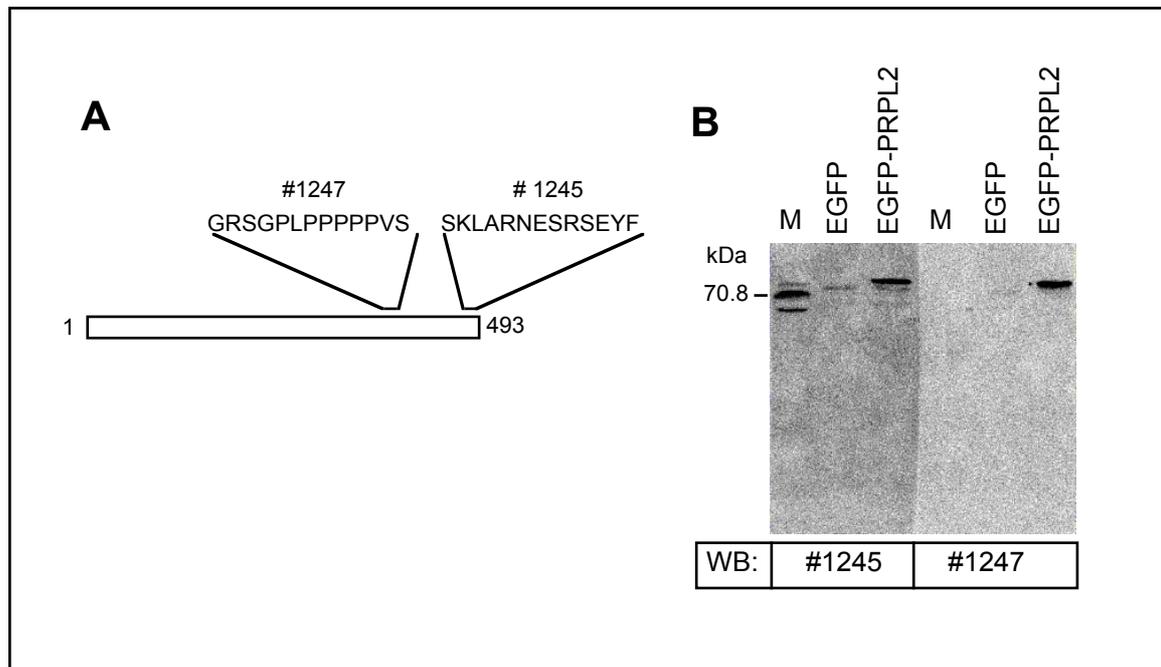
Für die Analysen auf Proteinebene wurden Antiseren gegen die folgenden Peptide aus der Sequenz von PRPL2 hergestellt (BioGenes GmbH, Berlin):

Nummer des Serums	Sequenz des Peptides	Entspricht Aminosäurekoordinaten
1245	SKLARNESRSEYF	477-490
1247	GRSGPLPPPPVVS	374-386

Um die Qualität der Antiseren zu testen, wurde in Cos-Zellen ein Fusionsprotein aus EGFP (*enhanced green fluorescent protein*; siehe 5.3) und PRPL2 oder EGFP allein

exprimiert (Dr. A. Rühlmann). Die Karten der verwendeten Plasmide befinden sich im Anhang 2.

Die erhaltenen Zellysate wurden dann für Western-Blot-Analysen verwendet.



**Abb. 13: Analyse der gegen PRPL2 gerichteten Antiseren.**

**A)** Position der beiden zur Gewinnung der anti-PRPL2-Antiseren verwendeten Peptide in PRPL2.

**B)** Western-Blots unter Verwendung der Antiseren 1245 und 1247 in einer Verdünnung von jeweils 1:500. Aufgetragen sind Ganzzellextrakte von Cos-Zellen die mit einem Expressionsplasmid für EGFP oder einem Fusionsprotein EGFP-PRPL2 transfiziert wurden. Nach 30 h wurden die Zellen mit Fracelton-Lysepuffer lysiert. In der Bahn "M" wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Ganzzellextrakte wurden von Dr. A. Rühlmann zur Verfügung gestellt.

Die Abb. 13 zeigt Western Blots unter Verwendung der beiden Antiseren. Aufgetragen sind jeweils Ganzzellextrakte von EGFP exprimierenden oder das Fusionsprotein exprimierenden Cos-Zellen. Beide Antiseren erkennen als Hauptbande ein Protein, dessen Molekulargewicht der erwarteten Größe der Fusionsproteins von ca. 80 kDa entspricht und das ebenfalls von einem monoklonalen anti-GFP Antikörper

erkannt wurde (Daten nicht gezeigt). Dieser Antikörper erkennt sowohl GFP, als auch die in dieser Arbeit verwendete Variante EGFP. Im Falle des Serums 1245 treten zwar Kreuzreaktivitäten mit Proteinen des Molekulargewichtsmarkers auf, allerdings keine starken Kreuzreaktivitäten mit endogenen Proteinen oder dem überexprimierten EGFP, dessen Expression in einem separaten Western Blot mit einem anti-GFP-Antikörper überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Im Falle des Serums 1247 traten nur sehr geringe Kreuzreaktivitäten mit endogenen Proteinen auf, daher wurde dieses Serum für die nachfolgenden Experimente verwendet.

Im nächsten Schritt wurde die Expression des PRPL2-Proteins in verschiedenen Zelllinien verglichen. Dazu wurden Ganzzellextrakte von primären hämatopoetischen Zellen (PBMC und CD2<sup>+</sup> Zellen), von hämatopoetischen Zelllinien (Jurkat, BJAB und U937) und von Fibroblasten-Zelllinien (Cos-1 und HeLa) im Western Blot untersucht. Verwendet wurde das Antiserum #1247, das Ergebnis zeigt die Abbildung 14.

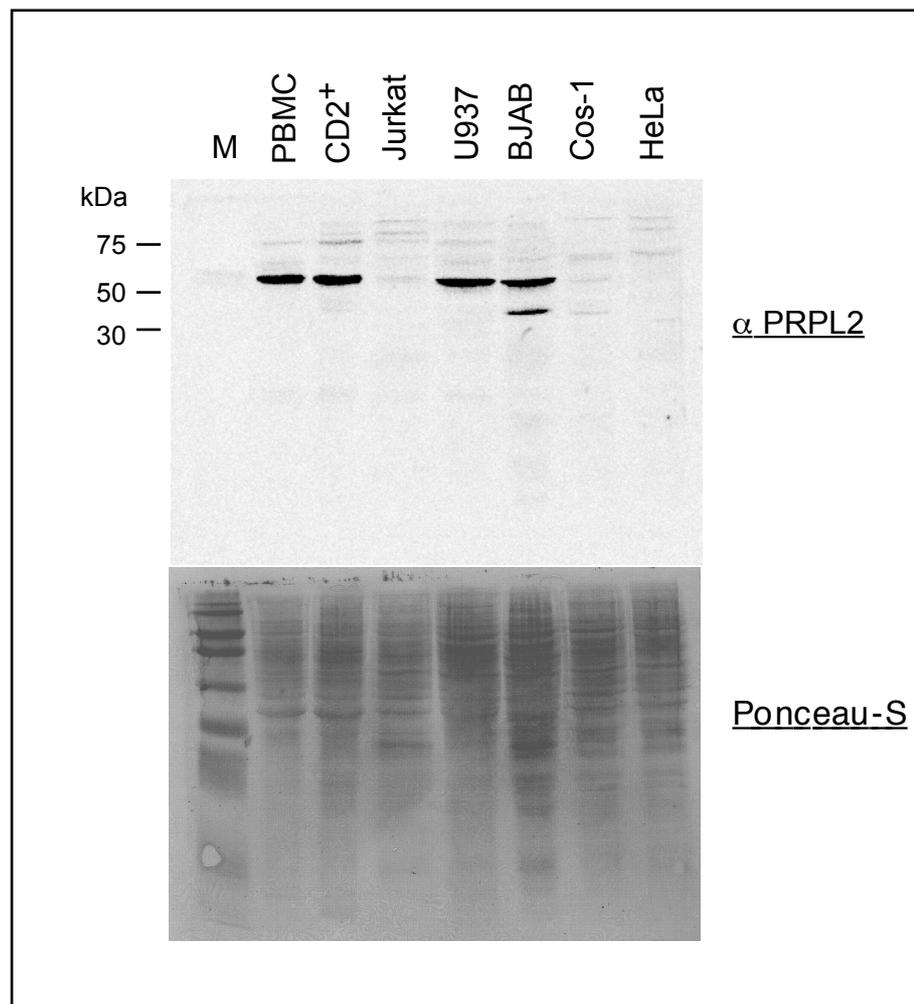
Das Antiserum identifizierte in den hämatopoetischen Zellen ein Protein mit einer Größe von ca. 57 kDa, die sehr gut der aus der Primärsequenz kalkulierten Größe von ca. 54 kDa entspricht. Der Laufunterschied ist vermutlich auf den sehr hohen Prolingehalt des Proteins zurückzuführen.

Zusätzlich markierte das Antiserum in der B-Zelllinie BJAB ein Protein von 30-40 kDa, das in primären PBMC offensichtlich nicht existiert. Vermutlich handelt es sich dabei um ein proteolytisches Abbauprodukt. Auffällig ist die sehr niedrige Expression in der humanen T-Zelllinie Jurkat im Gegensatz zu primären CD2<sup>+</sup> Zellen, die überwiegend aus T-Lymphozyten bestehen.

Im Gegensatz zu den hämatopoetischen Zellen ist PRPL2 in den Fibroblasten-Zelllinien gar nicht (HeLa), oder nur in sehr geringem Maße (Cos-1) auf der Proteinebene zu finden.

### 5.3 Intrazelluläre Lokalisation

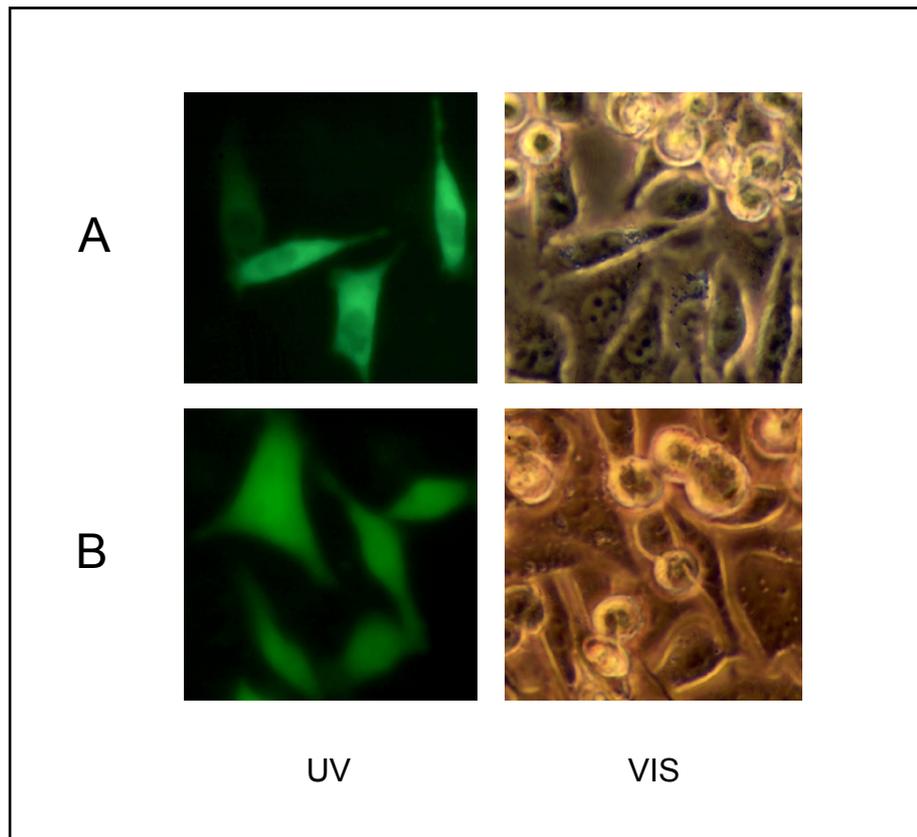
Die Kenntnis der intrazellulären Lokalisation eines Proteins ist hilfreich, um die Suche nach möglichen Funktionen eines Proteins zu unterstützen, oder um die Interaktion mit anderen Proteinen *in vivo* zu untersuchen.



**Abb. 14: Vergleich der Expression von PRPL2 in verschiedenen Zellen.**

Western-Blot Analyse von Ganzzelextrakten primärer Zellen oder Zelllinien. Die Zellen waren unstimuliert und wurden mit Fracelton-Lysepuffer lysiert. Für den Western Blot wurde das anti-PRPL2-Antiserum #1247 in einer Verdünnung von 1:500 und einer Inkubationszeit von 1h bei RT eingesetzt. Nach der Entwicklung des Western Blots wurde dieser mit Ponceau S gefärbt, um die aufgetragenen Proteinmengen in den einzelnen Bahnen zu verdeutlichen. Die Ganzzelextrakte von Cos-1 und HeLa wurden von Dr. A. Rühlmann zur Verfügung gestellt.

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von PRPL2 wurde ein Fusionsprotein aus EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und PRPL2 eingesetzt. Das Protein GFP (*green fluorescent protein*) ist Bestandteil eines Biolumineszenzsystems der Qualle *Aequorea victoria* (166, 167) und produziert bei Anregung eine grüne Fluoreszenz.



**Abb.15: Intrazelluläre Lokalisation des EGFP-PRPL2-Fusionsproteins.**

HeLa-Zellen wurden transient mit einem Expressionsvektor für EGFP (**B**) oder das EGFP-PRPL2-Fusionsprotein (**A**) transfiziert. Die Zellen wurden nach 24h in dem Mikroskop Axiovert 25 CFL der Fa. Carl Zeiss Jena mit folgenden Parametern analysiert:

- Vergrößerung: 400x
- Lichtquelle: Halogenlampe 6V, 25W ("**VIS**") oder Quecksilberdampfampe HBO50 mit Filtersatz "Blauanregung" (450-490 nm; "**UV**")
- Kamera: Spiegelreflexkamera RICOH KRION

Die in den Bildern zu sehenden runden Zellen sind Zellen, die sich nach der Transfektion nicht wieder angeheftet hatten.

Dieses Phänomen ist Spezies-unabhängig und benötigt keine Kofaktoren. Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurde die als EGFP bezeichnete Version eingesetzt, deren Anregungsmaximum bei ca. 490 nm und deren Emissionsmaximum bei ca. 510 nm liegt. Als Zellsystem wurden HeLa-Zellen eingesetzt, die durch Elektroporation mit einem Expressionsvektor für EGFP bzw. dem Fusionsprotein (siehe Anhang 2) transfiziert wurden. Die Fluoreszenz wurde dann 24h später analysiert (Abb.15). Wie die Abbildung 15 deutlich zeigt, befindet sich GFP nach der Expression in allen Bereichen der Zelle. Unterschiede hinsichtlich einer bevorzugten Lokalisation sind nicht festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigt sich im Falle des Fusionsproteins eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation, der Zellkern ist eindeutig ausgespart. Eine weitere Differenzierung hinsichtlich einer Interaktion mit verschiedenen Elementen des Zytoplasmas oder einer Lokalisation an anderen Organellen ist nicht möglich.

#### **5.4 *In vitro*-Interaktion mit SH3-Domänen**

Ein Analyse der Aminosäurezusammensetzung (Tab. 8) des Proteins verdeutlicht ein Phänomen, dem PRPL2 seinen Namen zu verdanken hat: den sehr hohen Anteil an Prolin-Resten in Höhe von 27%.

Proteine mit Prolin-reichen Segmenten sind häufig Interaktionspartner solcher Proteine, die SH3-Domänen enthalten (siehe Abschnitt 2.4). Aus diesem Grund wurde im folgenden untersucht, ob PRPL2 in der Lage ist, *in vitro* mit verschiedenen SH3-Domänen enthaltenden Proteinen zu interagieren und ob eine eventuelle Interaktion auch *in vivo* erfolgt.

Dazu wurden zuerst die potentiellen Interaktionen des Proteins mit verschiedenen SH3-Domänen in einem GST-*Pulldown*-Assay analysiert. Verwendet wurden dabei die SH3-Domänen folgender Proteine, jeweils N-terminal mit GST (Glutathion S-Transferase) fusioniert:

- die 85 kDa große regulatorische Untereinheit der PI3 Kinase

- die Phospholipase C $\gamma$ 1
- die Kinase cSrc (siehe Abschnitt 2.4),
- die Kinase NSrc. Diese neuronal spezifische Form von cSrc enthält eine 6 Aminosäuren große Insertion in der SH3-Domäne im Vergleich zu cSrc (178).

