

**Inhibition der  
Stress-aktivierten/Jun-N-terminalen Proteinkinase  
in humanen KB-Zellen  
durch stabile Überexpression  
einer Kinase-inaktiven Mutante  
oder  
einer antisense RNA**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -  
genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemikerin Andrea Erika Krause  
geboren am 13. Dezember 1966 in Mannheim

1998

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Dr. med. M. Kracht am Institut für Klinische Molekularpharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leitung: Prof. Dr. med. K. Resch).

Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Müller

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. M. U. Martin

Tag der Promotion: 26.11.1998

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Krause, A., Holtmann, H., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., Kracht, M.

„Stress-activated protein Kinase/Jun N-terminal Kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB“,

*J. Biol. Chem.* 273 (37): 23681-23689, 1998.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen vorgestellt:

1<sup>st</sup> Joint Meeting der Signaltransduktions-Arbeitskreise der DGfI und der DGZ, sowie der Studiengruppe Gentechnik/Biotechnologie der GBM, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, 20.-22.11.1997: „The stress-activated protein kinase (SAPK) cascade is a major signalling pathway for interleukin-1-induced gene expression“, Kracht, M., Krause, A., Eickemeier, S., Winzen, R., Holtmann, H., Finch, A., Holland, P., Resch, K., Szamel, M., Saklatvala, J.

1. Joint Workshop der DGfI und der GCI „Cytokines in Inflammation“, 08.-11.02.1998, Assergi (L'Aquila), Italien: „The stress-activated protein kinase (SAPK) cascade is a major signalling pathway for interleukin-1-induced gene expression“, Kracht, M., Krause, A., Eickemeier, S., Winzen, R., Holtmann, H., Finch, A., Holland, P., Resch, K., Szamel, M., Saklatvala, J.

Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 39. Frühjahrstagung, 17.-19.03.1998, Mainz: „The stress-activated protein kinase (SAPK) cascade is a major signalling pathway for interleukin-1-induced gene expression“, Kracht, M., Krause, A., Eickemeier, S., Winzen, R., Holtmann, H., Finch, A., Holland, P., Resch, K., Szamel, M., Saklatvala, J.

Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Wintertagung, 07.-10. 10.1998, Hannover: „Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin-1 induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB“, Krause, A., Holtmann, H., Holland, P., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., Kracht, M.

2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the ICS and ISICR, 25.-30.10.1998, Jerusalem, Israel: „Stress-activated protein Kinase/Jun N-terminal Kinase is required for interleukin-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB“, Krause, A., Holtmann, H., Holland, P., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., Kracht, M.

Die Publikation wurde im Rahmen der Tagung mit dem „*International Cytokine Society Young Investigator Award*“ ausgezeichnet.

## Zusammenfassung

Das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) spielt als proinflammatorischer Faktor eine zentrale Rolle im Immunsystem. Die durch IL-1 induzierten Signaltransduktionsmechanismen beinhalten die Aktivierung von vier verschiedenen Protein-Kinase-Kaskaden, der NIK-I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B-Kaskade und den MAP Kinase Kaskaden: SAPK/JNK, p38 MAP Kinase und ERK.

Die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK), auch als Jun-N-terminale Kinase (JNK) bezeichnet, wird in jeder Zelle durch IL-1 massiv aktiviert. Um ihre funktionelle Rolle bei der IL-1 Signaltransduktion zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit methodische Strategien entwickelt, um SAPK/JNK's in intakten Zellen zu inhibieren. Dazu wurde zum einen eine Kinase-inaktive Mutante, p54SAPK $\beta$ (K-R), und zum anderen p54SAPK $\beta$  antisense RNA in der humanen Keratinozytenzelllinie KB stabil konstitutiv überexprimiert. Die durch zelluläre Klonierung etablierten Linien wurden charakterisiert.

Mit beiden Ansätzen kann in den verschiedenen generierten Zelllinien eine Hemmung der IL-1 induzierten SAPK/JNK-Aktivierung nachgewiesen werden. Die TNF, Anisomycin und Sorbitol induzierte SAPK/JNK-Aktivierung ist supprimiert.

IL-1 reguliert in KB-Zellen u.a. die Genexpression des Chemokins IL-8. In den generierten Zellklonen, in denen die SAPK/JNK-Aktivierung gehemmt ist, ist die IL-1 induzierte IL-8 Sekretion vermindert, während die Aktivierung eines transient transfizierten minimalen IL-8-Promotor- oder NF $\kappa$ B-Promotor-Reportergenkonstruktes nur partiell gehemmt wird. Diese Daten zeigen, daß SAPK/JNK's eine zentrale Rolle bei der Regulation eines wichtigen IL-1 induzierten Genes spielen, möglicherweise über neue transkriptionelle, posttranskriptionelle Mechanismen und Prozesse, die die Initiation der Translation betreffen.

Die Überexpression der Kinase-inaktiven Mutante oder der antisense RNA, die zur Inhibition der SAP Kinasen/JNK's führt, ist ein geeignetes Modell für die Aufklärung der IL-1 abhängigen Signaltransduktionswege.

## **Abstract**

The cytokine interleukin-1 (IL-1) is a major proinflammatory factor of the immune system. Signal transduction mechanisms triggered by IL-1 include activation of four different protein kinase systems, the NIK-I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B-cascade and the MAP kinase cascades: SAPK/JNK, p38 MAP kinase, and ERK.

The stress-activated protein kinase (SAPK), also termed Jun-N-terminal kinase (JNK), is massively activated by IL-1 in every cell system. In this work the functional role of SAPK/JNK in IL-1 signal transduction was investigated by developing methodical strategies which inhibited SAPK/JNK activity in intact cells. For this purpose the catalytically inactive mutant p54SAPK $\beta$  (p54SAPK $\beta$ (K-R)) and alternatively, antisense RNA to p54SAPK $\beta$  were used and stably overexpressed under the control of a constitutively active promoter in the human epidermal carcinoma cell line KB.

Stably transfected cell lines were obtained by limiting dilution and characterized.

With both approaches several generated cell clones show an inhibition of IL-1-induced SAPK/JNK activation. Furthermore, TNF-, anisomycin-, and sorbitol-induced SAPK/JNK activation is suppressed.

In KB-cells IL-1 regulates gene-expression of the chemokine IL-8. In the generated cell clones, where the SAPK/JNK activation is inhibited, also show a strongly reduced IL-8 protein secretion after IL-1 treatment. However, the activation of a transient transfected minimal IL-8 promoter- or NF $\kappa$ B-promoter-reporter gene construct is only partially suppressed.

These data indicate that SAPK/JNK play a major role in the regulation of an important IL-1-induced gene, possibly via new transcriptional, posttranscriptional mechanisms and processes of the translation initiation.

In summary, overexpression of a catalytically inactive mutant or an antisense RNA resulted in inhibition of the SAPK/JNK, appears to be a suitable model to investigate the IL-1-induced signal transduction pathways.