**Tab. 8:** Prozentuale Aminosäurezusammensetzung von PRPL2

Aminosäure:	Anteil (%):
Ala	4.05
Cys	0.40
Asp	3.24
Glu	2.43
Phe	2.83
Gly	12.96
His	1.21
Ile	1.62
Lys	3.24
Leu	5.87
Met	0.61
Asn	3.64
<b>Pro</b>	<b>27.33</b>
Gln	2.43
Arg	8.10
Ser	12.15
Thr	4.05
Val	2.83
Trp	0.20
Tyr	0.81

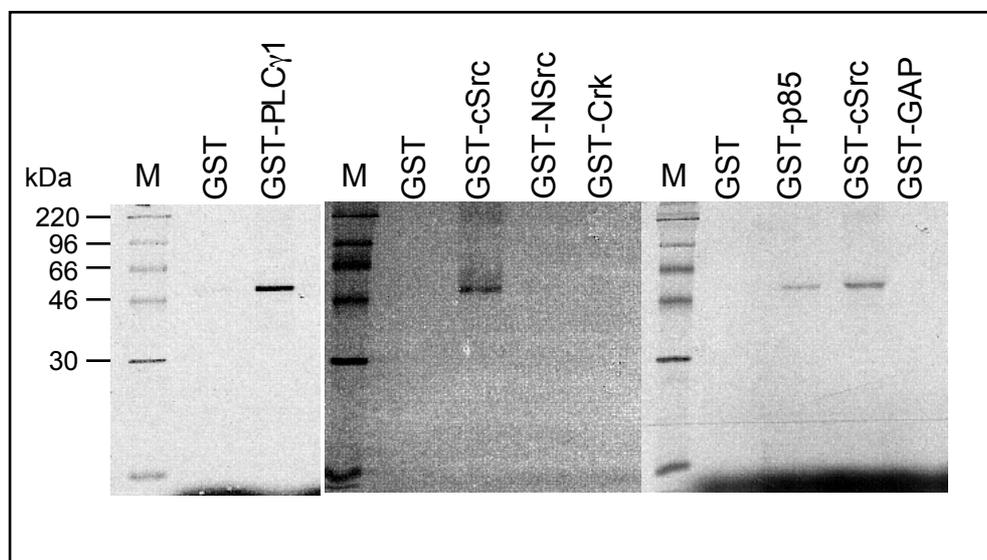
- das Adaptorprotein Crk und
- das Protein GAP, das die GTPase-Aktivität von Ras aktiviert.

Als Interaktionspartner wurde jeweils ein die Aminosäuren 91-493 umfassendes Fragment des Proteins PRPL2 mit einem zusätzlichen N-terminalen Peptid der Struktur MSHHHHHHGPMIEFR benutzt (Karte des Expressionsvektors: Anhang5).

Bei diesem Assay wurde das *in vitro* transkribierte und translatierte PRPL2 mit dem jeweiligen GST-Fusionsprotein (oder GST als Kontrolle) inkubiert, die gebildeten

Komplexe mittels einer Glutathion-Sepharose-Matrix abgetrennt und auf einem SDS-PAGE-Gel mit anschließender Exposition auf einen Röntgenfilm analysiert (Abb. 16).

Die *in vitro* Transkription und Translation (IVTT) von PRPL2 (91-493) ergab ein Protein von ca. 50 kDa (nicht gezeigt), was in etwa dem aus der Aminosäuresequenz erwarteten Molekulargewicht entspricht. Die Abbildung 16 zeigt eine selektive Interaktion mit einzelnen SH3-Domänen. So wurde PRPL2 von den SH3-Domänen von cSrc, PLC $\gamma$ 1 und p85, nicht jedoch von denen der Proteine NSrc, Crk und GAP gebunden. Eine Interaktion mit GST als Kontrolle erfolgte nicht.



**Abb. 16: *In vitro* Interaktion von PRPL2 mit SH3-Domänen.**

GST-Pull-down-Assay unter Verwendung von *in vitro* transkribiertem und translatiertem PRPL2 (Aminosäuren 91-493). Dieses Protein wurde für 3h mit einer mit den angegebenen GST Fusionsproteinen beladenen Glutathion-Sepharose-Matrix bei 4°C inkubiert und die gebundenen Komplexe in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden nach der Trocknung auf einem Röntgenfilm exponiert. Als Molekulargewichtsmarker ("M") wurde ein  $^{14}\text{C}$ -markierter Standard verwendet.

Dieses Experiment zeigt, daß PRPL2 zumindest *in vitro* in der Lage ist, selektiv mit einzelnen SH3-Domänen zu interagieren.

Um die Frage zu beantworten, welche Domäne in PRPL2 für die Interaktion mit SH3-Domänen verantwortlich ist, wurden zwei Ansätze gewählt:

- *In Vitro* Transkription und Translation (IVTT) der N-terminalen Domäne von PRPL2 (Aminosäuren 1-189) und
- Erzeugung C-terminal verkürzter Varianten von PRPL2 durch Restriktionsverdau des für die IVTT verwendeten Plasmids (siehe Anhang 5) und nachfolgender IVTT.

Die auf diese Weise gewonnenen Varianten von PRPL2 wurden dann in GST-*Pulldown*-Assays getestet.

Die Abbildung 17 zeigt die Unterschiede in der Verwendung des kompletten PRPL2 ("P") und der N-terminalen Domäne ("N") für die Interaktion mit den SH3-Domänen von PLC $\gamma$ 1 und cSrc. Die IVTT ergab Hauptprodukte von ca. 57 kDa (P) und ca. 28 kDa (N), die in etwa den erwarteten Größen von 54 kDa bzw. 21 kDa entsprechen. Abweichungen der Größen sind auf Unterschiede im Laufverhalten resultierend aus dem hohen Prolin-Gehalt zurückzuführen. Zusätzlich zu diesen Hauptprodukten entstanden noch Proteine eines höheren Molekulargewichts, die vermutlich modifizierte Formen von PRPL2 darstellen. Das mit Coomassie gefärbte Gel der Abbildung 17 verdeutlicht dabei die eingesetzten Mengen an Fusionsprotein.

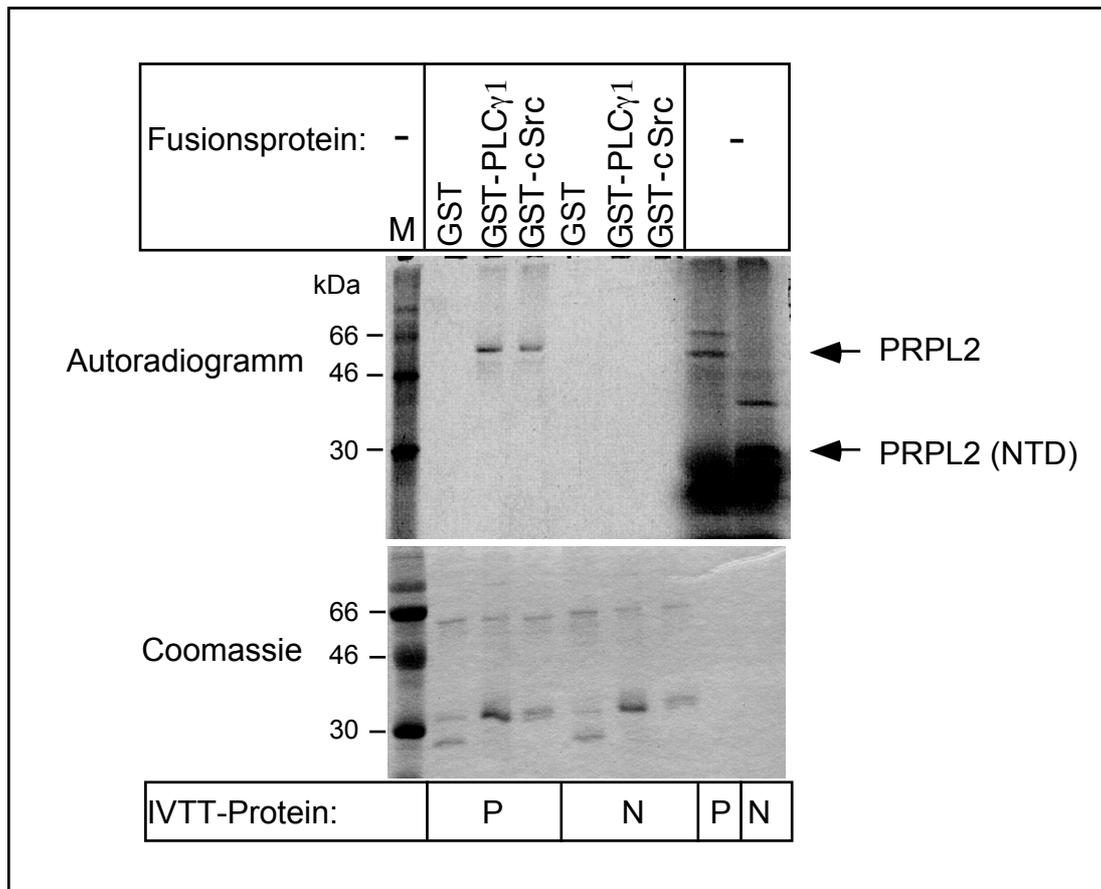
Das Experiment zeigt erneut, daß die 57 kDa Form von PRPL2 mit den SH3-Domänen von PLC $\gamma$ 1 und cSrc zu interagieren vermag. Andererseits findet keine Interaktion der N-terminalen Domäne von PRPL2 mit diesen SH3-Domänen statt.

Ein Strukturmerkmal von PRPL2 ist ein Prolin-reiches Aminosäuremotiv, das sich in kurzem Abstand dreimal wiederholt:

- Position 353-361: RSGPLPPPPS
- Position 375-384: RSGPLPPPPP
- Position 411-420: RSGPRPPLPP.

Dieses Motiv ähnelt einer Sequenz, die in dem Protein WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*) ebenfalls in drei Wiederholungen vorkommt. Dieses Protein wird durch ein Gen kodiert, welches in Patienten mit der Immunkrankheit Wiskott-Aldrich Syndrom mutiert ist (179). Interessanterweise interagiert WASP ebenfalls mit verschiedenen SH3-Domänen mit einer zu PRPL2 vergleichbaren Spezifität (180). Es

konnte gezeigt werden, dass das oben erwähnte Aminosäuremotiv (RSGPLPPPPP) entscheidend ist für die Interaktion von WASP mit den SH3-Domänen von cSrc und PLC $\gamma$ , nicht jedoch für die Interaktionen mit der SH3-Domäne von p85 (181). Die daraus resultierende Frage war, ob die beobachtete Interaktion von PRPL2 mit den SH3-Domänen ebenfalls über dieses Aminosäuremotiv erfolgt.



**Abb. 17: *In vitro* Interaktion von Varianten des Proteins PRPL2 mit SH3-Domänen.**

*GST-Pulldown-Assay* unter Verwendung von PRPL2 ("P") oder der N-terminalen Domäne ("N") des Proteins. Das *in vitro* transkribierte und translatierte Protein wurde 3h mit einer mit den angegebenen Fusionsproteinen beladenen Glutathion-Sepharose-Matrix bei 4°C inkubiert und die gebundenen Komplexe anschließend auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde ein Aliquot des IVTT-Ansatzes direkt aufgetragen, als Molekulargewichtsmarker wurde ein  $^{14}\text{C}$ -Standard verwendet. Anschließend wurde das Gel getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Aliquots der Ansätze des *GST-Pulldown-Assays* wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetragen und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt.

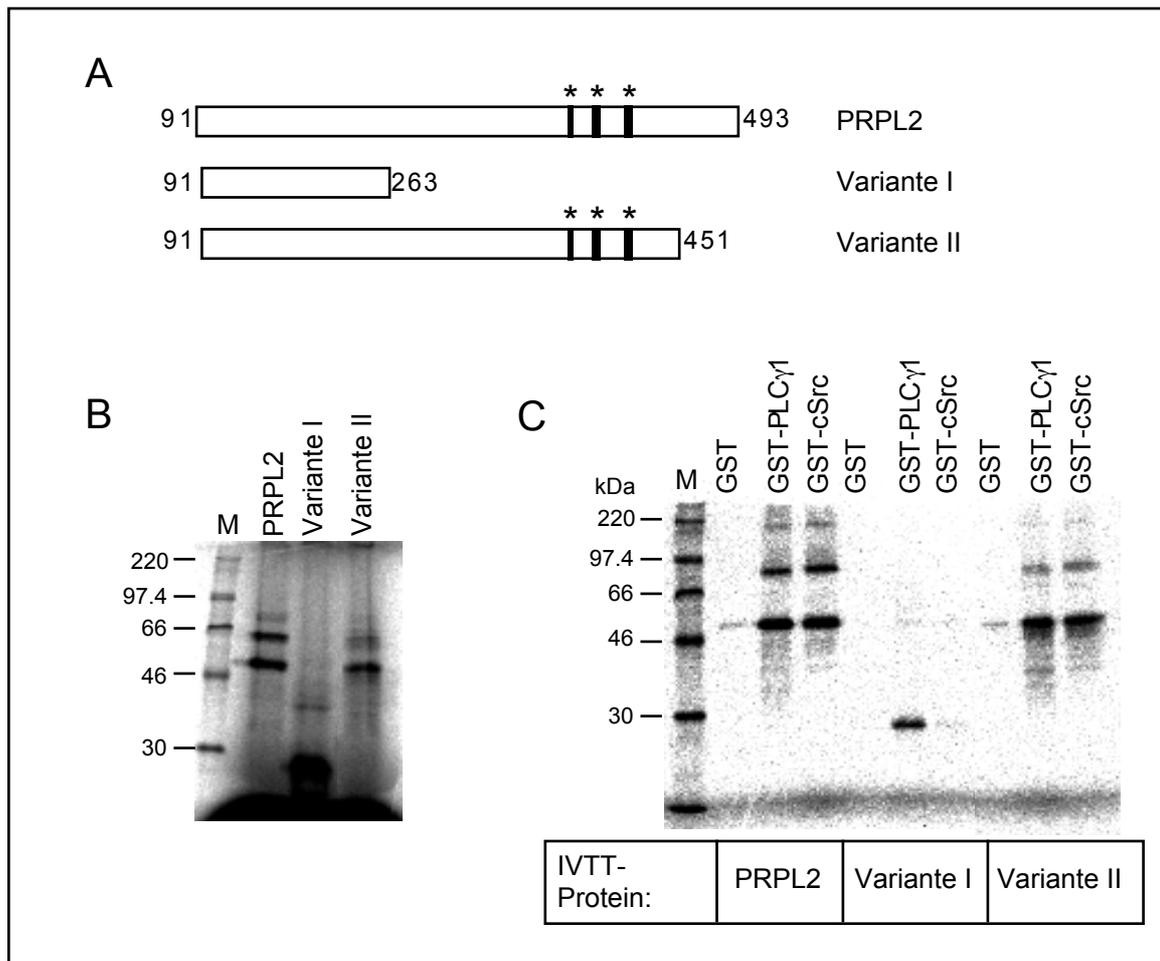
Um diese Frage zu beantworten, wurde das für die IVTT verwendete Plasmid (Anhang 5) mit Restriktionsendonukleasen verdaut, die erhaltenen Varianten *in vitro* transkribiert und translatiert und die Produkte in einem *GST-Pulldown-Assay* untersucht. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 18 dargestellt. Die IVTT ergab in jedem Fall ein Hauptprodukt mit dem erwarteten Molekulargewicht (44 kDa bei PRPL2, 40 kDa bei Fragment II und 19 kDa bei Fragment I; Abweichungen sind auf den sehr hohen Prolin-Gehalt zurückzuführen) und zusätzlich Produkte mit höheren Molekulargewichten, deren Identität nicht geklärt ist. Vermutlich handelt es sich um modifizierte Formen von PRPL2 oder Artefakte aus dem IVTT-Ansatz. Größere Leserahmen enthalten die Plasmide aber nicht. Der *Pulldown-Assay* zeigte Unterschiede in der Bindung zwischen den SH3-Domänen von cSrc und PLC $\gamma$ 1. Während die SH3-Domäne von PLC $\gamma$ 1 mit allen drei Varianten von PRPL2 ohne große Unterschiede interagiert, kam es zwar zu Interaktionen der SH3-Domäne von cSrc mit PRPL2 (91-493) und dem Fragment II, jedoch nur sehr schwach mit Fragment I.

Die Ergebnisse der letzten Experimente faßt die Tabelle 9 zusammen.

**Tab. 9:** Interaktionsmuster zwischen PRPL2 und den SH3-Domänen von PLC $\gamma$ 1 und cSrc

PRPL2	Interaktion mit PLC $\gamma$ 1 (SH3)	Interaktion mit cSrc (SH3)
1-493	+	+
1-189	-	-
91-451	+	+
91-263	+	+/-

Die Ursache für die Präzipitation eines ca. 90 kDa großen Proteins im Falle der Verwendung des PRPL2 (91-493) und der PRPL2-Variante II ist unklar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um das ebenfalls im Kontrollgel der IVTT erkennbare Protein vergleichbarer Größe. Dieses Protein trat allerdings in Wiederholungen dieser Experimente nicht reproduzierbar auf (siehe Abb. 16).

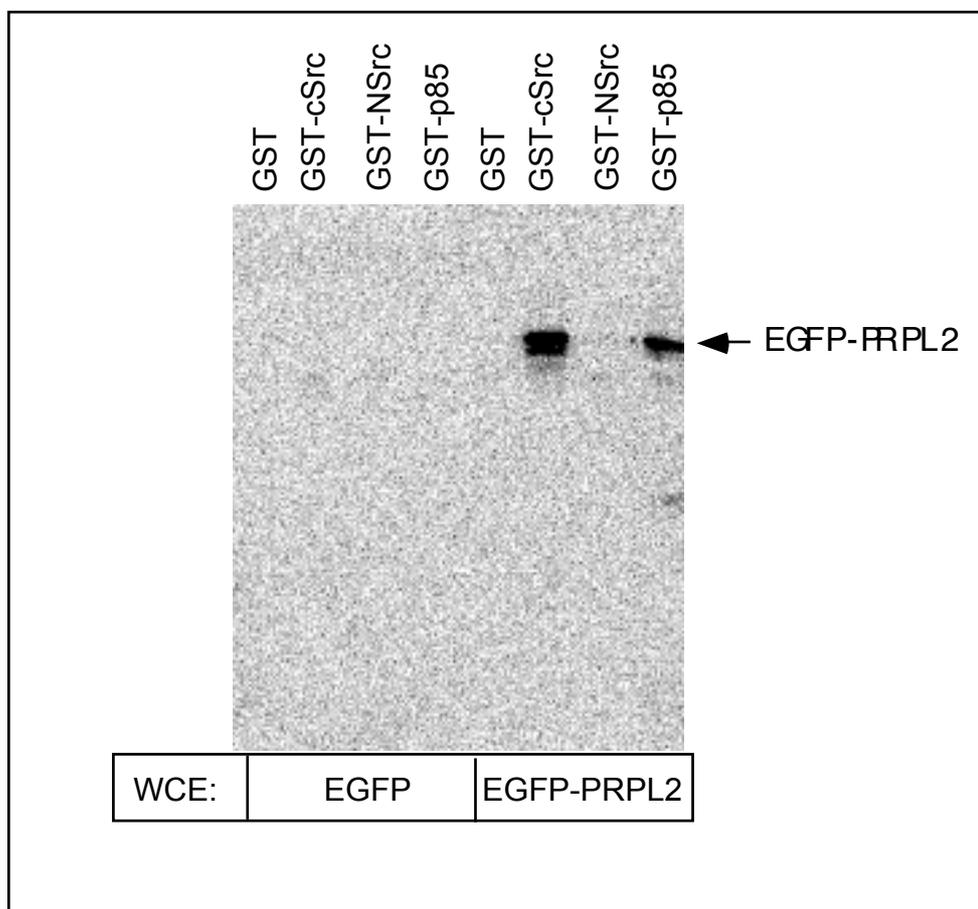


### Abb. 18: Identifizierung der Interaktionsdomäne in PRPL2.

**A)** Dargestellt sind die Größen der durch den Restriktionsverdau des für die IVTT verwendeten Plasmids erhaltenen Varianten von PRPL2. Gekennzeichnet sind die Positionen des Aminosäuremotivs  $RSGP^L/RPP^P/LPSP$  in PRPL2 (\*); für den Verdau worden die Restriktionsendonukleasen XmnI (Fragment I) und NdeI (Fragment II) verwendet. **B)** Die erhaltenen Varianten wurden *in vitro* transkribiert und translatiert, Aliquots dieses Ansatzes auf einem SDA-PAGE-Gel aufgetragen und dieses anschließend getrocknet und mit einem Phosphoimagersystem der Fa. Fuji (Tokyo, Japan) ausgewertet. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein  $^{14}C$ -markierter Standard ("M") eingesetzt. **C)** GST-Pull-down-Assay der PRPL2-Varianten mit den angegebenen SH3-Domänen, fusioniert mit GST. Die Ansätze wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, das Gel getrocknet und mit einem Phosphoimagersystem der Fa. Fuji (Tokyo, Japan) ausgewertet.

Um auch nachzuweisen, daß zelluläres PRPL2 zu diesen Interaktionen in der Lage ist, wurden Ganzzellextrakte von Zellen, die das EGFP-PRPL2-Fusionsprotein, oder EGFP allein exprimierten für GST-Pull-down-Assays eingesetzt. Dafür wurden die Ganzzellextrakte mit einer mit dem jeweiligen GST-Fusionsprotein beladenen

Glutathion-Sepharose-Matrix inkubiert und die gebundenen Komplexe dann in einem Western Blot mit einem monoklonalen anti-EGFP-Antikörper untersucht. Wie die Abbildung 19 zeigt, interagiert auch intrazellulär synthetisiertes Protein mit den SH3-Domänen von PLC $\gamma$ 1, cSrc und p85, nicht jedoch mit der SH3-Domäne von NSrc. In den Kontrollen (Präzipitation mit GST alleine bzw. unter Verwendung von Ganzzelextrakten von EGFP exprimierenden Zellen) wurden keine Interaktionen gefunden. Die Beladung der Glutathion-Sepharose-Matrix mit den Fusionsproteinen wurde durch eine Färbung der Western Blot-Membran mit Ponceau S kontrolliert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 19: Interaktion verschiedener SH3-Domänen mit zellulärem PRPL2**

GST-Pulldown-Assay von Ganzzelextrakten ("WCE") von Cos-Zellen, die EGFP oder EGFP-PRPL2 exprimierten und den SH3-Domänen der angegebenen Proteine, fusioniert an GST. Die Abbildung zeigt einen Western Blot der gebildeten Proteinkomplexe unter Verwendung eines monoklonalen anti-GFP-Antikörpers. Die Ganzzelextrakte wurden von Dr. A. Rühlmann zur Verfügung gestellt.

## 5.5 *In vivo* Interaktion von PRPL2 mit SH3-Domänen enthaltenden Proteinen

Im letzten Abschnitt konnte gezeigt werden, daß PRPL2 *in vitro* selektiv mit einzelnen SH3-Domänen interagiert. Die Frage ist, ob diese Interaktionen auch *in vivo* ablaufen. Zur Klärung dieses Punktes wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt mit dem Ziel, eventuell vorhandene Komplexe zwischen PRPL2 und SH3-Domänen enthaltenden Proteinen zu präzipitieren.

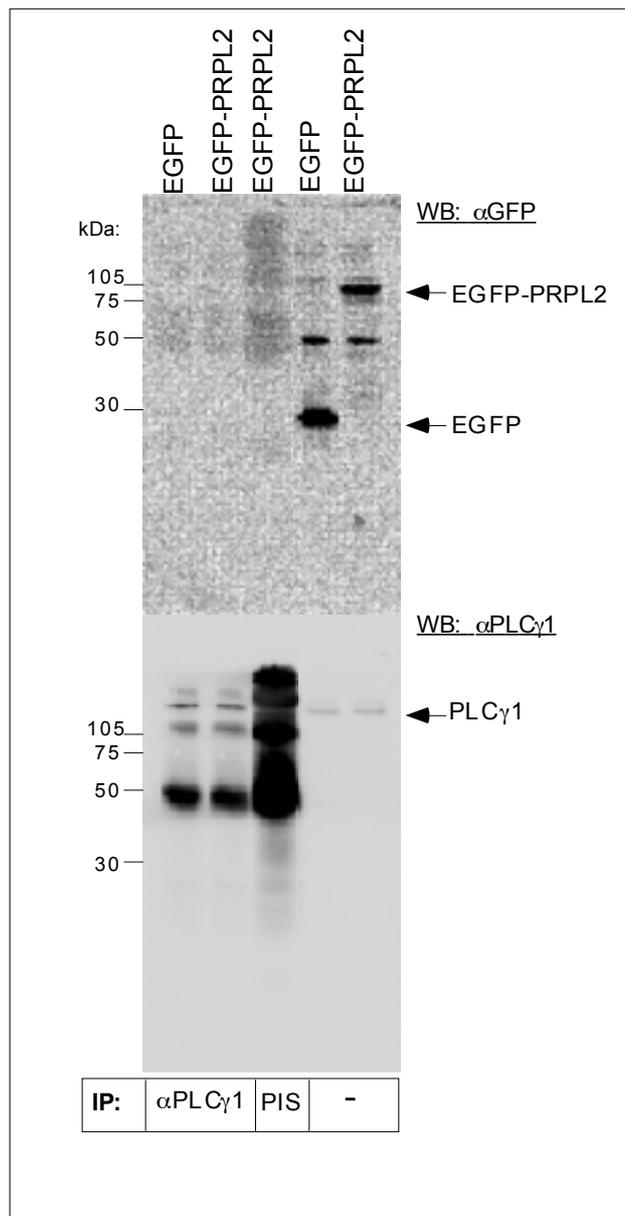
Eingesetzt wurden dafür Ganzzellextrakte von Cos-Zellen, die das EGFP-PRPL2-Fusionsprotein, oder EGFP allein exprimierten (zusammen mit einem Fusionsprotein FLAG-WASP, siehe Abschnitt 5.6), Ganzzellextrakte von nicht stimulierten PBMC sowie Antiseren gegen PLC $\gamma$ 1 und cSrc.

Die Ganzzellextrakte wurden mit dem jeweiligen Antiserum, oder einem geeigneten Präimmenserum, inkubiert und die gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe durch Inkubation mit Protein G-Sepharose präzipitiert und anschließend in Western Blots analysiert (Abb. 20 und 21).

Der Western Blot unter Verwendung des anti-PLC $\gamma$ 1-Antiserums zeigt in Abb. 20 (unten) die erfolgreiche Immunpräzipitation von PLC $\gamma$ 1. Eine Färbung dieses Western Blots mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper (oben) zeigt jedoch, daß keine Kopräzipitation des Fusionsproteins EGFP-PRPL2 erfolgte. Als Kontrolle für den Western Blot wurden Aliquots der Ganzzellextrakte verwendet (Bahnen "-").

Durch das anti-cSrc-Antiserum wurden, wie die Abbildung 21 zeigt, 2 Proteine von sehr ähnlichen Molekulargewichten präzipitiert. Ursache dafür ist, daß dieses Antiserum sowohl mit cSrc (60 kDa), als auch mit der verwandten Kinase Yes (62 kDa) reagiert.

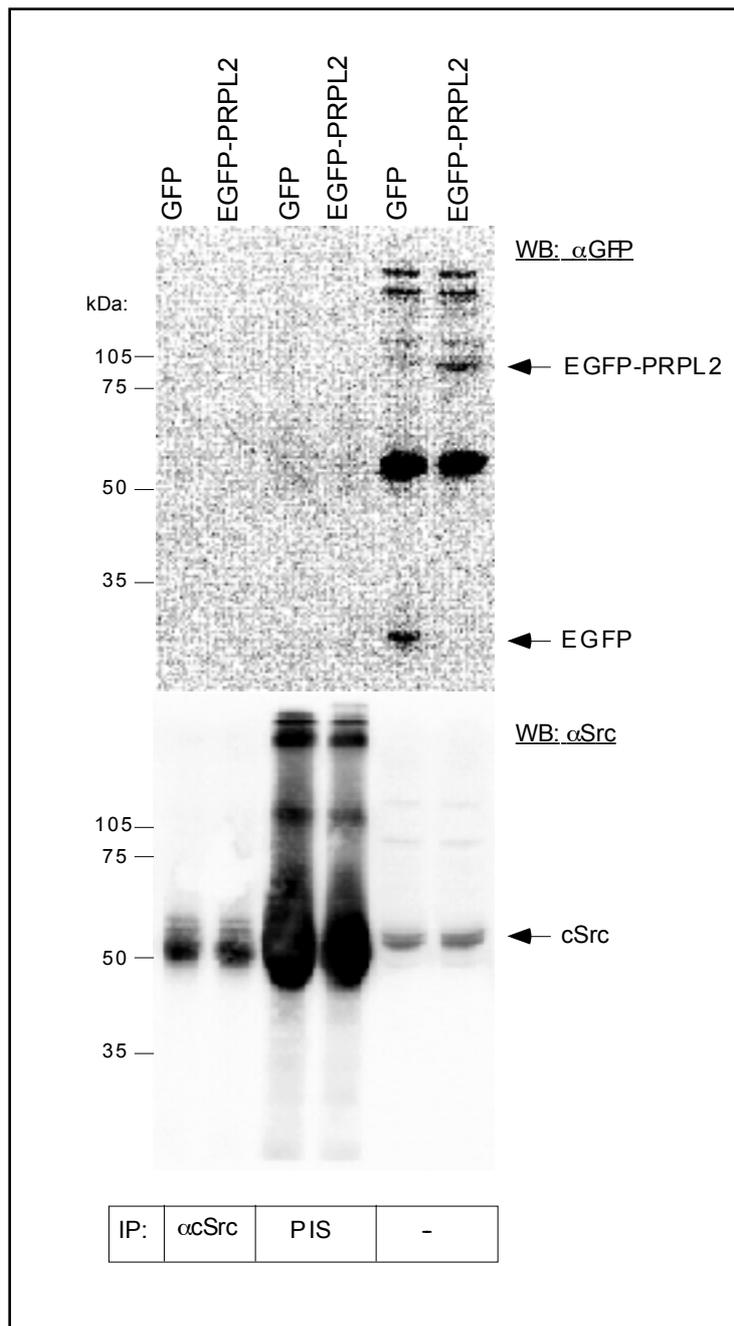
Eine Färbung des Western Blots mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper zeigt aber, daß keine Kopräzipitation des EGFP-PRPL2-Fusionsproteins mit dem endogenen cSrc erfolgte. Als Kontrolle wurden auch für diesen Western Blot Aliquots der Ganzzellextrakte verwendet (Bahnen "-").



**Abb. 20: PRPL2 kopräzipitiert nicht mit endogener PLC $\gamma$ 1.**

Immunpräzipitation (IP) von PLC $\gamma$ 1 aus Ganzzelextrakten von Cos-Zellen, die EGFP oder EGFP-PRPL2 zusammen mit FLAG-WASP exprimierten, unter Verwendung eines anti-PLC $\gamma$ 1-Antiserums oder eines Präimmunerums (PIS). Abgebildet ist ein Western Blot ("WB") der gebildeten Proteinkomplexe, gefärbt mit dem anti-PLC $\gamma$ 1-Serum oder einem monoklonalen anti-EGFP-Antikörper. Die Ganzzelextrakte wurden von Dr. A. Rühlmann zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen wurden Ganzzelextrakte ohne Immunpräzipitation aufgetragen (Bahnen "-").

Das Signal bei ca. 50 kDa wird durch die schweren Ketten der zur IP eingesetzten Immunglobuline verursacht. Diese Proteine werden durch den anti-PLC $\gamma$ 1-Antikörper detektiert, da für die IP und den Western Blot das selbe Antiserum eingesetzt wurde.



### Abb. 21: PRPL2 ko-präzipitiert nicht mit endogener cSrc

Immunpräzipitation von PLC $\gamma$ 1 aus Ganzzelextrakten von Cos Zellen, die EGFP oder EGFP-PRPL2 zusammen mit FLAG-WASP exprimierten, unter Verwendung eines anti-cSrc-Antiserums oder eines Präimmunserums (PIS). Abgebildet ist ein Western Blot der gebildeten Proteinkomplexe, gefärbt mit dem anti-cSrc-Serum oder einem monoklonalen anti-EGFP-Antikörper. Die Ganzzelextrakte wurden von Dr. A. Rühlmann zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen wurden Ganzzelextrakte ohne Immunpräzipitation aufgetragen (Bahnen "-").

Um auszuschließen, daß die Expression des FLAG-WASP Fusionsproteins, das auch mit PRPL2 interagiert (siehe Abschnitt 5.6), eine Interaktion mit PLC $\gamma$ 1 und cSrc beeinflusst, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt:

- Immunpräzipitation von endogener PLC $\gamma$ 1 und cSrc aus Cos-Zellen, die ausschließlich EGFP oder EGFP-PRPL2 exprimierten und
- Immunpräzipitation der endogenen cSrc aus nicht stimulierten PBMC.

In allen Fällen erfolgte jedoch keine Ko-Präzipitation von EGFP-PRPL2 oder dem endogenen PRPL2 (Daten nicht gezeigt).