SAPK/JNK, IL-1, IL-8

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Interleukin-1 .....	1
1.2 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAP Kinasen) .....	3
1.3 SAP Kinasen (JNK's).....	6
1.4 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch SAPK/JNK's.....	7
1.5 Regulatorischer Abbau der Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der SAP Kinasen .....	10
1.6 Fragestellung .....	11
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Lösungen und Puffer .....	12
2.2 Geräte .....	18
2.3 Materialien .....	19
2.3.1 Antikörper und rekombinante Proteine .....	19
2.3.2 Chemikalien .....	19
2.3.3 Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits.....	19
2.3.4 Plasmide .....	20
2.3.5 Eukaryontische Zelllinien.....	21
2.4 Zellkultur .....	21
2.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	21
2.4.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung .....	22
2.4.3 Methylenblau-Färbung .....	22
2.4.4 Stimulation von Zellen .....	23
2.5 Mikrobiologische Methoden .....	23
2.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien.....	23
2.5.2 Transformation von Bakterien .....	24
2.5.3 Glycerinkulturen .....	24
2.6 Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren.....	24
2.6.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	24
2.6.2 Präparation von genomischer DNA .....	25
2.6.3 Präparation von Gesamt-RNA .....	25
2.6.4 Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorptionsmessung .....	26

---

2.6.5	Reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	26
2.6.5.1	Reverse Transkription.....	27
2.6.5.2	Polymerasekettenreaktion.....	27
2.6.5.3	Verwendete <i>Primer</i> .....	29
2.6.6	Transfer von DNA auf eine Nylonmembran ( <i>Southern-Blot</i> ).....	29
2.6.7	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	30
2.6.8	Gelelektrophoretische Auftrennung.....	30
2.6.8.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	30
2.6.8.2	Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	31
2.6.9	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen.....	31
2.6.10	Analyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	31
2.7	Präparative und analytische Methoden für Proteine.....	32
2.7.1	Gewinnung von Proteinen aus einem Gesamtzelllysat.....	32
2.7.2	Gewinnung von Kernextrakten.....	33
2.7.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	34
2.7.4	Aktivitätsbestimmung von Proteinkinasen.....	34
2.7.4.1	<i>In vitro</i> Kinase-Assay.....	35
2.7.4.2	<i>GSH-Beads-Assay</i> .....	35
2.7.4.3	<i>In-Gel-Kinase-Assay</i> .....	36
2.7.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE).....	37
2.7.6	Färbung von Proteingelen mit Coomassie.....	37
2.7.7	Quantitative Auswertung von radioaktiven Gelen.....	37
2.7.8	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran ( <i>Western-Blot</i> ).....	38
2.7.8.1	<i>Semi-Dry-Verfahren</i> .....	38
2.7.8.2	<i>Tank-Blot-Verfahren</i> .....	39
2.7.8.3	Färbung der PVDF-Membran mit Coomassie.....	39
2.7.9	Immundetektion transferierter Proteine mittels Chemilumineszenz (ECL).....	39
2.8	Interleukin-8-Bestimmung.....	40
2.9	Transfektionsmethoden.....	40
2.9.1	Elektroporation.....	40
2.9.2	Kalziumphosphat-Transfektion.....	41
2.9.3	Lipid-vermittelte Transfektion.....	42
2.10	Selektion von Transfektanten.....	42
2.10.1	Herstellung stabiler Transfektanten-Zellpools.....	42
2.10.2	Einzelzellklonierung von Transfektanten.....	43
2.10.2.1	Einzelzellklone mit Hilfe von Klonierungs-Ringen.....	43
2.10.2.2	Einzelzellklone mit Hilfe des <i>Limiting Dilution</i> Verfahrens.....	43

---

2.11	Expression von Reporter-Gen-Konstrukten .....	44
2.11.1	Verwendete Vektoren.....	44
2.11.1.1	pBHEluc.....	44
2.11.1.2	pcDNA3.1/His B/lacZ.....	44
2.11.1.3	pNFκB-Luc .....	44
2.11.1.4	puhc133IL8promotorluc.....	45
2.11.2	Transfektionsbedingungen .....	45
2.11.2.1	Zur Optimierung von Transfektionen.....	45
2.11.2.2	Etabliertes Standardprotokoll für die Transfektion von KB-Zellen .....	45
2.11.3	Präparation zytosolischer Extrakte.....	45
2.11.4	Messung der Luziferase-Aktivität.....	46
2.11.5	Histochemischer Nachweis der β-Galaktosidase (X-Gal-Färbung).....	46
2.12	Expression der p54SAPKβ-Konstrukte .....	46
2.12.1	pcDNA3-p54SAPKβ-Konstrukte.....	47
2.12.1.1	pcDNA3 .....	47
2.12.1.2	pcDNA3-p54SAPKβ Wildtyp und Mutante.....	47
2.12.2	peVRF0HA- bzw. HA/His-p54SAPKβ-Konstrukte.....	48
2.12.2.1	peVRF0HA bzw. HA/His.....	48
2.12.2.2	peVRF0HA- bzw. HA/His-p54SAPKβ-Konstrukte.....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Darstellung verschiedener Transfektionsmethoden und ihre Optimierung .....	54
3.1.1	Elektroporation.....	55
3.1.2	Kalziumphosphat-Transfektion .....	57
3.1.3	Lipid-vermittelte Transfektion mit Dosp <sup>er</sup> ® .....	57
3.1.4	Vergleich aller verwendeten Transfektionsmethoden .....	58
3.1.5	Nachweis der Expression auf Einzelzellebene nach transienter Transfektion.....	58
3.2	Experimentelles Vorgehen zur Erzeugung stabiler Transfektanten .....	60
3.2.1	Optimierung der Selektionsbedingungen (Titration von G418).....	61
3.3	Detektion von endogenen JNK-Proteinen in verschiedenen Zellkompartimenten mit Hilfe des Antikörpers Ab681 .....	62
3.3.1	Nachweis von endogenen JNK's in Gesamtzellysaten.....	63
3.3.2	Nachweis von endogenen JNK's in Kernextrakten.....	64
3.3.3	Unterscheidung zwischen verschiedenen Isoformen und ihrer Aktivierung .....	65
3.4	Transiente und stabile Überexpression von p54SAPKβ mit Hilfe zweier eukaryontischer Expressionsplasmide .....	66
3.4.1	Expression mit Hilfe des pcDNA3-Vektors .....	66
3.4.1.1	Restriktionsanalyse der Konstrukte.....	66

3.4.1.2	Transiente Transfektion von pcDNA3-p54SAPK $\beta$ in KB-Zellen.....	66
3.4.1.3	Stabile Transfektion von pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) in KB-Zellen.....	68
3.4.1.3.1	Nachweis der überexprimierten p54SAPK $\beta$ Kinase auf Proteinebene in stabilen Zellklonen.....	68
3.4.1.3.2	Nachweis der JNK-Aktivierung in stabilen KB-pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) Zellklonen.....	69
3.4.1.3.3	Nachweis der integrierten p54SAPK $\beta$ (K-R)-DNA in stabilen Zellklonen.....	70
3.4.1.3.4	Nachweis des Neomycin-Resistenzgens in stabilen Zellklonen.....	71
3.4.1.3.5	Zusammenfassung der stabilen Transfektionsergebnisse.....	72
3.4.2	Expression der p54SAPK $\beta$ -Konstrukte mit Hilfe der peVRF0-Vektoren.....	72
3.4.2.1	Restriktionsanalyse der Konstrukte.....	72
3.4.2.2	Transiente Transfektion der peVRF0-Konstrukte und Nachweis der Überexpression im <i>Western-Blot</i> .....	73
3.4.2.3	Fehlender funktioneller Effekt auf endogene SAPK/JNK's nach transienter Transfektion von peVRF0-Konstrukten.....	74
3.4.2.4	Stabile Transfektion der peVRF0HA-Konstrukte.....	75
3.4.2.4.1	Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-Leervektor-Zellpools.....	76
3.4.2.4.2	Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Mutanten(s, as)-Zellpools....	76
3.4.2.4.3	Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) sense Einzelzellklone.....	77
3.4.2.4.4	Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense Einzelzellklone....	79
3.4.2.4.4.1	Nachweis im <i>Western-Blot</i> .....	79
3.4.2.4.4.2	Nachweis der JNK-Aktivierung.....	80
3.4.2.4.5	Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ Wildtyp-Zellpools.....	81
3.4.2.4.6	Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ Wildtyp-Zellklone.....	82
3.4.2.4.7	Übersicht über die generierten Transfektanten.....	83
3.4.2.4.8	Zusammenfassung der stabilen Transfektionsergebnisse.....	83
3.5	Charakterisierung ausgewählter Zellklone.....	84
3.5.1	Charakterisierung der KB-p54SAPK $\beta$ (K-R) sense Zellklone 2 und 11.....	84
3.5.1.1	Nachweis der stabilen konstitutiven Expression von HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein.	84
3.5.1.2	Nachweis der Kinase-Inaktivität des überexprimierten Proteins im <i>In-Gel-Kinase-Assay</i> .....	85
3.5.1.3	Analyse der IL-1 abhängigen SAPK/JNK Aktivierung.....	86
3.5.1.4	Analyse der SAPK/JNK Aktivierung durch verschiedene Stimuli.....	87
3.5.2	Charakterisierung der p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense Zellklone 64, 165 und 240.....	88
3.5.2.1	Nachweis der stabilen konstitutiven Expression von p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense-RNA auf Proteinebene.....	88
3.5.2.2	Analyse der IL-1 abhängigen SAPK/JNK Aktivierung.....	90
3.5.3	Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2.....	91
3.5.4	Messung der IL-1 induzierten IL-8 Sekretion.....	93