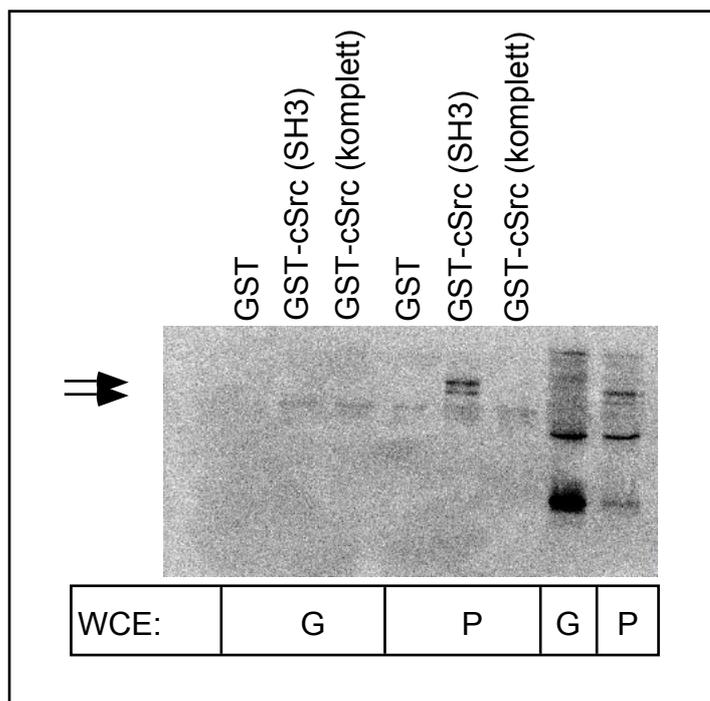
Da in den vorherigen Experimenten nur die SH3-Domäne von cSrc isoliert untersucht wurde, war eine wichtige Frage nun, ob PRPL2 prinzipiell in der Lage ist, *in vitro* mit dem kompletten cSrc-Protein zu interagieren. Dazu wurden in einem GST-*Pulldown*-Assay Ganzzellextrakte von Zellen eingesetzt, die entweder das EGFP-PRPL2-Fusionsprotein oder EGFP alleine exprimierten sowie das komplette cSrc Protein, oder dessen SH3-Domäne, N-terminal mit GST fusioniert. Die Ganzzellextrakte wurden mit einer mit dem jeweiligen GST-Fusionsprotein beladenen Glutathion-Sepharose-Matrix inkubiert und die gebundenen Komplexe in einem Western Blot mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper analysiert. Als Kontrolle wurden auf dem SDS-PAGE-Gel auch Aliquots der Ganzzellextrakte aufgetragen (Abb. 22).

Das Ergebnis zeigt eine deutliche Interaktion zwischen dem EGFP-PRPL2-Fusionsprotein und der SH3-Domäne von cSrc, nicht jedoch mit dem kompletten cSrc Protein. Die Kontrollansätze (Verwendung von Extrakten von EGFP exprimierenden Zellen bzw. GST alleine) zeigen keine solchen Interaktionen.

Das zweite präzipitierte Protein ist wahrscheinlich ein proteolytisches Abbauprodukt, welches auch in den direkt aufgetragenen Ganzzellextrakten zu finden ist. Der geringe Laufunterschied zwischen dem EGFP-Fusionsprotein in den Ganzzellextrakten und nach der Präzipitation (Abbildung 22) ist vermutlich auf Pufferunterschiede zurückzuführen.

## 5.6 Interaktion von PRPL2 mit WASP

Im Dezember 1997 wurde die Klonierung der cDNA eines Proteins beschrieben, das von den Autoren WIP (*WASP interacting protein*) bezeichnet wurde (182). Diese cDNA wurde aus einer cDNA-Bank der humanen Zelllinie KT3, die von einem T-Zell-Lymphom stammt, kloniert. Ein Sequenzvergleich (Abb.23) zeigt, daß WIP nahezu identisch mit PRPL2 ist, lediglich im C-terminalen Bereich gibt es deutliche Sequenzunterschiede. WIP interagiert *in vivo* mit dem Protein WASP, dessen Gen bei der Erbkrankheit Wiskott-Aldrich Syndrom defekt ist. Es konnte gezeigt werden, daß sich die für die Interaktion WASP-WIP verantwortliche Domäne im C-terminalen Bereich (Position 377-503) befindet (182).



**Abb. 22: *In vitro* Interaktion von PRPL2 mit cSrc.**

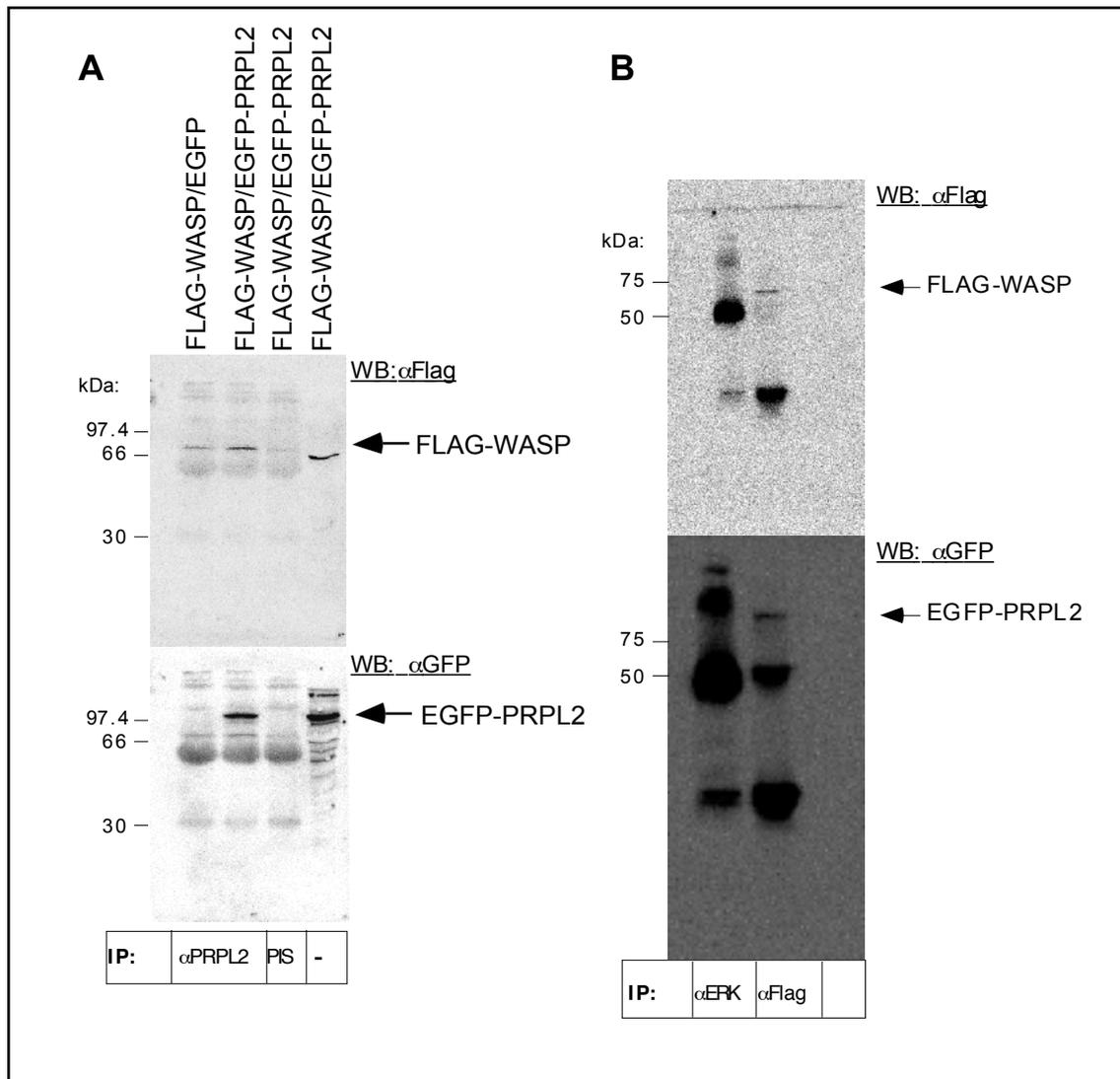
GST-Pulldown-Assay von Ganzelleextrakten ("WCE") von Cos-Zellen, die EGFP ("G") oder EGFP-PRPL2 ("P") exprimierten, gemischt mit den angegebenen GST-Fusionsproteinen. Die Abbildung zeigt einen Western Blot der präzipitierten Proteinkomplexe unter Verwendung eines monoklonalen anti-EGFP-Antikörpers. Als Kontrollen wurden Ganzellextrakte ohne Präzipitation aufgetragen (die beiden bahnen ganz rechts). Die Pfeile weisen auf die präzipitierten Proteine; das kleinere von beiden ist vermutlich ein Abbauprodukt von EGFP-PRPL2. Die Ganzellextrakte wurden von Dr. A. Rühlmann zur Verfügung gestellt.

Dies warf die Frage auf, ob PRPL2 trotz der Sequenzunterschiede zu WIP ebenfalls in der Lage ist, mit WASP zu interagieren. Um die Frage zu beantworten wurde untersucht, ob es möglich ist, einen eventuell existierenden WASP-PRPL2-Komplex mit entsprechenden Antiseren aus Ganzzellextrakten zu präzipitieren. Dazu wurde in Cos-Zellen ein N-terminal mit dem FLAG-Peptid DYKDDDDK fusioniertes WASP und das EGFP-PRPL2-Fusionsprotein, oder EGFP alleine exprimiert (Dr. A. Rühlmann; die Vektorenkarten befinden sich in den Anhängen 2 und 4). Nach 30h wurden die Zellen lysiert und die Ganzzellextrakte für Immunpräzipitationen (IP) eingesetzt. Verwendet wurden dabei ein monoklonaler anti-FLAG-Antikörper (Abb 24 B) und das anti-PRPL2-Antiserum #1247 (Abb. 24 A). Anschließend wurden die Präzipitate im Western-Blot

PRPL2	M P V P P P P A P P P P P T F A L A N T E K P T L N K T E Q A G R N A L L S D I	40
WIP	M P V P P P P A P P P P P T F A L A N T E K P T L N K T E Q A G R N A L L S D I	40
PRPL2	S K G K K L K K T V T N D R S A P I L D K P K G A G A G G G G G F G G G G G F	80
WIP	S K G K K L K K T V T N D R S A P I L D K P K G A G A G G G G G F G G G G G F	80
PRPL2	G G G G G G G G G S F G G G G P P G L G G L F Q A G M P K L R S T A N R D N D	120
WIP	G G G G G G G G G S F G G G G P P G L G G L F Q A G M P K L R S T A N R D N D	120
PRPL2	S G G S R P P L L P P G G R S T S A K P F S P P S G P G R F P V P S P G H R S G	160
WIP	S G G S R P P L L P P G G R S T S A K P F S P P S G P G R F P V P S P G H R S G	160
PRPL2	P P E P Q R N R M P P P R P D V G S K P D S I P P P V P S T P R P I Q S S L H N	200
WIP	P P E P Q R N R M P P P R P D V G S K P D S I P P P V P S T P R P I Q S S L H N	200
PRPL2	R G S P P V P G G P R Q P S P G P T P P P F P G N R G T A L G G G S I R Q S P L	240
WIP	R G S P P V P G G P R Q P S P G P T P P P F P G N R G T A L G G G S I R Q S P L	240
PRPL2	S S S S P F S N R P P L P P T P S R A L D D K P P P P P P V G N R P S I H R E	280
WIP	S S S S P F S N R P P L P P T P S R A L D D K P P P P P P V G N R P S I H R E	280
PRPL2	A V P P P P P Q N N K P P V P S T P R P S A P H R P H L R P P P P S R P G P P P	320
WIP	A V P P P P P Q N N K P P V P S T P R P S A P H R P H L R P P P P S R P G P P P	320
PRPL2	L P P S S S G N D E T P R L P Q R N L S L S S S T P P L P S P G R S G P L P P P	360
WIP	L P P S S S G N D E T P R L P Q R N L S L S S S T P P L P S P G R S G P L P P P	360
PRPL2	P S E R P P P P V R D P P G R S G P L P P P P P V S R N G S T S R A L P A T P Q	400
WIP	P S E R P P P P V R D P P G R S G P L P P P P P V S R N G S T S R A L P A T P Q	400
PRPL2	L P S R S G V D S P R S G P R P P L P P D R P S A G A P P P P P S T S I R N G	440
WIP	L P S R S G V D S P R S G P R P P L P P D R P S A G A P P P P P S T S I R N G	440
PRPL2	F Q D S P C E D E W E S R F Y F H P I S D L P P P E P Y V Q T T K S Y P S K L A	480
WIP	F Q D S P C E D E W E S R F Y F H P I S D L P P P E P Y V Q T T K S Y P S K L A	480
PRPL2	* *	
PRPL2	R N E S R S *	493
WIP	R N E S R S G S N R R E R G G P L P P I P R	503

**Abb. 23: Sequenzvergleich der Proteine WIP und PRPL2.**

Die Markierungen zeigen Sequenzunterschiede zwischen den Proteinen (Kasten) und die Position der zur Gewinnung der Antiseren gegen PRPL2 eingesetzten Peptide (\*).



### Abb. 24: Interaktion von PRPL2 und WASP.

Immunpräzipitation (IP) der Proteine EGFP-PRPL2 und FLAG-WASP aus Ganzzell-extrakten von Zellen, die EGFP oder EGFP-PRPL2 zusammen mit FLAG-WASP exprimierten, unter Verwendung des anti-PRPL2-Antiserums #1247 (**A**), eines an Sepharose gekoppelten monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers (**B**), sowie eines Prä-immunserums (PIS) bzw. eines monoklonalen anti-Erk-Antikörpers als Kontrollen. In B) wurden Extrakte von Cos-Zellen verwendet, die die Fusionsproteine EGFP-PRPL2 und FLAG-WASP exprimierten. Abgebildet sind Western Blots der präzipitierten Protein-komplexe, gefärbt mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper oder einem monoklonalen anti-EGFP-Antikörper. Als Kontrollen wurden in A) Ganzzellextrakte ohne Immunpräzipitation aufgetragen (Bahnen "-").

Die Ganzzellextrakte wurden von Dr. A. Rühlmann zur Verfügung gestellt.

Die Signale bei ca. 50 kDa werden durch die schweren Ketten der für die IP verwendeten Immunglobuline verursacht.

analysiert. Die Abb. 24 A zeigt im unteren Teil einen Western Blot der präzipitierten Proteine mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper. Dieser Western Blot beweist die erfolgreiche Immunpräzipitation des GFP-PRPL2-Fusionsproteins. Eine Präzipitation durch das Präimmunserum (PIS) erfolgte nicht. Als Kontrolle wurde ein Aliquot des Ganzzellextraktes ohne Präzipitation aufgetragen (Bahn "-").

Die starken Signale zwischen 50 und 60 kDa werden von dem für die IP verwendeten Serum hervorgerufen.

Eine Färbung dieses Western Blots mit einem anti-FLAG-Antikörper (Abb. 24 A oben) zeigt die Kopräzipitation des FLAG-WASP-Fusionsproteins mit dem anti-PRPL2-Antiserum. Auffallend ist, daß sowohl aus den Extrakten von Zellen, die EGFP-PRPL2 exprimieren, als auch aus Extrakten von Zellen, die nur EGFP exprimieren, FLAG-WASP mit dem anti-PRPL2-Antiserum präzipitierbar ist. Ursache dafür ist, daß das Serum #1247 ebenfalls WASP erkennt (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist die Menge des präzipitierten FLAG-WASP im Falle der Zellen, die EGFP-PRPL2 exprimieren deutlich höher. Dieses Experiment war der erste Hinweis auf eine Interaktion zwischen PRPL2 und WASP. Eine Wiederholung dieses Experimentes bestätigte dieses Resultat. Der geringe Laufunterschied zwischen dem präzipitierten Protein und dem Protein in den Ganzzellextrakten ist vermutlich auf Pufferunterschiede zurückzuführen.

Das anti-PRPL2-Antiserum #1245, das WASP nicht erkennt, erwies sich als nicht für Immunpräzipitationen geeignet (Daten nicht gezeigt).

Die Abb. 24 B zeigt eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper, kovalent an einer Sepharose-Matrix gebunden. Verwendet wurde dafür ein Extrakt von Zellen, die das FLAG-WASP-Fusionsprotein zusammen mit dem EGFP-PRPL2-Fusionsprotein exprimierten. Ein Western Blot der präzipitierten Proteine mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper (Abb. 24 B unten) zeigt die erfolgreiche Immunpräzipitation des EGFP-PRPL2-Fusionsproteins. Mit dem monoklonalen anti-ERK-Antikörper als Kontrolle erfolgte hingegen keine Präzipitation. Eine Färbung dieses Western Blots mit dem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper beweist die

Kopräzipitation des FLAG-WASP-Proteins; wiederum erfolgte keine Präzipitation mit dem anti-ERK-Antikörper als Kontrolle.

Zusammenfassend zeigen die Resultate der beiden Experimente die Interaktion der Proteine PRPL2 und WASP in dem verwendeten System.

## 6. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Signalübertragung in humanen Leukozyten zu gewinnen. Dabei beschäftigte sich der erste Teil mit  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signalwegen und deren Beeinflussung durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA). In den Experimenten des zweiten Teils der Arbeit wurde die Funktion des Proteins PRPL2 untersucht, das vorwiegend im hämatopoetischen System exprimiert wird. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Beteiligung von PRPL2 an Prozessen der Signalübertragung.

### 6.1 Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und CREB

Für die im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Experimente wurden als Untersuchungssystem primäre humane Leukozyten des peripheren Blutes verwendet, um so nah wie möglich die *in vivo* Situation im lebenden Organismus zu untersuchen.

Ausgangspunkt war die Beobachtung, daß die Expression des Enzyms DNA Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) in humanen Leukozyten durch eine Calcium-Signal (Inkubation mit Ionomycin) induziert wird, und daß diese Induktion durch therapeutische Konzentrationen von CsA inhibiert wird. Dieses Enzym ist von besonderer Bedeutung für eine Form der DNA-Reparatur, die als BER (*base excision repair*) bezeichnet wird (183).

Der Promotor von *pol  $\beta$*  enthält eine zentrale CRE-Sequenz und drei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1 (171, 184). Es ist bekannt, daß in verschiedenen Zelllinien eine Mutation der CRE-Sequenz den Promotor inaktiviert und das die Regulation des Promotors in verschiedenen Systemen über diese CRE-Sequenz erfolgt (169-172, 185). An diese CRE-Sequenz binden die Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB-Familie. Um die Signalwege zu untersuchen, die potentiell in die Regulation von *pol  $\beta$*  nach einem Calcium-Signal in humanen Leukozyten involviert sind, wurde

zuerst analysiert, ob die Transkriptionsfaktoren CREB und/oder ATF-2 in den Ganzzelextrakten von primären Leukozyten *in vitro* an den *pol*  $\beta$ -Promotor binden und eventuell eine Änderung der DNA-Bindungsaktivität nach Induktion der Zellen festzustellen ist. In den dazu durchgeführten EMSA-Experimenten gelang es, fünf Protein/DNA-Komplexe zu identifizieren, die spezifisch an der CRE-Sequenz des *pol*  $\beta$ -Promotors entstanden (Abb. 4). Dabei wurden die Komplexe I-III von einem anti-CREB-Antiserum nahezu vollständig in ihrem Laufverhalten beeinflusst, und sie wurden teilweise von einem Antiserum beeinflusst, das für an Ser133 phosphoryliertes CREB spezifisch ist. Der Komplex IV wurde hingegen sowohl von dem anti-CREB-Antiserum, als auch von einem anti-ATF-2-Antiserum erkannt. Diese Daten lassen folgende Schlüsse zu:

- Die Komplexe I-III bestehen aus CREB-Homomeren und enthalten sowohl unphosphoryliertes, als auch phosphoryliertes CREB.
- Bei dem Komplex IV handelt es sich um eine ATF-2/CREB-Heteromer. Dafür spricht, daß beide Antiseren (anti-CREB und anti-ATF-2) diesen Komplex in seinem Laufverhalten beeinflussen und daß er im Gel zwischen den als CREB-Homomere identifizierten Komplexen I-III und exogenem ATF-2 läuft.
- Der, wenn auch sehr schwache, Komplex V entspricht einem endogenem ATF-2-Homomer.

Eine Komplexbildung zwischen ATF-2 und CREB wurde von auch von anderen Autoren beschrieben (186). Durch diese Experimente läßt sich zeigen, daß sowohl endogenes CREB, als auch endogenes ATF-2 an die CRE-Sequenz des *pol*  $\beta$ -Promotors binden. Dabei bindet ATF-2 vorwiegend als Heteromer mit CREB. Diese Daten sind die ersten Anhaltspunkte für eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren CREB und/oder ATF-2 an der beobachteten Regulation von DNA Polymerase  $\beta$  in primären humanen Leukozyten. Eine Aktivierung der Zellen veränderte die Bildung der Komplexe allerdings nicht, es ist keine Zunahme der DNA-Bindungsaktivität der Proteine festzustellen. Dieser Befund schließt eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren an der Regulation des *pol* $\beta$ -Promotors nicht aus, da auch von

anderen Autoren die Regulation eines Promotors durch konstitutiv gebundene ATF-2 Komplexe beschrieben wurde (187).

Die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und CREB werden durch Phosphorylierungen aktiviert. Die Experimente zur Analyse des Phosphorylierungszustandes der endogenen Proteine zeigten in der überwiegenden Anzahl untersuchter Blutproben eine Induktion der Phosphorylierung von ATF-2 durch Ionomycin an der kritischen Position Thr71. Diese Induktion wurde durch CsA zu über 50% inhibiert.

Andererseits erfolgte zwar eine schwache Induktion der Phosphorylierung von CREB an der für die Aktivität wichtigen Position Ser133, diese wurde jedoch nicht durch eine Behandlung der Zellen mit CsA beeinflußt. Die relativ hohe Grundphosphorylierung von CREB in unbehandelten Zellen ist vermutlich auf Prozesse während der Aufreinigung der Zellen zurückzuführen. Mehrere Wiederholungen dieses Experimentes unter Verwendung von Zellen unterschiedlicher Blutspender bestätigten diese Befunde.

Zusammenfassend zeigen die Experimente, daß endogenes ATF-2 in humanen primären Leukozyten in Form eines CREB/ATF-2-Komplexes an die CRE-Sequenz des *pol*  $\beta$ -Promotors unabhängig vom Phosphorylierungszustand bindet und ein Calcium-Signal die Phosphorylierung einer für die Aktivität entscheidenden Aminosäure in ATF-2 induziert. Diese Induktion wird durch CsA inhibiert.

## **6.2 Aktivierung von Teilen des MAPK-Netzwerkes durch Ca<sup>2+</sup>**

Es wurde dann versucht, die für die Phosphorylierung von ATF-2 verantwortliche Kinase zu identifizieren. Bislang wurden vor allem SAPK1, SAPK2, SAPK3 und SAPK4 (17, 18, 80, 81) als Kinasen beschrieben, die zumindest *in vitro* ATF-2 an der Position Thr71 phosphorylieren.

### *SAPK2a/p38*

Die durchgeführten Experimente hinsichtlich der Aktivität der SAPK2a/p38 zeigen, daß diese Kinase in humanen primären Leukozyten durch ein Calcium-Signal aktiviert wird

und daß diese Aktivierung durch CsA inhibiert wird. Die Daten von zwei Experimenten beweisen diesen Effekt:

- Es konnte nachgewiesen werden, daß eine Behandlung der Zellen mit Ionomycin die Phosphorylierung der endogenen SAPK2a an der Position Tyr 182 induziert. Dies ist eine von zwei Aminosäuren, die während der Aktivierung von SAPK2a phosphoryliert werden (173). Diese Induktion wird durch CsA inhibiert
- Ebenso konnte gezeigt werden, daß die Kinase MAPKAPK-2 durch Ionomycin aktiviert wird und daß dieser Effekt ebenfalls durch CsA inhibiert wird. MAPKAPK-2 ist ein gut charakterisiertes Substrat von SAPK2a.

Interessant ist, daß diese Induktion der SAPK2a-Aktivität durch eine gleichzeitige Behandlung mit PMA noch deutlich verstärkt wird. Dies zeigt eine Beteiligung von Kinasen der Proteinkinase C-Familie, von denen einige durch PMA aktiviert werden (188).

Potentielle *upstream* Kinasen von SAPK2a sind die MAPK-Kinasen MKK3 und MKK6. Es ließ sich zeigen, daß eine Behandlung mit Ionomycin die Kinase MKK6 aktiviert und daß diese Aktivierung ebenfalls durch CsA inhibiert wird. Im Gegensatz dazu wurde keine Aktivierung von MKK3 gefunden. Diese Präferenz überrascht nicht, da von mehreren Autoren MKK6 als die entscheidende SAPK2a aktivierende Kinase beschrieben wurde (32, 33).

Diese Experimente zeigen, daß ein Calcium-Signal in der Lage ist, den MKK6-SAPK2a-Weg zu aktivieren, ein Effekt, der durch CsA inhibiert wird.

1998 wurden ähnliche Daten zur Aktivierung von SAPK2a/p38 in der humanen T-Zelllinie Jurkat veröffentlicht (189). Interessant dabei ist, daß es Unterschiede in den Resultaten gibt. So wurde p38 in den in dieser Publikation (189) gezeigten Experimenten nur sehr schwach durch das Calciumionophor A23187 aktiviert. Des weiteren wurde zwar eine Aktivierung von MKK6 durch Calcium in Jurkat-Zellen gefunden, nicht jedoch in der Jurkat-Linie TAg-Jurkat. Dies weist auf mögliche Unterschiede im Signalgeschehen zwischen primären Zellen und etablierten Zelllinien hin. Eine Beeinflussung der Signalübertragung in den primären CD2<sup>+</sup> Zellen durch die

Positivselektion über das Protein CD2 während der Aufreinigung ist in diesem Fall auszuschließen, da die Aktivierung von SAPK2a auch in PBMC gefunden wurde.

In der angeführten Publikation wurde auch ein wesentlich geringerer Effekt von CsA auf die Aktivierung von MKK6 durch PMA und Ionomycin gezeigt. Eine mögliche Erklärung dafür ist die eingesetzte geringere Konzentration von CsA (100 nM).

### *SAPK1/JNK*

Neben der SAPK2a wurden auch die Kinasen der SAPK1-Familie untersucht. Als Maß für deren Aktivität wurde der Phosphorylierungszustand der endogenen Kinasen der SAPK1-Familie untersucht, da sie ebenfalls durch die Phosphorylierung an einem Thr und einem Tyr aktiviert werden. Es wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung der 55 und 46 kDa großen Isoformen (JNK 1 $\alpha$ 1, 1 $\beta$ 1, 2 $\alpha$ 1, 2 $\beta$ 1, bzw. JNK 1 $\alpha$ 2, 1 $\beta$ 2, 2 $\alpha$ 2, 2 $\beta$ 2) durch eine Behandlung mit Ionomycin induziert werden und daß CsA diese Induktion inhibiert. Eine Differenzierung zwischen den Isoformen ist allerdings nicht möglich. Eine Induktion der JNK 3-Isoformen wurde nicht gefunden, allerdings gilt es zwei Punkte zu berücksichtigen:

- die Expression von JNK 3 wurde bislang nur in neuronalem Gewebe beschrieben und
- es ist fraglich, ob das verwendete SDS-PAGE-System die JNK3-Isoformen mit einer Größe von 48 kDa (JNK 3 $\alpha$ 1) und 57 kDa (JNK 3 $\alpha$ 2) gut genug von den anderen Isoformen getrennt hätte.

Auffallend ist, daß eine solche Induktion in weniger als 50% der Fälle gefunden wurde, eine CsA-Sensitivität in nur einem von drei Fällen. Die Ursachen für diese dramatischen Differenzen zwischen einzelnen Blutspendern gilt es noch zu untersuchen. So wäre es interessant zu sehen, ob eine möglicherweise existierende Infektion die Aktivierung beeinflusst, oder ob eventuell die Zellen von Allergikern andere Reaktionen aufweisen.

### *Andere Kinasen; Unterscheidung der Signalwege*

Als letzte, potentiell ATF-2 phosphorylierende Kinase wurde SAPK4 untersucht. Es konnte aber keine Aktivierung der Kinase durch Ionomycin oder PMA plus Ionomycin nachgewiesen werden. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß diese Kinase in Leukozyten nur sehr schwach exprimiert wird (18).

Der Einsatz des Inhibitors SB 203580 ergab zusätzliche Informationen über die verschiedenen Signalwege. Die über die Beeinflussung der verschiedenen SAP-Kinasen bislang publizierten Daten faßt Tabelle 10 zusammen.

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Induktion von *pol β*, als auch die induzierte Phosphorylierung von ATF-2 erst bei hohen Konzentrationen (100 µM) von SB 203580 deutlich beeinflußt wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivierung der MAPKAP-K2 durch Ionomycin mit 10 µM SB 203580 komplett inhibiert.

**Tab.10:** Einfluß von SB 203580 auf die Aktivität der SAP-Kinasen

Kinase	Effekt von SB 203580	Referenz
SAPK1	Teilweise Inhibition einzelner Isoformen bei Konzentrationen von 50 µM und höher	(175)
SAPK2a	Inhibiert mit einem IC <sub>50</sub> von 50-100 nM	(63)
SAPK3	Keine Inhibition bis 100 µM	(17)
SAPK4	Keine Inhibition bis 100 µM	(18)

Aus diesen Daten lassen sich die mehrere Schlüsse für die Ca<sup>2+</sup>-induzierte Signalübertragung zum *polβ*-Promotor in humanen Leukozyten ziehen. So konnte gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor ATF-2 potentiell in diese Regulation involviert ist. Dafür sprechen drei Argumente:

- ATF-2 ist in der Lage, in Form eines Komplexes mit CREB an die CRE-Sequenz des Promotors zu binden.

- Die für die Aktivität von ATF-2 wichtige Phosphorylierung der Position Thr71 wird durch Ionomycin induziert und durch CsA inhibiert.
- Diese Aktivierung wird, vergleichbar mit der *pol β*-Regulation, erst bei höheren Konzentrationen des Inhibitors SB 203580 beeinflusst.

Die Identität der für diese Aktivierung von ATF-2 verantwortlichen Kinase ist nicht geklärt. Folgende Befunde gilt es dabei zu berücksichtigen:

- SAPK2a/p38: Diese Kinase wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  CsA-sensitiv aktiviert. Die Aktivität dieser Kinase, und damit die Aktivierung ihres Substrates MAPKAP-K2, wird durch den Inhibitor SB 203580 mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  komplett inhibiert. Andererseits werden die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Induktion der Phosphorylierung von ATF-2 und die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Induktion von *pol β* erst bei einer Konzentration von SB 203580 von 100  $\mu\text{M}$  deutlich beeinflusst. Diese Daten zeigen, daß weder SAPK2a, noch MAPKAP-K2 die für diese Prozesse entscheidenden Kinasen sind.
- SAPK1: Für verschiedene Isoformen dieser Kinasen wurde in der Literatur eine Beeinflussung durch höhere Konzentrationen von SB 203580 beschrieben. Diese Kinasen werden zwar durch Ionomycin aktiviert, allerdings in weniger als 50% der untersuchten Fälle und ein CsA-Effekt auf die Ionomycin-Induktion wurde in nur einem von drei Fällen gefunden. Dieser Punkt spricht gegen eine generelle Beteiligung dieser Kinasen.
- SAPK4: Diese Kinase wird *in vitro* selbst bei hohen Konzentrationen von SB203580 nicht inhibiert. Des weiteren wurde keine Aktivierung der Kinase durch Ionomycin gefunden.
- SAPK3: Diese Kinase wurde zwar nicht gemessen, allerdings wird SAPK3 *in vitro* selbst bei hohen Konzentrationen von SB203580 nicht inhibiert.

Alle diese Punkte sprechen für die Existenz einer zusätzlichen Kinase, die in der Lage ist, ATF-2 CsA-sensitiv zu phosphorylieren und die durch Ionomycin aktiviert wird.

Um ein vollständiges Bild der Signalübertragung zu bekommen, sind allerdings noch umfangreiche Experimente notwendig. So müßte eine Involvierung von ATF-2 auch in Transfektionsstudien gezeigt werden. Es ist jedoch notwendig, diese Experimente in

primären Zellen durchzuführen, da eine Ionomycin-stimulierte Aktivierung von *pol β* in Zelllinien nicht gefunden wurde (Dr.A.Rühlmann, Daten nicht gezeigt).

Ebenso ist es interessant, mehr über die Prozesse zu erfahren, die zur Aktivierung des MKK6/SAPK2a-Weges führen. Als potentielle Kinasen, die MKK6 aktivieren können, kämen vor allem Pyk 2 und DLK in Frage. So konnte gezeigt werden, daß DLK durch Calcineurin aktiviert wird, diese Aktivierung wird durch CsA inhibiert (152). Allerdings ist bislang nichts über die Expression von DLK im hämatopoetischen System bekannt.

Für Pyk2 spricht, daß diese Kinase durch Calcium aktivierbar ist (61).

Als Kinasen, die die beobachtete Induktion von SAPK1/JNK vermitteln, kommen vor allem die Kinasen MKK4 und MKK7 in Betracht.