---

3.5.5	Charakterisierung der Regulation des IL-8 Genes auf transkriptioneller Ebene durch Transfektion von Reporter-genkonstrukten .....	94
3.5.5.1	Transfektion des NFκB-Promotor-Konstruktes .....	94
3.5.5.1.1	Methode 1: Mittelwertbildung.....	95
3.5.5.1.2	Methode 2: Paarbildung .....	96
3.5.5.2	Transfektion des IL-8-Promotor-Konstruktes .....	96
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>98</b>
4.1	Darstellung verschiedener Transfektionsmethoden und ihre Optimierung .....	98
4.2	Überexpression der p54SAPKβ-Konstrukte mit Hilfe des pcDNA3-Vektors .....	100
4.3	Überexpression der p54SAPKβ-Konstrukte mit Hilfe des peVRF0-Vektors .....	101
4.4	Charakterisierung ausgewählter Zellklone .....	103
4.5	Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 .....	108
4.6	Messung der IL-1 induzierten IL-8 Sekretion .....	109
4.7	Charakterisierung der Regulation des IL-8 Genes auf transkriptioneller Ebene durch Transfektion von Reporter-genkonstrukten .....	112
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>118</b>
6.1	pcDNA3-p54SAPKβ Wildtyp und Mutanten-Sequenz.....	118
6.2	peVRF0HA-p54SAPKβ Wildtyp und Mutanten-Sequenz .....	121
6.3	Proteinsequenz-Alignments .....	122
6.3.1	Humane JNK-Isoformen .....	122
6.3.2	SAPK-Isoformen der Ratte .....	123
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AcP	IL-1 Rezeptor akzessorisches Protein
Amp.	Ampicillin
AP-1	Aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
as	antisense
bidest	bidestilliert
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
cDNA	komplementäre DNA
CDTA	trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N,N-tetraessigsäure
CMV	Cytomegalo-Virus
CREB	<i>cAMP-Responsive Element Binding Protein</i>
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DSZM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung ( <i>HEPES buffered saline</i> )
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
His	Histidin
<i>His-tag</i>	His-Hexapeptid
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSP	Hitzeschock Protein ( <i>heat shock protein</i> )
Ig	Immunglobulin
IL-1, 6, 8	Interleukin-1, 6, 8
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1RacP	Interleukin-1 Rezeptor akzessorisches Protein

IL-1RI, II	Interleukin-1 Rezeptor Typ I, Typ II
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
JNK	Jun-N-terminale Kinase
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK(inase)	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mut	Mutante
NFκB	Kernfaktor κB
NP-40	Nonident <sup>®</sup> P-40
OD <sup>xxx</sup>	optische Dichte bei xxx nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDGF	Plättchen Wachstumsfaktor ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s	sense
SAPK(inase)	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRE	Serum responsives Element ( <i>serum responsive element</i> )
SRF	Serum responsiver Faktor ( <i>serum responsive factor</i> )
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCF	ternärer Komplexfaktor ( <i>ternary complex factor</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TPA	12-o-Tetradecanoyl-13-Acetat
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

Es werden die allgemeinen SI-Einheiten, die chemischen Elementsymbole, der 3- und 1-Buchstaben-Code der Aminosäuren verwendet.

Für die Abkürzung von Zeitschriften-Titeln ist in der Regel die Abkürzung gemäß *National Library of Medicine Cataloging in Publication – List of serials indexed for online users* (U.S. Department of Health and Human Services) benutzt.

## 1 Einleitung

Das proinflammatorisch wirksame Zytokin Interleukin-1 (IL-1) spielt, neben dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), eine zentrale Rolle im Immunsystem. Es verursacht vielfältige lokale und systemische Wirkungen im Rahmen einer akuten oder chronischen Entzündung (z.B. beim septischen Schock, rheumatoider Arthritis) (Di Giovine und Duff, 1990; Okusawa *et al.*, 1988). Die Manipulation von IL-1 Wirkungen ist deshalb ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue anti-inflammatorische Therapiestrategien.

### 1.1 Interleukin-1

Zu der Interleukin-1 Familie gehören zwei intrinsisch wirksame Moleküle, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie ein spezifischer Inhibitor, der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra).

Der IL-1Ra ist bisher der einzige natürlich vorkommende, spezifische Rezeptorantagonist (Reviews: Bankers-Fulbright *et al.*, 1996; Martin und Falk, 1997).

Die Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  unterscheiden sich zwar hinsichtlich ihrer Struktur, nicht aber in ihrer biologischen Wirksamkeit. Hauptsächlich werden sie von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert, aber auch von einer Vielzahl anderer Zellen, z.B. Neutrophilen, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Langerhans-Zellen, Osteoklasten, Astrozyten, Mikrogliazellen, Mesangiumzellen der Niere, Epithelzellen der Kornea, glatten Muskelzellen, T-Zellen und Epstein-Barr-Virus transformierte B-Lymphozyten (Review: Dinarello 1994 und 1996; Ibelgauf).

Zielzellen von Interleukin-1 binden das Zytokin an zwei spezifischen, membranständigen Rezeptortypen. Den 80 kDa großen IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) findet man vor allem auf T-Zellen und Fibroblasten, der 60 kDa große Typ II Rezeptor (IL-1RII) wird vorwiegend auf B-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen exprimiert (Dower *et al.*, 1985; Review: Dayer *et al.*, 1994). Von beiden Rezeptortypen ist ausschließlich der Typ I signaltransduzierend, Typ II fungiert lediglich als regulatorische „Falle“ (*decoy receptor*) (Colotta *et al.*, 1993; Slack *et al.*, 1993; Review: O'Neill, 1998).

Die nach der Bindung von IL-1 an seinen Rezeptor ausgelösten intrazellulären Ereignisse sind in einem komplexen Signaltransduktionssystem involviert (Reviews: Brooks und Mizel, 1994; Martin und Falk, 1997); insgesamt werden mindestens vier verschiedene Protein-Kinase-Kaskaden aktiviert. Ferner werden saure und neutrale Sphingomyelinasen aktiviert (Mathias *et al.*, 1993).

Die Bindung von IL-1 an einen Rezeptorkomplex initiiert die Signaltransduktion. Die bisher identifizierten beteiligten Komponenten sind der IL-1RI und das IL-1 Rezeptor akzessorischen Protein (IL-1RacP) als Korezeptor (Korherr *et al.*, 1997), sowie das Adapterprotein MyD88 (Burns *et al.*, 1998; Wesche *et al.*, 1997) und eine Serin/Threonin spezifische Kinase, die IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) (Cao *et al.*, 1996 a). Durch die Ligandenbindung wird IRAK aktiviert und kann dann mit TRAF6 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6) assoziieren (Cao *et al.*, 1996 b). Die Verknüpfung von IRAK und TRAF6 zu den IL-1 abhängigen Proteinkinasekaskaden ist bisher noch unvollständig aufgeklärt.

In dem einen Signalweg wird eine NFκB-induzierte Kinase (NIK) aktiviert (Malinin *et al.*, 1997), die wiederum den IκB-Kinasekomplex aktiviert. Phosphoryliertes IκB dissoziiert vom NFκB-Komplex ab und wird sofort proteolytisch abgebaut (Chen *et al.*, 1995). Der übrig gebliebene NFκB-Komplex transloziert in den Kern und bindet an seine Zielsequenz (DiDonato *et al.*, 1997; Regnier *et al.*, 1997).