### **6.3 Expression des Proteins PRPL2 und Zelllokalisierung**

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit funktionellen Aspekten des Proteins PRPL-2. Die cDNA für PRPL2 wurde aus einer cDNA-Bank von humanen Tonsillen kloniert und kodiert für ein 493 Aminosäuren großes Protein. Kennzeichnend ist die stark Gewebe-spezifische Expression. So wurde eine sehr starke Expression der mRNA im hämatopoetischen Gewebe, der Niere und dem Blinddarm gefunden. Außerhalb dieses Bereichs wird PRPL2 nur gering exprimiert, Ausnahmen sind der Okzipitallappen und die *Medulla oblongata* im Gehirn (Dr. A. Rühlmann, Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung auf Proteinebene zeigte die Expression eines Proteins von ca. 57 kDa. Bei der *in vitro* Transkription und Translation von PRPL2 entstanden immer zwei Produkte: ein Hauptprodukt des erwarteten Molekulargewichts und ein ca. 12 kDa größeres Protein. Daß es sich dabei um ein Artefakt der Reaktion handelt ist wenig wahrscheinlich, da die Größe dieses Proteins in Abhängigkeit von der Größe des eingesetzten PRPL2-Fragments schwankte (Abb. 18 B). Ein zusätzlicher größerer Leseraster ist in dem eingesetzten Plasmid auch nicht zu finden. Vermutlich

handelt es sich daher bei diesem Protein um eine modifizierte Form von PRPL2. So sind in der IVTT eine ganze Reihe von chemischen Modifizierungen, wie Phosphorylierungen, möglich. PRPL2 enthält mit 60 Serin-, sieben Tyrosin- und 20 Threoninresten eine große Anzahl potentiell phosphorylierbarer Aminosäuren. Das Phosphorylierungen das scheinbare Molekulargewicht drastisch verändern können, zeigt beispielsweise die  $\zeta$ -Kette des T-Zellrezeptors. Eine Phosphorylierung an sechs Tyrosinresten dieses Proteins führt zu einem Laufunterschied im SDS-Gel von 2 kDa (190).

PRPL2 Protein wurde in primären Zellen (PBMC und CD2<sup>+</sup> Zellen), sowie in den untersuchten hämatopoetischen Zelllinien BJAB (eine B-Zelllinie) und U937 (eine monozytäre Zelllinie) gefunden. Auffallend ist die sehr niedrige Expression in Jurkat-Zellen, einer T-Zelllinie, im Unterschied zu primären CD2<sup>+</sup> Zellen. Hier scheint sich ein Unterschied in der Expression zwischen primären Zellen und etablierten Zelllinien abzuzeichnen.

In HeLa-Zellen, einer Fibroblasten-Zelllinie, wurde hingegen kein PRPL2 gefunden. Dies deckt sich mit dem Expressionsmuster auf mRNA-Ebene.

Cos-1 ist zwar auch eine Fibroblasten-Zelllinie, allerdings läßt sich die, wenn auch schwache, Expression von PRPL2 damit erklären, daß diese Zelllinie aus Zellen der Niere etabliert wurde. Daß dieses endogene PRPL2 in anderen Western Blots mit Extrakten aus Cos-Zellen nicht detektiert wurde (siehe Abb. 13), ist vermutlich auf die zu kurzen Expositionszeiten zurückzuführen.

Bei der Untersuchung der Zelllokalisierung zeigte sich eine strikt zytoplasmatische Lokalisation eines EGFP-PRPL2-Fusionsproteins. Eine genauere Abgrenzung der Lokalisation ist allerdings nicht möglich.

#### **6.4 Interaktion von PRPL2 mit SH3-Domänen**

Charakteristisch für PRPL2 ist sein mit ca. 27% sehr hoher Anteil an Prolinresten. Solche Prolin-reiche Regionen sind in vielen Proteinen Interaktionspartner von SH3-

Domänen. Aus diesem Grund wurde die potentielle Interaktion von PRPL2 mit Proteinen untersucht, die SH3-Domänen enthalten. Es gelang zu zeigen, daß PRPL2 *in vitro* selektiv mit den SH3-Domänen von PLC $\gamma$ 1, p85 und cSrc interagiert, nicht jedoch mit denen von GAP und Crk. Ebenfalls keine Interaktion erfolgte mit NSrc, einer neuronal spezifischen Form von cSrc, die eine Insertion von 6 Aminosäuren in Ihrer SH3-Domäne enthält.

Für diese Interaktion sind unterschiedliche Abschnitte von PRPL2 verantwortlich. Während eine verkürzte Form von PRPL2 (Positionen 91-263) mit einer ähnlichen Affinität wie PRPL2 mit PLC $\gamma$ 1 interagiert, verringert diese Verkürzung des Proteins die Affinität zu cSrc erheblich (Abb. 18), es wurde in diesem Fall nur eine sehr geringe Wechselwirkung gesehen. Im C-terminalen Bereich ist PRPL2 durch das sich dreimal wiederholende Aminosäuremotiv RSGP<sup>L</sup>/<sub>R</sub>PP<sup>P</sup>/<sub>L</sub>P<sup>S</sup>/<sub>P</sub> gekennzeichnet. Ein dazu homologes Motiv befindet sich ebenfalls im C-terminalen Bereich des Proteins WASP und ist dort für die Interaktion mit den SH3-Domänen von PLC $\gamma$ 1 und cSrc verantwortlich. Das in Abb. 18 dargestellte Experiment verdeutlicht aber, daß im Falle von PRPL2 die Interaktion, zumindest mit PLC $\gamma$ 1, nicht über dieses Motiv erfolgt; eine Deletion des C-terminalen Bereichs beeinflusst diese Interaktion nicht.

Nach den bislang vorliegenden Ergebnissen scheinen diese Interaktionen *in vivo* jedoch nicht zu erfolgen. So ließ sich in keinem Fall eine Kopräzipitation von PRPL2 mit cSrc oder PLC $\gamma$ 1 aus Ganzzellextrakten zeigen. Dafür sind vor allem drei Erklärungen denkbar:

- die gleichzeitige Expression von FLAG-WASP in den untersuchten Zellen beeinträchtigt die Wechselwirkungen,
- es erfolgt zwar eine Interaktion mit dem *in vitro* transkribierten und translatierten Protein, nicht jedoch mit dem zellulären, oder
- es erfolgt eine Interaktion mit der isolierten SH3-Domäne, nicht jedoch mit dem kompletten Protein.

Es wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt, die die folgenden Aussagen ermöglichen:

- die Expression von FLAG-WASP hat offensichtlich keinen Einfluß auf eine Interaktion zwischen den Proteinen und
- es erfolgt auch in einem *GST-Pulldown-Assay* unter Verwendung von Ganzzelextrakten eine Interaktion mit den verschiedenen GST-SH3-Fusionsproteinen.

Die tatsächliche Erklärung ist, zumindest für cSrc, daß es einen deutlichen Unterschied in der Interaktion von PRPL2 mit dem kompletten Protein cSrc und der isolierten SH3-Domäne gibt. Vermutlich ist aufgrund der Faltung des Proteins die SH3-Domäne nicht mehr zugänglich, wodurch eine Interaktion verhindert wird. Bei der abschließenden Beurteilung der Immunpräzipitationsexperimente muß aber berücksichtigt werden, daß cSrc in ruhenden Zellen durch eine Interaktion der SH2-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosin-Rest im C-terminalen Bereich und eine Interaktion der SH3-Domäne mit einer Prolin-reichen Region zwischen der SH2- und der Kinase-Domäne kompakt gefaltet ist (158). Es ist daher nicht auszuschließen, daß diese Faltung eine Interaktion mit PRPL-2 verhindert und eine solche Wechselwirkung nach einer Aktivierung von cSrc möglich wird.

## **6.5 Interaktion von PRPL2 mit WASP**

Das Protein WIP wurde 1997 aus einer humanen T-Zelllinie kloniert und ist hoch homolog zu PRPL2. Lediglich in der C-terminalen Region gibt es Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Es wäre in weiterführenden Experimenten interessant, das Expressionsmuster der beiden Proteine zu vergleichen, ob es eventuell Unterschiede gibt zwischen primären Zellen, aus denen PRPL2 kloniert wurde, und Leukämiezellen, aus denen WIP kloniert wurde.

Auf der funktionellen Ebene ist die Interaktion von WIP mit WASP beschrieben wurden (182). Das Gen für WASP ist im Wiskott-Aldrich Syndrom defekt, einer Krankheit, die durch eine Thrombopenie, Hauterkzemen und einer generellen Immunschwäche der

Patienten gekennzeichnet ist. WASP selbst ist vor allem in die Regulation des Zytoskeletts involviert (191).

Ebenso wie WIP ist auch PRPL2 in der Lage, mit WASP zu interagieren. Dies wurde durch die Kopräzipitation der beiden Proteine aus Ganzzelextrakten mit Hilfe entsprechender Antiseren bewiesen. Damit liegt ein erster Anhaltspunkt für eine biologische Funktion von PRPL2 vor.

Weiterführende Untersuchungen sollten sich auf die folgenden Punkte erstrecken:

- Ist PRPL2, wie für WIP gezeigt, ebenfalls in die Regulation von Strukturen des Zytoskeletts involviert? Läßt sich in einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse eine Lokalisation von PRPL2 an Teilen des Zytoskeletts zeigen?
- Welche Auswirkungen hat die sehr niedrige Expression von PRPL2 und WIP auf die Jurkat-Zellen in Vergleich zu primären T-Lymphozyten? Da das zur Gewinnung des Antiserums #1247 verwendete Peptid in PRPL2 und WIP identisch ist, läßt die Abbildung 14 eine Aussage über beide Proteine zu.
- Liegt PRPL2 eventuell in der Zelle phosphoryliert vor? Wenn ja, welche Auswirkungen hat das auf die Interaktionen?

Die im zweiten Teil beschriebenen Experimente zeigen die selektive Expression von PRPL2 auf Proteinebene und seine *in vivo*-Interaktion mit WASP. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß PRPL2 zumindest *in vitro* in der Lage ist, selektiv mit einzelnen SH3-Domänen zu interagieren.

## 7. LITERATUR

1. Cahill, M. A., Janknecht, R., and Nordheim, A., Signaling pathways: jack of all cascades, *Curr. Biol.*, 6, 16-19 (1996).
2. Cohen, P., The search for physiological substrates of mitogen- and stress-activated protein kinases in mammalian cells., *Trends Cell Biol.*, 7, 353-361 (1997).
3. Troppmair, J., Bruder, J. T., Munoz, H., Lloyd, P. A., Kyriakis, J., Banerjee, P., Avruch, J., and Rapp, U. R., Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation, *J. Biol. Chem.*, 269, 7030-7035 (1994).
4. Lubinus, M., Meier, K. E., Smith, E. A., Gause, K. C., LeRoy, E. C., and Trojanowska, M., Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 269, 9822-9825 (1994).
5. Peraldi, P., Scimeca, J. C., Filloux, C., and Van Obberghen, E., Regulation of extracellular signal-regulated protein kinase-1 (ERK-1; pp44/mitogen-activated protein kinase) by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells: implication of ERK1 inhibitory activities, *Endocrinology*, 132, 2578-2585 (1993).
6. Amaral, M. C., Casillas, A. M., and Nel, A. E., Contrasting effects of two tumour promoters, phorbol myristate acetate and okadaic acid, on T-cell responses and activation of p42 MAP-kinase/ERK-2, *Immunology*, 79, 24-31 (1993).
7. Qui, M. S., and Green, S. H., PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity, *Neuron*, 9, 705-717 (1992).
8. Matsuda, S., Kawasaki, H., Moriguchi, T., Gotoh, Y., and Nishida, E., Activation of protein kinase cascades by osmotic shock, *J. Biol. Chem.*, 270, 12781-12786 (1995).
9. Fialkow, L., Chan, C. K., Rotin, D., Grinstein, S., and Downey, G. P., Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants., *J. Biol. Chem.*, 269, 31234-31242 (1994).
10. Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dal, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R., The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases, *Nature*, 369, 156-159 (1994).

11. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M., Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain, *Genes Dev.*, **7**, 2135-2148 (1993).
12. Moriguchi, T., Kawasaki, H., Matsuda, S., Gotoh, Y., and Nishida, E., Evidence for multiple activators for stress-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinases. Existence of novel activators, *J. Biol. Chem.*, **270**, 12969-12972 (1995).
13. Cano, E., Hazzalin, C. A., and Mahadevan, L. C., Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7352-7362 (1994).
14. Guan, Z., Tetsuka, T., Baier, L. D., and Morrison, A. R., Interleukin-1 beta activates c-jun NH2-terminal kinase subgroup of mitogen-activated protein kinases in mesangial cells, *Am. J. Physiol.*, **270**, F634-641 (1996).
15. Westwick, J. K., Weitzel, C., Minden, A., Karin, M., and Brenner, D. A., Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase, *J. Biol. Chem.*, **269**, 26396-26401 (1994).
16. Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A., J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., and Davis, R. J., Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors, *EMBO J.*, **15**, 2760-2770 (1996).
17. Cuenda, A., Cohen, P., Bue-Scherrer, V., and Goedert, M., Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38), *EMBO J.*, **16**, 295-305 (1997).
18. Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., and Cohen, P., Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases, *EMBO J.*, **16**, 3563-3571 (1997).
19. Lee, J. D., Ulevitch, R. J., and Han, J., Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213**, 715-724 (1995).
20. Abe, J., Kusuhara, M., Ulevitch, R. J., Berk, B. C., and Lee, J. D., Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 16586-16590 (1996).
21. Kato, Y., Kravchenko, V. V., Tapping, R. I., Han, J., Ulevitch, R. J., and Lee, J. D., BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C, *EMBO J.*, **16**, 7054-7066 (1997).
22. Kato, Y., Tapping, R. I., Huang, S., Watson, M. H., Ulevitch, R. J., and Lee, J. D., Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor, *Nature*, **395**, 713-716 (1998).

23. Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, C. J., Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells, *Cell*, 1994, 841-852 (1994).
24. Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., and Weber, M., MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade, *Science*, 281, 1668-1671 (1998).
25. Winston, B. W., Chan, E. D., Johnson, G. L., and Riches, D. W., Activation of p38mapk, MKK3, and MKK4 by TNF-alpha in mouse bone marrow-derived macrophages, *J. Immunol*, 159, 4491-4497 (1997).
26. Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L. A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F. F., and Woodgett, J. R., The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat, *Curr. Biol.*, 6, 606-613 (1996).
27. Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I. H., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J., Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms, *Science*, 267, 682-685 (1995).
28. Tournier, C., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Barrett, T., and Davis, R. J., Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7337-7342 (1997).
29. Foltz, I. N., Gerl, R. E., Wieler, J. S., Luckach, M., Salmon, R. A., and Schrader, J. W., Human mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli, *J. Biol. Chem.*, 273, 9344-9351 (1998).
30. Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R. J., A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation, *Science*, 281 (1998).
31. Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., and Hagiwara, M., A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3, *J. Biol. Chem.*, 271, 13675-13679 (1996).
32. Cuenda, A., Alonso, G., Morrice, N., Jones, M., Meier, R., Cohen, P., and Nebreda, A. R., Purification and cDNA cloning of SAKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells, *EMBO J.*, 15, 4156-4164 (1996).
33. Moriguchi, T., Toyoshima, F., Gotoh, G., Iwamatsu, A., Irie, K., Mori, E., Kuroyanagi, N., Hagiwara, M., Matsumoto, K., and Nishida, E., Purification and

identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and  $H_2O_2$ , *J. Biol. Chem.*, **271**, 26981-26988 (1996).

34. Zhou, G., Bao, Z. Q., and Dixon, J. E., Components of a new human protein kinase signal transduction pathway, *J. Biol. Chem.*, **270**, 12665-12669 (1995).

35. Zheng, C. F., and Guan, K. L., Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues, *EMBO J.*, **13**, 1123-1131 (1994).

36. Catling, A. D., Schaeffer, H.-J., Reuter, C. W., Reddy, G. R., and Weber, M. J., A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5214-5225 (1995).

37. Büscher, D., Hipskind, R. A., Krautwald, S., Reimann, T., and Baccarini, M., Ras-dependent and -independent pathways target the mitogen-activated protein kinase network in macrophages, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 466-475 (1995).

38. Sakatsume, M., Stancato, L. F., David, M., Silvennoinen, O., Saharinen, P., Pierce, J., Larner, A. C., and Finbloom, D. S., Interferon gamma activation of Raf-1 is Jak1-dependent and p21ras-independent, *J. Biol. Chem.*, **273**, 3021-3026 (1998).

39. Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., and Marshall, C. J., Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.*, **272**, 4378-4383 (1997).

40. Cacace, A. M., Ueffing, M., Philipp, A., Han, E. K., Kolch, W., and Weinstein, I. B., PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase, *Oncogene*, **13**, 2517-2526 (1996).

41. Devemy, E., Billat, C., and Haye, B., Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases by erythropoietin and inositolphosphate-glycan in normal erythroid progenitor cells: involvement of protein kinase C, *Cell. Signal.*, **9**, 41-46 (1997).

42. Pathan, N. I., Ashendel, C. L., Geahlen, R. L., and Harrison, M. L., Activation of T cell Raf-1 at mitosis requires the protein-tyrosine kinase Lck, *J. Biol. Chem.*, **271**, 30315-30317 (1996).

43. Hafner, S., Adler, H. S., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M., and Kolch, W., Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6696-6703 (1994).

44. Yamazaki, T., Komuro, I., Zou, Y., Kudoh, S., Mizuno, T., Hiroi, Y., Shiojima, I., Takano, H., Kinugawa, K., Kohmoto, O., Takahashi, T., and Yazaki, Y., Protein kinase A and protein kinase C synergistically activate the Raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade in neonatal rat cardiomyocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 2491-2501 (1997).