Die anderen drei Signaltransduktionswege führen über die Familie der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK), wobei noch nicht vollständig geklärt ist, über welche molekularen Wechselwirkungen die MAP Kinasewege an den IL-1 Rezeptorkomplex gekoppelt sind.

IL-1 verursacht zelluläre Effekte durch die Induktion einer Vielzahl von Genen; z.B. induziert das Zytokin seine eigene Genexpression (Dinarello *et al.*, 1987) und die von anderen Zytokinen (IL-2, IL-6, u. a.) (Zhang *et al.*, 1988; Sironi *et al.*, 1989; Hagiwara *et al.*, 1990). Des Weiteren werden Chemokine (IL-8, MCP-1, u. a.), Proteasen (Kollagenase, Stromelysin, u. a.), Zelladhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, u. a.), Akute-Phase-Proteine, sowie Enzyme der Eikosanoidsynthese induziert. Im Gegensatz dazu kann IL-1 auch die Genexpression von z.B. Albumin, Cytochrom P450, unterdrücken (Review: Dinarello, 1996). Zur Regulation der Genexpression werden eine Reihe von Transkriptionsfaktoren über die IL-1 abhängigen Signaltransduktionskaskaden aktiviert,

unter anderem NF $\kappa$ B (siehe oben), Aktivator-Protein 1 (AP-1), Mitglieder der ets-Familie (z.B. Elk-1, SAP-1), ATF-2.

## 1.2 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAP Kinasen)

Drei wichtige Gruppen aus der Familie der MAP Kinasen, deren Interaktionspartner zum Großteil schon identifiziert und kloniert sind, sind: die p42/p44 extrazellulär regulierten Proteinkinasen (ERK's), die p38 Kinase (*reactivating kinase*, RK) sowie die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) oder Jun-N-terminale Kinasen (JNK's). Die Unterschiede begründen sich in der Aminosäuresequenz des regulatorischen Motivs in der Kinasesubdomäne VIII (siehe Abb. 1.1), sowie z.T. in der Substratspezifität der Kinasen (Cano und Mahadevan, 1995). Alle drei Gruppen werden durch duale Phosphorylierung der regulatorischen Threonins und Tyrosins mit Hilfe spezifischer MAPK-Kinasen (MAPKK's, MKK's oder MEK's) aktiviert, die wiederum vorher durch eine MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK/MKKK/MEKKK) phosphoryliert (Serin/Threonin) wurden. MAP Kinasen phosphorylieren spezifisch u.a. Transkriptionsfaktoren und andere Proteinkinasen, um Einfluß auf die Genexpression zu nehmen. In Abb. 1.1 sind diese Verknüpfungen zusammengefaßt dargestellt.

Charakteristisch für die Proteinsubstrate der MAP Kinasen ist die Konsensus-Sequenz Pro-X-(Ser/Thr)\*-Pro (X stellt eine neutrale oder basische Aminosäure dar, \*die Phosphorylierungsstelle), die in vielen Proteinen enthalten ist, z.B. MBP (*myelin basic protein*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), Myc- und Jun-Protein (Alvarez *et al.*, 1991; Review: Davis, 1993).

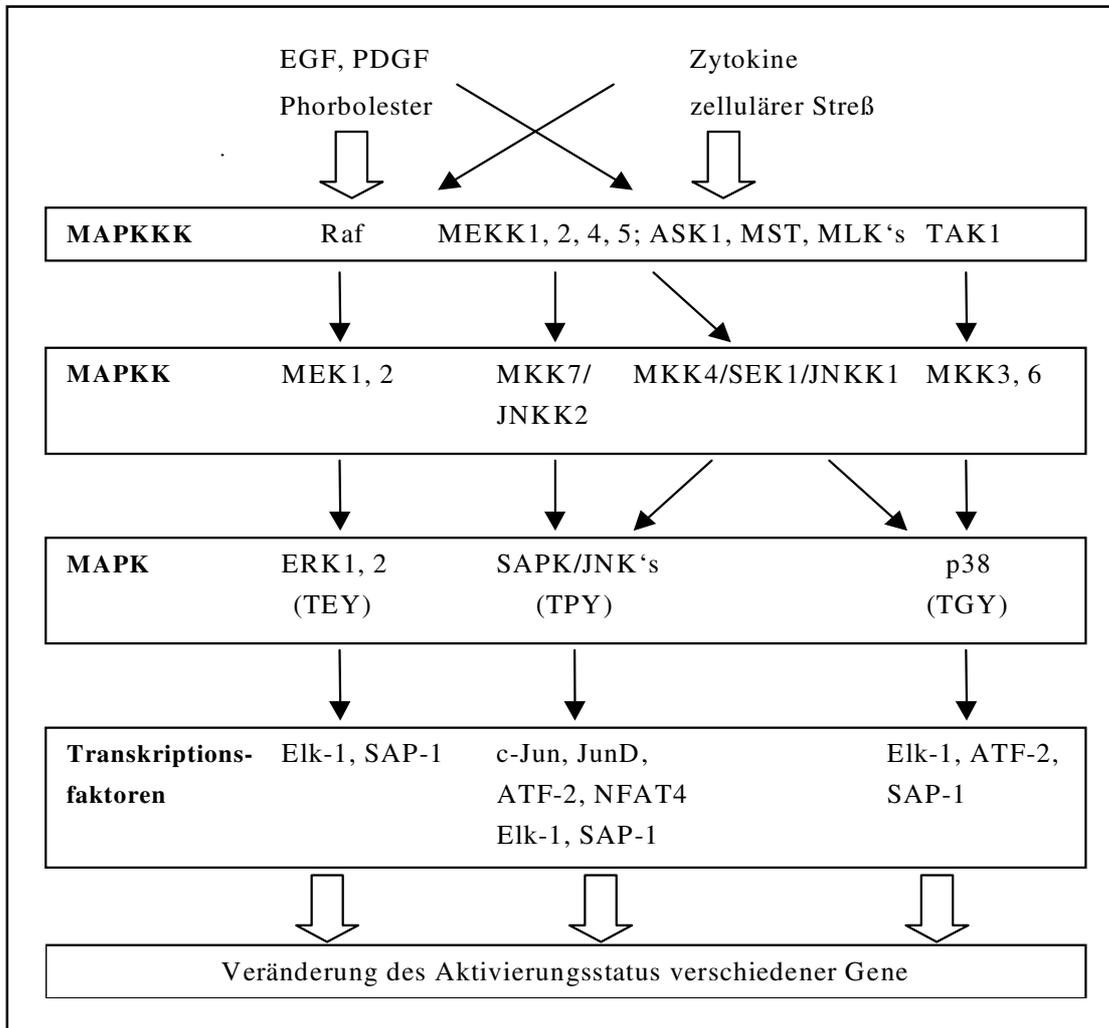
Vor allem durch mitogene Stimuli wie EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) und Phorbol ester werden die ERK's (ERK1, ERK2) über die MAPKK MEK1 und 2 aktiviert, die dann durch Phosphorylierung die Transkriptionsfaktoren Elk-1 und SAP-1 aktivieren (Janknecht und Hunter, 1997; Whitmarsh *et al.*, 1995 und 1997; Zinck *et al.*, 1995).

Streß, wie UV-Licht, Hyperosmolarität, Lipopolysaccharide (LPS) sowie die Zytokine IL-1 und TNF aktivieren SAPK/JNK's und die p38 MAP Kinase. Aktiviert werden die

Kinasen über eine gemeinsame MAPK-Kinase (MKK4/SEK1/JNKK1), sowie über spezifische MAPK-Kinasen (MKK3 und 6; MKK7/JNKK2). Als Transkriptionsfaktoren kann von beiden Kinasen ATF-2, Elk-1 und SAP-1 phosphoryliert werden, aber nur die SAP-Kinasen/JNK's phosphorylieren auch c-Jun, JunD und NFAT4. Spezifische Substrate der p38 MAP Kinase sind MAPKAP Kinase 2 (Rouse *et al.*, 1994; Freshney *et al.*, 1994) und 3 (auch 3pKgenannt) (McLaughlin *et al.*, 1996; Sithanandam *et al.*, 1996), die das kleine zytoplasmatische Hitzeschockprotein Hsp27 phosphorylieren. Diese Substratphosphorylierung ist eine der ersten identifizierten IL-1 abhängigen Signalwege (Stokoe *et al.*, 1992).