45. Tzivion, G., Luo, Z., and Avruch, J., A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity, *Nature*, **394**, 88-92 (1998).
46. Dent, P., Jelinek, T., Morrison, D. K., Weber, M. J., and Sturgill, T. W., Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases, *Science*, **268**, 1902-1906 (1995).
47. Michaud, N. R., Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L. C., Spiegel, S., Rubin, G. M., and Morrison, D. K., KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12792-12796 (1997).
48. Leibovitch, S. A., Guillier, M., Lenormand, J. L., and Leibovitch, M. P., Accumulation of the c-mos protein is correlated with post-natal development of skeletal muscle, *Oncogene*, **6**, 1617-1622 (1991).
49. Pham, C. D., Arlinghaus, R. B., Zheng, C. F., Guan, K. L., and Singh, B., Characterization of MEK1 phosphorylation by the v-Mos protein, *Oncogene*, **10**, 1683-1688 (1995).
50. Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R., and Templeton, D. J., Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1, *Nature*, **372**, 798-800 (1994).
51. Blank, J. L., Gerwins, P., Elliott, E. M., Sather, S., and Johnson, G. L., Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinase (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 5361-5368 (1996).
52. Nagata, K., Puls, A., Futter, C., Aspenstrom, P., Schaefer, E., Nakata, T., Hirokawa, N., and Hall, A., The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3, *EMBO J.*, **17**, 149-158 (1998).
53. Hirai, S., Katoh, M., Terada, M., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Rana, A., Avruch, J., and Ohno, S., MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 15167-15173 (1997).
54. Tibbles, L. A., Ing, Y. L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J. R., and Lassam, N. J., MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6, *EMBO J.*, **15**, 7026-7035 (1996).
55. Holzman, L. B., Merritt, S. E., and Fan, G., Identification, molecular cloning, and characterisation of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases, *J. Biol. Chem.*, **269**, 30808-30817 (1994).

56. Fan, G., Merritt, S. E., Kortjenann, M., Shaw, P. E., and Holzmann, L. B., Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mAPK but not ERK2, *J. Biol. Chem.*, *271*, 24788-24793 (1996).
57. Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K., and Nishida, E., TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, *J. Biol. Chem.*, *272*, 8141-8144 (1997).
58. Wang, W., Zhou, G., Hu, M. C. T., Yao, Z., and Tan, T. H., Activation of hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction, *J. Biol. Chem.*, *272*, 22771-22775 (1997).
59. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y., Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways, *Science*, *275*, 90-94 (1997).
60. Qian, D., Lev, S., van Oers, N. S., Dikic, I., Schlessinger, J., and Weiss, A., Tyrosine phosphorylation of Pyk2 is selectively regulated by Fyn during TCR signaling, *J. Exp. Med.*, *185*, 1253-1259 (1997).
61. Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J. M., Plowman, G. D., Rudy, B., and Schlessinger, J., Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions, *Nature*, *376*, 737-745 (1995).
62. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., and Saltiel, A. R., PD 98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, *270*, 27489-27494 (1995).
63. Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Young, P. R., Cohen, P., and Lee, J. C., SB 203580 is a specific inhibitor of a map kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1, *FEBS Lett.*, *364*, 229-233 (1995).
64. Sutherland, C., Leighton, I. A., and Cohen, P., Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling, *Biochem. J.*, *296 (Pt.1)*, 15-19 (1993).
65. Xing, J., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E., Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase, *Science*, *273*, 959-963 (1996).
66. Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J. C., Haegeman, G., Cohen, P., and Fiers, W., The p38/RK mitogen-activated protein kinase

pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor, *EMBO J.*, **15**, 1914-1923 (1996).

67. Freshney, N. W., Rwalinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J., Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27, *Cell*, **78**, 1039-1049 (1994).

68. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamzares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R., A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins, *Cell*, **78**, 1027-1037 (1994).

69. Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariatì, S., Cohen, P., and Comb, M. J., FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2, *EMBO J.*, **17**, 4629-4642 (1996).

70. Sithanandam, G., Latif, F., Smola, U., Bernal, R. A., Duh, F.-M., Li, H., Kuzmin, I., Wixler, V., Geil, L., Shresta, S., Lloys, P. A., Bader, S., Sekido, Y., Tartof, K. D., Kashuba, V. I., Zabarovsky, E. R., Dean, M., Klein, G., Zbar, B., Lerman, M. I., Minna, J. D., Rapp, U. R., and Allikmets, R., 3pK, a new mitogen-activated protein kinase, located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 868-876 (1996).

71. Ludwig, S., Engel, K., Hoffmeyer, A., Sithanandam, G., Neufeld, B., Palm, D., Gaestel, M., and Rapp, U. R., 3pK, a Novel Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase-Activated Protein Kinase, Is targeted by Three MAP Kinase Pathways, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6687-6697 (1996).

72. Komatsu, S., Murai, N., Totsukawa, G., Abe, M., Akasaka, K., Shimada, H., and Hosoya, H., Identification of MAPKAPK homolog (MAPKAPK-4) as a myosin I regulatory light-chain kinase in sea urchin egg extracts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **343**, 55-62 (1997).

73. Ni, H., Wang, X. S., Diener, K., and Yao, Z., MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 492-496 (1998).

74. Fukunaga, R., and Hunter, T., MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates, *EMBO J.*, **16**, 1921-1933 (1997).

75. Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A., Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2, *EMBO J.*, **16**, 1909-1920 (1997).

76. Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, J. M., and Alessi, D. R., Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (Msk1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB, *EMBO J.*, *17*, 4426-4441 (1998).
77. New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato, Y., Parry, G. C. N., and Han, J., PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase, *EMBO J.*, *17*, 3372-3384 (1998).
78. Livingstone, C., Patel, P., and Jones, N., ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain, *EMBO J.*, *14*, 1785-1797 (1995).
79. Kim, J., Nueda, A., Meng, Y. H., Dynan, W. S., and Mivechi, N. F., Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members, *J. Cell. Biochem.*, *67*, 43-54 (1997).
80. Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R. J., Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway, *Science*, *267*, 389-393 (1995).
81. Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R. J., MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway, *Mol. Cell. Biol.*, *16*, 1247-1255 (1996).
82. Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V. V., and Ulevitch, R. J., Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation, *Nature*, *386*, 296-299 (1997).
83. Wang, X. Z., and Ron, D., Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase, *Science*, *272*, 1347-1349 (1996).
84. Janknecht, R., and Hunter, T., Activation of the SAP-1a transcription factor by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.*, *272*, 4219-4224 (1997).
85. Janknecht, R., and Hunter, T., Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a, *EMBO J.*, *16*, 1620-1627 (1997).
86. Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., and Nordheim, A., Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases, *EMBO J.*, *12*, 5097-5104 (1993).
87. Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M. H., and Shaw, P. E., ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation, *EMBO J.*, *14*, 951-962 (1995).
88. Price, M. A., Cruzalegui, F. H., and Treisman, R., The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light, *EMBO J.*, *15*, 6552-6563 (1996).

89. Hoffmeyer, A., Avots, A., Flory, E., Weber, C. K., Serfling, E., and Rapp, U. R., The GABP-responsive element of the interleukin-2 enhancer is regulated by JNK/SAPK-activating pathways in T lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **273**, 10112-10119 (1998).
90. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Riehemann, K., and Wesselborg, S., Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades, *Immunobiology*, **198**, 35-49 (1997).
91. Chuang, C. F., and Ng, S. Y., Functional divergence of the MAP kinase pathway, ERK1 and ERK2 activates specific transcription factors, *FEBS Lett.*, **346**, 229-234 (1994).
92. Zervos, A. S., Faccio, L., Gatto, J. P., Kyriakis, J. M., and Brent, R., Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10531-10534 (1995).
93. Means, A. R., Calcium, calmodulin and cell cycle regulation, *FEBS Lett.*, **347**, 1-4 (1994).
94. Nicotera, P., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S., Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis, *Cell Calcium*, **16**, 279-288 (1994).
95. Kretsinger, R. H., Structure and evolution of calcium modulated proteins, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **8**, 119-174 (1980).
96. Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J., Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores., *Physiol. Rev.*, **74**, 595-636 (1994).
97. Mikoshiba, K., Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor., *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 86-89 (1993).
98. Khan, A. A., Steiner, J. P., Klein, M. G., Schneider, M. F., and Snyder, S. H., IP3 receptor: localization to plasma membrane of T cells and cocapping with the T cell receptor, *Science*, **257**, 815-818 (1992).
99. Lückhoff, A., and Clapham, D. E., Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca<sup>2+</sup> channel, *nature*, **355**, 356-358 (1992).
100. Meszaros, L. G., Bak, J., and Chu, A., Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor, *Nature*, **364**, 76-79 (1993).
101. White, B. A., Evidence for a role of calmodulin in the regulation of prolactin gene expression, *J. Biol. Chem.*, **260** (1985).
102. Hai, T., Liu, F., Coukos, W. J., and Green, M. R., Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA binding heterodimers, *Genes & Dev.*, **3**, 2083-2090 (1989).

103. Ginty, D. D., Bonni, A., and Greenberg, M. E., Nerve Growth Factor Activates a Ras-Dependent Protein Kinase That Stimulates c-fos Transcription via Phosphorylation of CREB, *Cell*, *77*, 713-725 (1994).
104. Gonzalez, G. A., and Montminy, M. R., Cyclic AMP Stimulates Somatostatin Gene Transcription by Phosphorylation of CREB at Serine 133, *Cell*, *59*, 675-680 (1989).
105. Morgan, J. L., Role of ion flux in the control of c-fos expression, *Nature*, *322*, 552-555 (1996).
106. Arizono, K., Peterson, K. L., and Brady, F. O., Inhibitors of Ca<sup>2+</sup> channels, calmodulin and protein kinases prevent A223187 and other inductions of metallothionein mRNA in EC3 rat hepatoma cells, *Life Sci.*, *53*, 1031-1037 (1993).
107. Tsuboi, A., Muramatsu, M., Tsutsumi, A., Arai, K., and Arai, N., Calcineurin activates transcription from the GM-CSF promoter in synergy with either protein kinase C or NF-kappaB/AP-1 in T cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *199*, 1064-1072 (1994).
108. Schwaninger, M., Lux, G., Blume, R., Oetjen, E., Hidaka, H., and Knepel, w., Membrane depolarization and calcium influx induce glucagon gene transcription in pancreatic islet cells through the cyclic AMP-responsive element, *J. Biol. Chem.*, *268*, 5168-5177 (1993).
109. Wu, T., Levine, S. J., Lawrence, M. G., Logun, C., Angus, C. W., and Shelhamer, J. H., Interferon- $\gamma$  induces the synthesis and activation of cytosolic phospholipase A2, *J. Clin. Invest.*, *93*, 571-577 (1994).
110. Bouillon, A. M., Retinoic acid-stimulated intercellular adhesion molecule 1 expression of SK-N-SH cells: calcium/calmodulin-dependen pathway, *Cancer Res.*, *54*, 4144-4149 (1994).
111. Sun, P., Enslin, H., Myung, P. S., and Maurer, R. A., Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity, *Genes Dev.*, *8*, 2527-2539 (1994).
112. Dash, P. K., Karl, K. A., Colicos, M. A., Prywes, R., and Kandel, E. R., cAMP response element binding-protein is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin as well as cAMP-dependend protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *88*, 5061-5065 (1991).
113. Sheng, M., Thompson, M. A., and Greenberg, M. E., CREB: a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependend kinases, *Science*, *252*, 1427-1430 (1991).

114. Corneliussen, B., Thornell, A., Hallberg, B., and Grundstrom, T., Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers, *J. Virol.*, **65**, 6084-6093 (1991).
115. Corneliussen, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Hallberg, B., Thornell, A., and Grundstrom, T., Calcium/Calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains, *Nature*, **368**, 760-764 (1994).
116. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M., t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10431-10434 (1991).
117. Shimizu, K., Miyoshi, H., Kozu, T., Nagata, J., Enomoto, K., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M., Consistent disruption of the AML1 gene occurs within a single intron in the t(8;21) chromosomal translocation, *Cancer Res.*, **52**, 6945-6948 (1992).
118. Molm, M., Xie, X. Q., and Grundstrom, T., Direct calcineurin activation of AML1 transcription factors, *10th Int. Symp. Ca-binding Proteins and Ca Function in Health and Disease, Schweden*, Abstr. 109 (1997).
119. Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., and Ben-Neriah, Y., JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes, *Cell*, **77**, 727-736 (1994).
120. Graves, J. D., Draves, K. E., Craxton, A., Saklatvala, J., Krebs, E. G., and Clark, E. A., Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apoptosis of human B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13814-13818 (1996).
121. Thomas, G., Haavik, J., and Cohen, P., Participation of a stress-activated protein kinase cascade in the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells, *Eur. J. Biochem.*, **247**, 1180-1189 (1997).
122. DeSilva, D. R., Jones, E. A., Feeser, W. S., Manos, E. J., and Scherle, P. A., The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in activated and anergic Th1 cells, *Cell. Immunol.*, **180**, 116-123 (1997).
123. Borel, J. F., C., F., Grubler, H. U., and Stahelin, H., Biological effects of cyclosporin A: new antilymphocyte agent, *Agents Action*, **6**, 468-475 (1976).
124. Bougneres, P.-F., Landais, P., Boisson, C., Carel, J.-C., Frament, N., Boitard, C., Chaussian, J.-L., and Bach, J.-F., Limited duration of remission of insulin dependency in children with recent overt type I diabetes with low dose cyclosporin, *Diabetes*, **39**, 1264-1271 (1990).
125. Mason, J., Pharmacology of cyclosporine (Sandimmune). VII. Pathophysiology and toxicology of cyclosporine in humans and animals, *Pharmacol. Rev.*, **41**, 423-434 (1989).

126. Aicher, L., Wahl, D., Arce, A., Grenet, O., and Steiner, S., New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis, *Electrophoresis*, *19*, 1998-2003 (1998).
127. Hauben, M., Cyclosporine neurotoxicity, *Pharmacotherapy*, *16*, 576-583 (1996).
128. Garcia-Escrig, M., Martinez, J., Fernandez-Ponsati, J., Diaz, J., and Soto, O., Several central nervous system toxicity after chronic treatment with cyclosporine, *Clin. Neuropharmacol.*, *17*, 298-302 (1994).
129. Arellano, F., Risk of cancer with cyclosporine in psoriasis, *Int. J. Dermatol.*, *36 Suppl1*, 15-17 (1997).
130. Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Giral, M., Blanco, G., Dreno, B., and J.P., S., Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens, *Lancet*, *351*, 623-628 (1998).
131. Herold, K. C., Lancki, D. W., Moldwin, R. L., and Fitch, F. W., Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T-cells., *J. Immunol.*, *136*, 1315-1321 (1986).
132. Kronke, M., Leonard, W. J., Depper, J. M., Arya, S. K., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Waldmann, T. A., and Greene, W. C., Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *81*, 5214-5218 (1984).
133. Granelli-Piperno, A., Andrus, L., and Steinman, R. M., Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human T cells. Kinetics, mitogen requirements and effects of cyclosporin A, *J. Exp. Med.*, *163*, 922-937 (1986).
134. Lancki, D., Kaper, B. P., and Fitch, F. W., The requirements for triggering of lysis by cytolytic T lymphocyte clones. II. Cyclosporin A inhibits TCR-mediated exocytosis but only selectively inhibits TCR-mediated lytic activity by cloned CTL, *J. Immunol.*, *42*, 3796-3802 (1989).
135. Wicker, L. S., Boltz, R. C., Matt, V., Nichols, E. A., Peterson, L. B., and Sigal, N. H., Suppression of B cell activation by cyclosporin A , FK506 and rapamycin, *Eur. J. Immunol.*, *20*, 2277-2283 (1990).
136. Palay, D. A., Cluff, C. W., Wentworth, P. A., and Ziegler, H. K., Cyclosporine inhibits macrophage-mediated antigen presentation., *J. Immunol.*, *136*, 4348-4353 (1986).
137. Yonish-Rouach, E., Fischer, D. G., and Rubinstein, M., Cyclosporin A regulates the expression of HLA-DR on human monocytes by two different mechanisms., *Cell. Immunol.*, *134*, 402-413 (1991).