IL-1 aktiviert in einigen Zelltypen die ERK's (Saklatvala *et al.*, 1993; Guesdon *et al.*, 1993). Dagegen induziert das Zytokin in kultivierten Zellen immer stärker SAPK/JNK's und oft auch p38 MAP Kinase (Freshney *et al.*, 1994; Kracht *et al.*, 1994; Raingeaud *et al.*, 1995). In ausdifferenzierten Geweben, wie der Leber, werden offenbar nur SAPK/JNK's durch IL-1 aktiviert (Finch *et al.*, 1997).

Eine Übersicht über die Familie der MAP-Kinasen liefert die folgende Abbildung (Reviews: Force *et al.*, 1996; Whitmarsh und Davis, 1996; Ip und Davis, 1998).



**Abb. 1.1: Die MAP Kinase Familie (veränderte Grafik nach Ip und Davis (1998))**

Dargestellt sind die wichtigsten Verknüpfungen der MAP Kinase Signaltransduktionskaskade.

- |               |  |
|---------------|--|
| MAPKKK/MEKK   | MAP Kinase Kinase Kinase / MEK Kinase            |
| MAPKK/MEK/MKK | MAP Kinase Kinase                                |
| MAPK          | Mitogen-aktivierte Proteinkinase                 |
| ERK           | Extrazellulär regulierte Kinase                  |
| JNK/SAPK      | Jun-N-terminale Kinase / Stressaktivierte Kinase |
| SEK 1         | SAPK/ERK Kinase 1                                |

Die aktivierten MAP Kinasen werden durch spezifische Serin/Threonin und Tyrosin Protein-Phosphatasen inaktiviert, den MAP Kinase Phosphatasen (MKP's). Bisher sind einige Formen kloniert, ihre Spezifitäten *in vivo* sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt

(Neel und Tonks, 1997; Chu *et al.*, 1996; Groom *et al.*, 1996; Muda *et al.*, 1996 a, b; Franklin und Kraft, 1997; Hirsch und Stork, 1997; Muda *et al.*, 1997; Shapiro und Ahn, 1998; Camps *et al.*, 1998; Muda *et al.*, 1998). Kürzlich wurde auch ein zytoplasmatisches Protein (JNK *interacting protein* 1, JIP-1) entdeckt, das durch Interaktion spezifisch SAPK/JNK's inhibiert (Dickens *et al.*, 1997). Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß JIP-1 einen Komplex mit MLK-3, MKK7 und JNK bilden kann. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß JIP-1 die Funktion eines *scaffold proteins* einnimmt und eine spezifische regulatorische Funktion im SAPK/JNK Signaltransduktionsweg einnimmt (Whitmarsh *et al.*, 1998).

### 1.3 SAP Kinasen (JNK's)

Die Terminologie dieser Kinasen kommt von ihrer Eigenschaft, durch zellulären Streß aktiviert zu werden und die N-terminale Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors c-Jun zu phosphorylieren: *stress activated protein kinases* (SAPK) oder auch *jun N-terminal kinases* (JNK's).

Von den SAPK/JNK's, die eine zentrale Rolle in der IL-1 Signaltransduktion spielen, sind bisher die Gene z.B. im Menschen, in der Ratte, in Drosophila identifiziert und deren Kinase-Isoformen kloniert (Derijard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994; Sluss *et al.*, 1996). Speziesübergreifend sind die Kinasen hochkonserviert; auf Aminosäureebene sind Ratten- und menschliche Proteine identisch. Die einzelnen Isoformen innerhalb einer Spezies sind zu 80-90 % auf Proteinebene homolog (Gupta *et al.*, 1996).

Die humanen JNK Protein Kinasen werden von drei Genen kodiert: jnk1, jnk2 und jnk3. Bisher wird postuliert, daß die jnk1 und jnk2 Gene in jedem Gewebe exprimiert werden und jnk3 nur im Gehirn, Herz und Hoden (Gupta *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). Die insgesamt zehn Isoformen (vier JNK1, vier JNK2 und zwei JNK3) resultieren aus zwei Varianten. Bei den jnk1 und jnk2 Genen entstehen durch alternatives Spleißen unterschiedliche Sequenzen in der Proteinkinase-Subdomäne IX und X ( $\alpha$  und  $\beta$  Isoformen). Des Weiteren wird die 3'-Region der mRNA unterschiedlich prozessiert, so daß 46 kDa und 55 kDa Proteine entstehen, die sich hinsichtlich ihrer Carboxytermini unterscheiden ( $\alpha$ 1/2 bzw.  $\beta$ 1/2 Isoformen). Von dem jnk3-Gen werden zusätzlich Proteine

mit einem extendierten N-Terminus exprimiert, so daß 45-48 kDa und 54-57 kDa Formen entstehen können (Gupta *et al.*, 1996). Welche Rolle die verschiedenen Isoformen bei der Regulation der Genexpression und anderen Zellfunktionen spielen ist noch unklar (Force *et al.*, 1996). Es konnte bisher lediglich gezeigt werden, daß die SAPK/JNK-Proteine Unterschiede in der Bindung der Transkriptionsfaktoren ATF-2, Elk-1 und Jun *in vitro* (Gupta *et al.*, 1996) und auch *in vivo* (Kallunki *et al.*, 1994) aufweisen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die humanen SAPK/JNK-Isoformen und deren Homologen in der Ratte. Die Proteinsequenzen der Isoformen und ein *Alignment* befinden sich im Anhang.

<b>Mensch:</b>	<b>Ratte:</b>
JNK1 $\alpha$ 1 (46 kDa) $\alpha$ 2 (55 kDa) $\beta$ 1 (46 kDa) $\beta$ 2 (55 kDa)	p54SAPK $\gamma$ $\gamma$ (46 kDa)
JNK2 $\alpha$ 1 (46 kDa) $\alpha$ 2 (55 kDa) $\beta$ 1 (46 kDa) $\beta$ 2 (55 kDa)	p54SAPK $\alpha$ $\alpha$ I (55 kDa) $\alpha$ II (55 kDa)
JNK3 $\alpha$ 1 (46 kDa) $\alpha$ 2 (55 kDa)	p54SAPK $\beta$ $\beta$ (55 kDa)

**Tab. 1.1: SAPK/JNK-Isoformen des Menschen und der Ratte**

(nach Gupta *et al.*, 1996; Kyriakis *et al.*, 1994)

#### 1.4 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch SAPK/JNK's

SAP Kinasen werden durch duale Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin in ihrem Thr-Pro-Tyr-Motiv (Subdomäne VIII) aktiviert, dabei fungiert MKK7 als spezifischer Aktivator (Holland *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997; Moriguchi *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 1997). Nach Translokation in den Kern, können aktivierte SAP Kinasen die

Transkriptionsfaktoren der ets-Familie, des AP-1 Komplexes und ATF-2 binden und phosphorylieren.

Der Transkriptionsfaktor Elk-1, der wie SAP-1 zu den ternären Komplexfaktoren (*ternary complex factor*, TCF) gehört, bindet nach Aktivierung mit dem Serum responsiven Faktor (SRF) an das Serum responsive Element (SRE) und aktiviert die Transkription des c-Fos Genes. SAP Kinasen phosphorylieren Elk-1 *in vitro* bevorzugt am Threonin 363 und/oder Threonin 368 (Whitmarsh *et al.*, 1995; Price *et al.*, 1996), andere Aminosäuren können auch phosphoryliert werden (Gille *et al.*, 1995). Während der Phosphorylierung des Faktors durch die SAPK/JNK's, konnte keine meßbare Bindung wie bei Jun oder ATF-2 festgestellt werden (Gupta *et al.*, 1996).