138. Snyder, D. S., Wright, C. L., and Ting, C., Inhibition of human monocyte antigene presentation, but not HLA-DR expression, by cyclosporine, *Transplantation*, **44**, 407-411 (1987).
139. Schreiber, S. L., Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands, *Science*, **251**, 283-287 (1991).
140. Rühlmann, A., and Nordheim, A., Effects of the Immunosuppressive Drugs CsA and FK506 on Intracellular Signalling and Gene Regulation, *Immunobiol.*, **198**, 192-206 (1997).
141. Bram, R. J., Hung, D. T., Martin, P. K., Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R., Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location., *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4760-4769 (1993).
142. Lodish, H. F., and Kong, N., Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmatic reticulum, *J. Biol. Chem.*, **266**, 14835-14838 (1991).
143. Yang, W. M., Inouye, C. J., and Seto, E., Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity, *J. Biol. Chem.*, **270**, 15187-15189 (1995).
144. Metcalfe, S. M., and Richards, F. M., Cyclosporine, FK506 and rapamycin. Some effects on early activation events in serum-free, mitogen-stimulated mouse spleen cells, *Transplantation*, **49**, 798-802 (1990).
145. Nakayama, K., and Nakauchi, H., Cyclosporin A inhibits the decrease of CD4/CD8 expression induced by protein kinase C activation, *Int. Immunol.*, **5**, 419-426 (1993).
146. Friedman, J., and Weissman, I., Two cytoplasmatic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA, *Cell*, **66**, 799-806 (1991).
147. Liu, J., Farmer, J. D. J., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L., Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell*, **66**, 807-815 (1991).
148. Flanagan, W. M., Corthesy, B., Bram, R. J., and Crabtree, G. R., Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK506 and cyclosporin A, *Nature*, **352**, 803-807 (1991).
149. Jain, J., McCaffrey, P. G., Kerppola, T. K., Lambert, J. N., Verdine, G. L., Curran, T., and Rao, V., The T-cell transcription factor NFAT<sub>p</sub> is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun, *Nature*, **365**, 352-355 (1993).

150. Marumo, T., Nakaki, T., Hishikawa, K., Kato, S. H. R., and Saruta, T., Cyclosporin A inhibits nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells, *Hypertension*, *25*, 764-768 (1995).
151. Frantz, B., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Keef, S. J., and O'Neill, E. A., Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B, *EMBO J.*, *13*, 361-370 (1994).
152. Mata, M., Merritt, S. E., Fan, G., Yu, G. G., and Holzman, L. B., Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin, *J. Bio. Chem.*, *271*, 16888-16896 (1996).
153. Brugge, J. S., and Erikson, R. L., Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus, *Nature*, *269*, 346-348 (1977).
154. Purchio, A. F., Erikson, E., Brugge, J. S., and Erikson, R. L., Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene, *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, *75*, 1567-1571 (1978).
155. Brown, M. T., and Cooper, J. A., Regulation, substrates and functions of src, *Biochim. Biophys. Acta*, *1287*, 121-149 (1996).
156. Rickles, R. J., Botfield, M. C., Zhou, X. M., Henry, P. A., Brugge, J. S., and Zoller, M. J., Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 10909-10913 (1995).
157. Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V., and Schlessinger, J., SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules, *Cell*, *74*, 83-91 (1993).
158. Xu, W., Harrison, S. C., and Eck, M. J., Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src, *Nature*, *385*, 595-602 (1997).
159. Gout, I., Dhand, R., Hiles, I. D., Fry, M. J., Panayotou, G., Das, P., Truong, O., Totty, N. F., Hsuan, J., and Booker, G. W., The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains, *Cell*, *75*, 25-36 (1993).
160. Ren, R., Ye, Z. S., and Baltimore, D., Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites, *Genes Dev.*, *8*, 783-795 (1994).
161. Saksela, K., Cheng, G., and Baltimore, D., Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4, *EMBO J.*, *14*, 484-491 (1995).
162. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, *72*, 248-254 (1976).

163. Stokoe, D., Campbell, D. G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S. J., Marshall, C., and Cohen, P., MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase, *EMBO J.*, *11*, 3985-3994 (1992).
164. Halliert, M., Tavitian, A., and Moreau-Gachelin, F., The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb, *J. Biol. Chem.*, *271*, 11177-11181 (1996).
165. Stratagene, NucTrap™ Push Columns, Instruction Manual, .
166. Morin, J. G., and Hastings, J. W., Energy transfer in a bioluminescent system, *J. Cell Physiol.*, *77*, 313-318 (1971).
167. Ward, W. W., Cody, C. W., Hart, R. C., and Cormier, M. J., Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in Renilla and Aequorea green-fluorescent proteins, *Photochem. Photobiol.*, *31*, 611-615 (1981).
168. CLONTECH, Living Colors User Manual, .
169. Englander, E. W., Widen, S. G., and Wilson, S. H., Mammalian beta-polymerase promoter: phosphorylation of ATF/CRE-binding protein and regulation of DNA binding., *Nucleic Acids. Res.*, *19*, 3369-3375 (1991).
170. Kedar, P. S., Widen, S. G., Englander, E. W., Fornace, A. J. J., and Wilson, S. H., The ATF/CREB transcription factor binding-site in the polymerase beta promoter mediates the positive effect of N-methyl-N`-nitro-nitrosoguanidine on transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *88*, 3729-3733 (1991).
171. Widen, S. G., and Wilson, S. H., Human  $\beta$ -polymerase gene, *J. Biol. Chem.*, *263*, 16992-16998 (1988).
172. Narayan, S., He, F., and Wilson, S. H., Activation of the human DNA polymerase beta promoter by a DNA-alkylating agent through induced phosphorylation of cAMP response element-binding protein-1, *J. Biol. Chem.*, *271*, 18508-18513 (1996).
173. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J., Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine, *J. Biol. Chem.*, *270*, 7420-7426 (1995).
174. Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Mollner, N. P., and Ullrich, A., ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*, 4355-4359 (1996).
175. Whitmarsh, A. J., Yang, S. H., Su, M. S., Sharrocks, A. D., and Davis, R. J., Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors, *Mol. Cell. Biol.*, *17*, 2360-2371 (1997).

176. Kreideweiss, S., Delany-Heiken, P., Nordheim, A., and Rühlmann, A., H.sapiens mRNA for PRPL-2 protein, *Genebank X86019*.
177. Kreideweiß, S., Delany-Heiken, P., Nordheim, A., and Rühlmann, A., SH3-domain interacting protein, *Genebank #2760483*.
178. Martinez, R., Mathey-Prevot, B., Bernards, A., and Baltimore, D., Neuronal pp60c-src contains a six-amino acid insertion relative to its non-neuronal counterpart, *Science*, *237*, 411-415 (1987).
179. Derry, J. M. J., Ochs, H. D., and Francke, U., Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome, *Cell*, *78*, 635-644 (1994).
180. Banin, S., Truong, O., Katz, R., Waterfield, M., Brickel, P. M., and Gout, I., Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases, *Curr. Biol.*, *6*, 981-988 (1996).
181. Finan, P. M., Soames, C. J., Wilson, L., Nelson, D. L., Stewart, D. M., Truong, O., Hsuan, J. J., and Kellie, S., Identification of Regions of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Responsible for Association with Selected Src Homology 3 Domains, *J. Biol. Chem.*, *271*, 26291-26295 (1996).
182. Ramesh, N., Anton, I. M., Hartwig, J. H., and Geha, R. S., WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *94*, 14671-14676 (1997).
183. Singhal, R. K., and Wilson, S. H., Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive, *J. Biol. Chem.*, *268*, 15906-15911 (1993).
184. Englander, E. W., and Wilson, S. H., The cloned promoter of the human DNA beta-polymerase gene contains a cAMP response element functional in HeLa cells, *DNA Cell. Biol.*, *11*, 61-69 (1992).
185. Narayan, S., Beard, W. A., and Wilson, S. H., DNA damage-induced transcriptional activation of a human DNA polymerase beta chimeric promoter: recruitment of preinitiation complex in vitro by ATF/CREB, *Biochemistry*, *34*, 73-80 (1995).
186. Li, X. Y., and Green, M. R., Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain, *Genes Dev.*, *10*, 517-527 (1996).
187. van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P., ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents, *EMBO J.*, *14*, 1798-1811 (1995).
188. Newton, A. C., Regulation of protein kinase C, *Curr. Opin. Cell Biol.*, *9*, 161-167 (1997).
189. Matsuda, S., Moriguchi, T., Koyasu, S., and Nishida, E., T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-

SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A, *J. Biol. Chem.*, *273*, 12378-12382 (1998).

190. Kersh, E. N., Shaw, A. S., and Allen, P. M., Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation, *Science*, *281*, 572-575 (1998).

191. Facchetti, F., Blanzuoli, L., Vermi, W., Notarangelo, L. D., Giliani, S., Fiorini, M., Fasth, A., Stewart, D. M., and Nelson, D. L., Defective actin polymerization in EBV-transformed B-cell lines from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome, *J. Pathol.*, *185*, 99-107 (1998).

## 8. ANHÄNGE

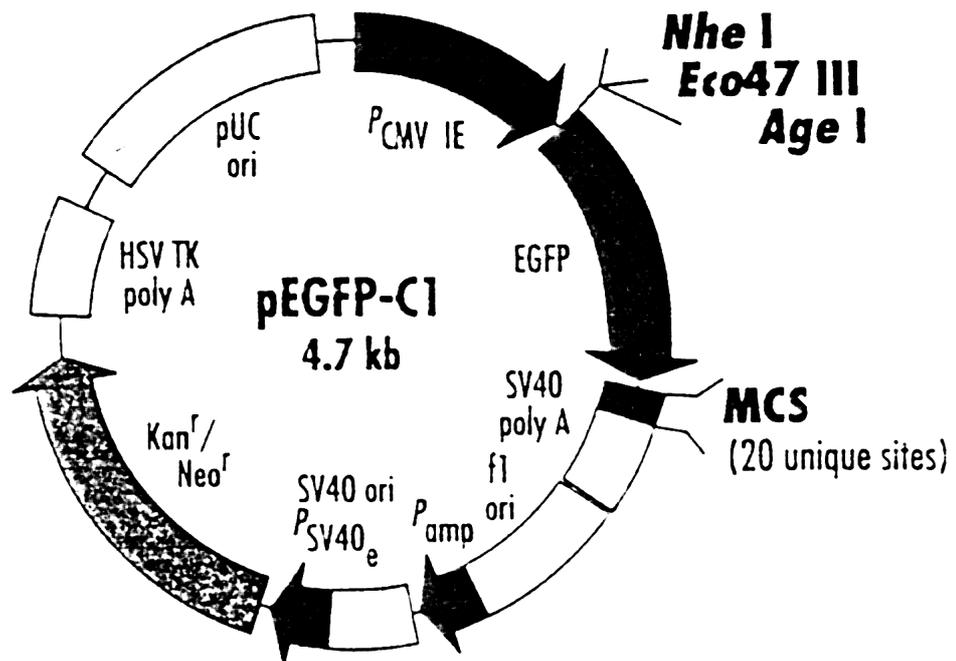
### Anhang 1: Genotyp des Bakterienstamms BL21(DE3)pLysS

F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>+)*, *dcm*, *gal*, (DE3), pLysS, Cm<sup>r</sup>

(Quelle: Fa. Promega)

**Anhang 2:** Konstruktion des eukaryontischen Expressionsvektors für das Fusionsprotein GFP-PRPL2

Ausgangsvektor (Quelle: Fa. Clontech):



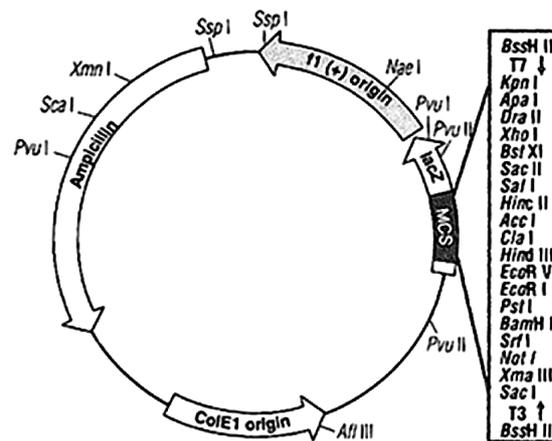
Einbau: Der Einbau der für PRPL2 codierenden Sequenz erfolgte in die XhoI-Schnittstelle der *multi cloning site* (MCS) nach folgendem Schema:



Konstruktion: Dr. Andreas Rühlmann, Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover

**Anhang 3:** Konstruktion des für die gekoppelte *in vitro* Transkription / Translation von PRPL2 verwendeten Plasmids

Ausgangsplasmid (Quelle: Katalog der Firma Stratagene '97/'98, S.98):

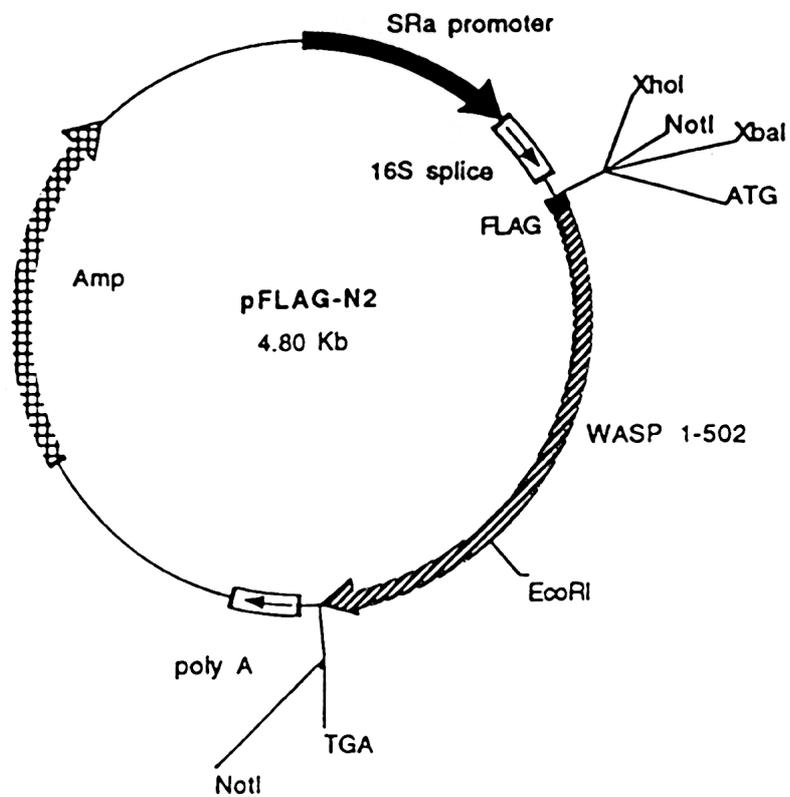


Einbau: Der Einbau der für PRPL2 codierenden Sequenz erfolgte in die Srf I Schnittstelle der *multi cloning site* (MCS):



Konstruktion: Dr. A. Rühlmann, Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover

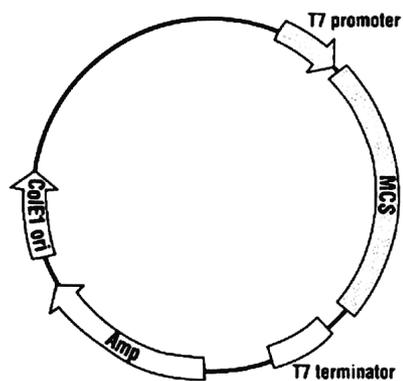
**Anhang 4:** Struktur des eukaryontischen Expressionsvektors für das Fusionsprotein FLAG-WASP



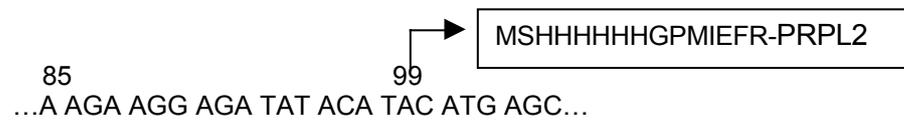
Konstruktion: Der Vektor wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Abie Abo, ONYX Pharmaceuticals, Richmond, USA

**Anhang 5:** Konstruktion des für die gekoppelte *in vitro* Transkription / Translation von PRPL2 (91-493) verwendeten Plasmids

Ausgangsplasmid:



Einbau: Der Einbau der codierenden Sequenz erfolgte in die *multi cloning site* (MCS):



Konstruktion: Dr. A. Rühlmann, Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover

## LEBENS LAUF

**Geburtsdatum:** 05. November 1970

**Geburtsort:** Halle/Saale

**Familienstand:** ledig

### **Ausbildung:**

10/1995-01/1999: Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Nordheim am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover und am Institut für Zellbiologie, Abteilung Molekularbiologie, der Universität Tübingen

08/1995: Diplom in Biochemie mit dem Gesamtprädikat „sehr gut“

02/1995-07/1995: Diplomarbeit „Untersuchungen zu induzierbarer DNA-Bindungsaktivität in humanen Leukozyten“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Nordheim am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

04/1992-01/1995: Studium der Biochemie an der Universität Hannover

09/1989-03/1992: Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/1987-08/1989: Besuch der Erweiterten Oberschule „Karl Marx“ in Halle-Neustadt, abgeschlossen mit dem Abitur im Juli 1989 (Gesamtprädikat „mit Auszeichnung“)

09/1977-08/1987: Besuch der 12. Polytechnischen Oberschule in Halle-Neustadt

### **Beschäftigungsverhältnisse:**

seit 03/1998: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zellbiologie, Abteilung Molekularbiologie, der Universität Tübingen

10/1995-02/1998: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

11/1993-01/1994: wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biophysik der Universität Hannover