Der AP-1 (*activating protein-1*) Komplex kann ein Homodimer aus dem Transkriptionsfaktor Jun (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD) oder ein Heterodimer mit Fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) bilden, beide Faktoren sind Mitglieder der bZip (*basic region leucine zipper*)-Proteine. Diese DNA-bindenden Dimere binden an die Sequenz TGACTCA, dem TPA-responsiven Element (TRE). Der Transkriptionsfaktor ATF-2, aus der Familie der ATF/CREB (*cAMP responsive element binding*) Proteine ist auch ein bZIP-Protein und bindet als Homodimer bzw. mit Jun als Heterodimer an das cAMP responsive Element (CRE) mit der Basensequenz TGACGTCA (Angel und Karin, 1991; Hai und Curran, 1991). Beide DNA-Elemente sind Palindrome, unterscheiden sich nur im Zentrum und werden als AP-1 Bindungselement bezeichnet (Review: Karin *et al.*, 1997). Dieses Element befindet sich in Promotoren einer Vielzahl von Genen, die innerhalb von einer Stunde induziert werden (*immediate early genes*) (Angel und Karin, 1991).

Die SAP-Kinasen/JNK's binden ATF-2 und phosphorylieren spezifisch innerhalb der aminoterminalen Aktivierungsdomäne an zwei Threonin-Resten (Thr 69 und 71) und einem Serinrest (Ser 90), wobei die Threonine für die Transaktivierung essentiell sind (Gupta *et al.*, 1995; Livingstone *et al.*, 1995; Van Dam *et al.*, 1995).

Aus dem AP-1 Komplex werden Jun-Proteine nur von SAP-Kinasen phosphoryliert; für c-Fos wird eine andere Proteinkinase postuliert (FRK), die über Wachstumsfaktoren aktiviert wird, aber noch nicht kloniert ist (Deng und Karin, 1994). c-Jun wird spezifisch an den Serinen 63 und 73 der Aktivierungsdomäne von SAPK/JNK's phosphoryliert (Pulverer *et al.*, 1991; Hibi *et al.*, 1993). Auch JunD wird von SAP Kinasen/JNK's phosphoryliert, aber mit geringerer Effizienz. Dagegen wird JunB nur gebunden, aber nicht

phosphoryliert (Kallunki *et al.*, 1996). Auch innerhalb der SAPK/JNK-Isoformen konnten unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Transkriptionsfaktoren festgestellt werden, die auf eine differenzierte Regulation dieser Faktoren durch verschiedene SAPK/JNK-Isoformen schließen läßt (Kallunki *et al.*, 1994; Reviews: Karin *et al.*, 1997; Whitmarsh und Davis, 1996).

SAPK/JNK's können Transkriptionsfaktoren sowohl durch Phosphorylierung als auch durch Bindung regulieren. Der Phosphorylierungs-Prozeß geht über mehrere Schritte. Zuerst werden die Substrate von den SAPK/JNK's durch Bindung an eine spezifische Domäne (*docking site*) erkannt. Danach wird die Phosphoakzeptor-Region des Substrates erkannt und in der katalytischen Domäne (*catalytic pocket*) der Kinase gebunden. Nach der spezifischen Phosphorylierung dissoziiert das Enzym vom Substrat ab und kann eine weitere Bindung eingehen. Die für den Prozeß benötigten interagierenden Domänen wurden für die SAPK/JNK's als auch für die Jun-Proteine identifiziert (Kallunki *et al.*, 1996). Auch inaktive, also nicht phosphorylierte, SAPK/JNK's binden mit hoher Affinität an c-Jun (Hibi *et al.*, 1993), aber nur aktivierte SAPK/JNK's phosphorylieren Serin 63 und 73 von c-Jun und dissoziieren dann von den Proteinen ab. Nicht an SAPK/JNK's bindende Proteine, wie JunD, können über ihre Heterodimerisierung an c-Jun im AP-1-Komplex in die räumliche Nähe der katalytischen Domäne der SAPK/JNK's gebracht und dann effizient phosphoryliert werden (Kallunki *et al.*, 1996).

Inzwischen konnten auch für andere MAP Kinasen spezifische Bindungsdomänen identifiziert werden (Whitmarsh *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998 a, b).

Eine regulatorische Funktion üben die SAPK/JNK's bei dem Transkriptionsfaktor NFAT4 (*nuclear factor of activated T cells*) aus. Der Faktor liegt als phosphoryliertes Protein im Zytosol vor. Nach Aktivierung einer Kalzium-abhängige Phosphatase, der Calcineurin-Phosphatase, wird NFAT4 dephosphoryliert, kann in den Zellkern translozieren und an entsprechende DNA-Sequenzen (z.B. IL-2 Promotor) binden. SAPK/JNK's können NFAT4 an zwei Resten phosphorylieren. Dies führt zum Export des Faktors aus dem Zellkern, eine Akkumulation wird somit verhindert (Chow *et al.*, 1997).

## 1.5 Regulatorischer Abbau der Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der SAP Kinasen

Transkriptionsfaktoren, wie auch viele andere regulatorische Proteine, werden in Abhängigkeit von ihrem Phosphorylierungsstatus mit Hilfe von Ubiquitin in einem zytosolischen, ATP-abhängigen Proteolysesystem abgebaut. Bei den von SAP Kinasen/JNK's aktivierten Faktoren konnte ein direkter Einfluß der Kinase über die Proteinphosphorylierung auf die Proteinstabilität nachgewiesen werden.

Die Phosphorylierung der Serine 63 und 73 von c-Jun durch die SAPK/JNK's inhibiert den Abbau und die Degradation des Proteins (Fuchs *et al.*, 1996; Musti *et al.*, 1997), welches zur Folge hat, daß die Halbwertszeit und die Akkumulation des Proteins und damit seine Verfügbarkeit für transaktivierende Funktionen bei der Genexpression erhöht wird. *In vivo* konnte dies durch *knockout*-Mäuse bestätigt werden (Yang *et al.*, 1997). Dagegen wird an nicht-aktivierte SAPK/JNK gebundenes c-Jun gezielt abgebaut (Fuchs *et al.*, 1996).

JunB, das von SAPK/JNK's gebunden, aber nicht phosphoryliert wird, wird durch die spezifische Bindung gezielt abgebaut. JunD, das keine SAPK/JNK-Bindungsdomäne besitzt, aber phosphoryliert werden kann, wird nur gering ubiquitinyliert (Fuchs *et al.*, 1997).

Bei ATF-2 konnte ein Schutz vor dem Abbau durch Phosphorylierung mit SAPK/JNK's nachgewiesen werden. Auch wird der, an die inaktive Kinase gebundene Faktor, gezielt proteolytisch abgebaut; weitere Faktoren, die eine größere Rolle bei dem Abbau spielen, werden aber vermutet (Fuchs *et al.*, 1997).

Bei Elk-1, einem Faktor der vor allem von ERK's aktiviert wird und nachweislich nicht von SAPK/JNK's gebunden wird (Gupta *et al.*, 1996), konnte kein Einfluß dieser Kinasen auf die Proteolyse gefunden werden (Fuchs *et al.*, 1997).

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Untersuchungen, daß verschiedene Transkriptionsfaktoren, vor allem aber Mitglieder der Jun-Familie, durch Phosphorylierung und Bindung an SAPK/JNK's reguliert werden. Dieses führt in der Regel zur Erhöhung der transkriptionellen Aktivität, aber auch zu einer Stabilisierung der Proteine. Dabei zeichnen sich innerhalb der SAPK/JNK Familie Unterschiede in der Affinität und Substratspezifität hinsichtlich Transkriptionsfaktoren, wie Jun, ATF-2, Elk, ab.

## **1.6 Fragestellung**

Das Zytokin Interleukin-1 nimmt eine zentrale Stellung in der Signaltransduktion im Rahmen akuter und chronischer Entzündungen ein. Obwohl in den letzten Jahren viele neue beteiligte Komponenten molekular identifiziert wurden, ist das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren und deren Regulation im komplexen Netzwerk der IL-1 Signaltransduktion nur unzusammenhängend aufgeklärt.

In praktisch allen Zelltypen wird durch IL-1 die Familie der MAP Kinasen, insbesondere die SAP Kinasen/JNK's, aktiviert, so daß sie eine essentielle Rolle in der Regulation der Gene spielen, die für die lokalen und systemischen Effekte bei einer Entzündung verantwortlich sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der SAPK/JNK's in der IL-1 Signaltransduktion zu charakterisieren. Mit molekularbiologischen Methoden sollten gezielt die SAPK/JNK's ausgeschaltet werden, da geeignete chemische Inhibitoren nicht verfügbar waren. Als ein durch IL-1 reguliertes Gen sollte exemplarisch das Chemokin IL-8 analysiert werden, das als Sekundärzytokin die Einwanderung von Leukozyten in den Entzündungsherd reguliert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Lösungen und Puffer

#### ATP-Puffer

150	mM	Tris, pH 7,4
30	mM	Magnesiumchlorid

#### Auftragspuffer für DNA-Agarosegele

50	% (w/v)	Glycerol
0,5	% (w/v)	Bromphenolblau in H <sub>2</sub> O

#### Auftragspuffer für RNA-Agarosegele

50	% (w/v)	Glycerol
1	mM	EDTA, pH 8,0
0,4	% (w/v)	Bromphenolblau in H <sub>2</sub> O

#### Coomassie-Färbelösung

1	g/l	Coomassie-Brilliant Blue
50	% (v/v)	Methanol
20	% (v/v)	Essigsäure

#### Denaturierungslösung

1,5	M	Natriumchlorid
0,5	M	Natriumhydroxid

#### Entfärbelösung (für Protein SDS-PAGE)

30	% (v/v)	Methanol
1	% (v/v)	Ameisensäure

#### HBS-Puffer (für Dosper<sup>®</sup>-Transfektion)

20	mM	HEPES
150	mM	Natriumchlorid in H <sub>2</sub> O (pH 7,4), sterilfiltrieren

**HeBS-Puffer (2x)**

0,28	M	Natriumchlorid
0,05	M	HEPES
1,5	mM	Dinatriumhydrogenphosphat
pH 7,05 mit NaOH einstellen, sterilfiltrieren		

**Kinase-Lysepuffer**

20	mM	Tris, pH 7,4
1	mM	EDTA
1	mM	EGTA
50	mM	Natriumfluorid
0,2	mM	Natriumorthovanadat

**Laemmli-Auftragspuffer (4x) (für SDS-PAGE)**

100	mM	Tris, pH 6,8
8	% (w/v)	SDS
24	% (w/v)	Glycerol
16	% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
0,02	% (w/v)	Bromphenolblau

**Laemmli-Elektrophoresepuffer (für SDS-PAGE)**

25	mM	Tris
192	mM	Glycin
0,1	% (w/v)	SDS

**LB-Medium (für Bakterienkultur)**

5	g	Hefeextrakt
10	g	Trypton
10	g	Natriumchlorid
H <sub>2</sub> O ad 1 l		

**LB/Ampicillin**

50 – 100  $\mu$ g/ml Ampicillin in LB-Medium

**LB-Ampicillin-Agar**

15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium

- autoklavieren
- nach Abkühlung auf Handwärme Ampicillin zusetzen
- Platten gießen und bei 4 °C lagern

**Luziferase-Lysepuffer**

25	mM	Tris, pH 7,8
2	mM	DTT
2	mM	CDTA
10	% (v/v)	Glycerol
1	% (v/v)	Triton X-100

Dieser Puffer ist unter dem Namen *Cell Culture Lysis Buffer* (CCLB) bei der Firma Promega erhältlich.

**Luziferase-Meßreagenz**

20	mM	Tricin
2,67	mM	Magnesiumsulfat
1,07	mM	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O
1	mM	EDTA
33	mM	DTT
270	µM	Coenzym A
470	µM	Luziferin-Natriumsalz
530	µM	ATP
		pH 7,8
		bei – 80 °C lichtgeschützt lagern (einige Monate haltbar)

**Methylenblau-Färbelösung**

2	% (w/v)	Methylenblau
in 50	% (v/v)	Ethanol

**MOPS (10x) (für RNA-Agarosegelelektrophorese)**

0,4	M	MOPS
0,1	M	Natriumacetat
10	mM	EDTA
		pH 7,0, autoklavieren

**Neutralisationslösung**

1,5	M	Natriumchlorid
0,5	M	Tris
		pH 7,0, autoklavieren

**Puffer für Tank-Western-Blot**

192	mM	Glycerol
25	mM	Tris
20	% (v/v)	Methanol
0,075	% (w/v)	SDS
		pH 8,3 überprüfen, aber nicht einstellen

**Puffer I (für *Semi-Dry-Western-Blot*)**

0,4	% (w/v)	SDS
60	mM	Milchsäure
100	mM	Tris, pH 8,4

**Puffer II (für *Semi-Dry-Western-Blot*)**

0,1	% (w/v)	SDS
15	mM	Milchsäure
100	mM	Tris, pH 8,4

**Puffer III (für *Semi-Dry-Western-Blot*)**

20	% (v/v)	Methanol
60	mM	Milchsäure
20	mM	Tris, pH 3,8

**Puffer IV (für *Semi-Dry-Western-Blot*)**

20	% (v/v)	Methanol
100	mM	Tris, pH 10,4

**Puffer A (für *In-Gel-Kinase-Assay*)**

50	mM	HEPES, pH 7,4
0,039	% (v/v)	β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch frisch zusetzen)

**Puffer B (für *In-Gel-Kinase-Assay*)**

25	mM	HEPES, pH 7,4
10	mM	Magnesiumchlorid
90	μM	Natriumorthovanadat (vor Gebrauch frisch zusetzen)
0,039	% (v/v)	β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch frisch zusetzen)

**Puffer C (für *In-Gel-Kinase-Assay*)**

10	mM	Natriumpyrophosphat
5	% (w/v)	Trichloressigsäure

**Puffer A (für Kernextrakte)**

10	mM	HEPES
10	mM	Kaliumchlorid
1,5	mM	Magnesiumchlorid
0,3	mM	Natriumorthovanadat
20	mM	β-Glycerophosphat
		pH 7,9 mit KOH einstellen

**Puffer B (für Kernextrakte)**

20	mM	HEPES
1,5	mM	Magnesiumchlorid
0,42	mM	Natriumchlorid
0,2	mM	EDTA
0,3	mM	Natriumorthovanadat
20	mM	β-Glycerophosphat
		pH 7,9 mit KOH einstellen

**Sammelgelpuffer (für SDS-PAGE)**

0,126	mM	Tris, pH 6,8
5	% (v/v)	Acrylamid / Bisacrylamid (30:1)
0,1	% (w/v)	SDS
0,2	% (v/v)	TEMED
0,1	% (w/v)	APS

**TAE-Puffer (für DNA-Agarose-Gelelektrophorese)**

0,04	M	Tris
0,11	% (v/v)	Essigsäure
1	mM	EDTA

**TBS-Puffer**

20	mM	Tris, pH 7,4
500	mM	Natriumchlorid

**TBS / T (0,05 bzw. 0,1 %)-Puffer**

TBS-Puffer mit 0,05 % bzw. 0,1 % (v/v) Tween 20 versetzen

**TSS-Puffer**

50	mM	Magnesiumsulfat
10	% (w/v)	Polyethylenglykol 8000
5	% (v/v)	DMSO
		in LB-Medium
		pH 6,5-6,8

**Trenngel (für SDS-PAGE)**

0,375	M	Tris, pH 8,8
7,5-12,5	% (v/v)	Acrylamid / Bisacrylamid (30:1)
0,1	% (w/v)	SDS
0,2	% (v/v)	TEMED
0,1	% (w/v)	APS

**Triton-Lysepuffer**

10	mM	Tris, pH 7,05
30	mM	Natriumpyrophosphat
50	mM	Natriumchlorid
1	% (v/v)	Triton X-100
50	mM	Natriumfluorid
20	mM	$\beta$ -Glycerophosphat

**X-Gal-Fixierlösung**

2	% (v/v)	Formaldehyd
0,2	% (v/v)	Glutardialdehyd in PBS, sterilfiltrieren

**X-Gal-Färbelösung**

3	mM	Kaliumferricyanid
3	mM	Kaliumferrocyanid
2	mM	Magnesiumchlorid
1	mg/ml	X-Gal (in DMSO gelöst) in PBS vor Versuchsbeginn frisch ansetzen

## 2.2 Geräte

Brutschrank:	CO <sub>2</sub> Autozero, Heraeus (Hanau)
Eismaschine:	Ziegra (Isernhagen)
Elektroporator:	Gene Pulser II mit Controller, BioRad (München)
Elektrophoresekammern:	Mighty Small SE245, Hoefer (USA) Vertikale duale Elektrophoresekammer, Sigma (Osterode)
Filmentwicklungsmaschine:	Optimax, Protec
Geltrockner:	GSD4, Pharmacia (Freiburg) Maxidry D64, Biometra (Göttingen)
Heizblock:	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifugen:	RC2B, Sorvall (Bad Homburg) Sigma 3K20 und 6K10 (Osterode, Harz)
Luminometer	Lumat LB9507, EG&G Berthold (Bad Wildbad)
Mikroskope:	Laborlux 11, Leitz ULWCD Olympus (Tokyo, Japan), mit Kameraausstattung
Mikrotestplattenleser:	MR 6500, Dynatech (Denkendorf)
Phospho-Imager:	GS 250, BioRad (München)
Spektralphotometer:	UV-160A, Shimadzu (Hannover)
Sterilwerkbank:	Lamin Air HB 2472, Heraeus (Hanau)
Szintillationsmeßgerät:	Wallac 1410, Pharmacia (Freiburg)
Themocycler:	Vario V, Landgraf (Hannover)
Tischzentrifuge:	Biofuge pico, Heraeus (Osterode, Harz)
Ultrazentrifuge:	TL-100, Beckmann (München)
UV-Transilluminator:	GelDoc System, BioRad (München) Bachofer (Reutlingen), mit Polaroid-Kamera
Western-Blot-Kammern:	<i>Semy-Dry-Blotter</i> , Schleicher & Schuell LKB 2051 Midget Multiblot, LKB (Schweden)
Zellzentrifuge:	RT 6000, DuPont (Bad Homburg)

## 2.3 Materialien

### 2.3.1 Antikörper und rekombinante Proteine

Huhn anti p54MAPK-Antikörper:	zur Verfügung gestellt von Prof. J. Saklatvala
Kaninchen anti phospho-ATF-2 (Thr71):	New England Biolabs (Schwalbach)
Kaninchen anti ATF-2:	New England Biolabs (Schwalbach)
Kaninchen anti Ratte MAP Kinase R2	
ERK-1-CT Antikörper:	UpstateBiotechnology Inc. (N.Y., USA)
anti-Huhn IgG-POD:	Sigma (Osterode)
anti-Kaninchen IgG-POD:	Amersham (Braunschweig)
humanes, rekombinantes GST-c-Jun (AS 1-135):	zur Verfügung gestellt von Dr. M. Kracht
humanes, rekombinantes IL-1 $\alpha$ :	zur Verfügung gestellt von Prof. J. Saklatvala

### 2.3.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Serva, Sigma, Merck, Baker, Fluka, Biomol, Promega und Pharmacia bezogen (Qualitätsstufe „p.a.“, „Für die Molekularbiologie“ oder „*cell culture grade*“).

### 2.3.3 Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits

Bradford-Kit:	Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad (München)
dNTP Set:	New England Biolabs (Schwalbach)
ELISA-Kit:	Genzyme Diagnostics (USA)
GSH-Sepharose:	Pharmacia (Freiburg)
G418 (Geneticin):	Calbiochem (Bad Soden/Ts.)
Hybond-N	Amersham (Braunschweig)
Medien und Zusätze für Zellkultur:	GibcoBRL (Eggstein)
Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE (ungefärbt):	Pharmacia (Freiburg)
PVDF-Membran:	Millipore (Eschede)

pd(N) <sub>6</sub> :	Pharmacia (Freiburg)
QIAamp Tissue Kit (Präparationskit für genomische DNA aus eukaryontischen Zellen):	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Kit (DNA-Präparationskit):	Qiagen (Hilden)
QIAshredder (Zellhomogenisationsröhrchen):	Qiagen (Hilden)
QIAquick-Gel-Extraktions-Kit:	Qiagen (Hilden)
QSQ-DNA-Mini-Präparationskit:	MoBiTek (Göttingen)
Radioaktive Isotope:	Hartmann Analytics (Braunschweig)
Restriktionsendonukleasen:	MBI (St. Leon-Rot), Pharmacia (Freiburg)
Reverse Transkriptase (MMLV):	GibcoBRL (Eggstein)
RNeasy-Mini-Kit (RNA-Extraktionskit):	Qiagen (Hilden)
Röntgenfilme:	X-Omat, Biomax MR/ML (Kodak)
Taq-DNA-Polymerase:	GibcoBRL (Eggstein)
Zellkulturmaterial:	Nunc (Wiesbaden)

### 2.3.4 Plasmide

pBHEluc	zur Verfügung gestellt von PD Dr. H. Holtmann
pcDNA3	Invitrogen (Leek, Niederlande)
pcDNA3.1/His B/ <i>lacZ</i>	Invitrogen (Leek, Niederlande)
pcDNA3SAPKβ	kloniert in der Arbeitsgruppe Kracht
pcDNA3JNK2	zur Verfügung gestellt von Dr. M. Kracht
peVRF0HA bzw. HA/His:	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Nordheim
peVRF0HA(His)-Konstrukte:	kloniert in der Arbeitsgruppe Kracht
pGEXKGSAPKβ	zur Verfügung gestellt von J. R. Woodgett, Kanada
pGEX2TJNK1	zur Verfügung gestellt von Dr. M. Kracht
pNFκB-Luc-Plasmid	Stratagene (Heidelberg)
puhc133IL8promotorluc-Plasmid	kloniert in der Arbeitsgruppe Holtmann/ Kracht

### 2.3.5 Eukaryontische Zelllinien

HeLa	ATCC CCL2	epitheliales Cervixkarzinom (human)
HepG2	ATCC HB 8065	hepatozelluläres Karzinom (human)
KB	ATCC CCL17	orales epidermales Karzinom (human)
HEK293	DSZM	adenovirus-transformierte embryonale Nierenzelle (human)

### 2.4 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien sind adhärenent und wurden in 25- oder 50 ml-Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer wassergesättigten Atmosphäre in Vollmedium kultiviert.

Die Vollmedien setzten sich wie folgt zusammen.

Zelllinie:	Medium:
HeLa, HepG2, KB	DMEM mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin
HEK293	Nut-Mix-F12, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin

Die Passage der adhärenenten Zellen erfolgte alle 4 Tage, soweit sie einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten. Dazu wurde das Medium abdekantiert, die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin / EDTA Lösung versetzt (5 g/l Trypsin, 2 g/l EDTA, 1:10 in PBS). Mit dieser Lösung wurden die Zellen bei 37 °C bis zum Ablösen (ca. 5 min) inkubiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf 6 ml Medium verdünnt und je nach Dichte des Zellrasens auf 4 bis 6 neue Kulturflaschen verteilt, in denen Medium vorgelegt wurde.

#### 2.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Trypsin-behandelten und abgelösten Zellen einer 50 ml Zellkulturflasche bei 1.200 UpM für 5 min bei RT sedimentiert. Danach wurde das Zellpellet

in 500 µl DMEM / 40 % (v/v) FKS resuspendiert und in Eis auf 0 °C gekühlt. Diese Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt, indem 500 µl DMEM / 20 % (v/v) DMSO vorlag. Die Kryoröhrchen wurden in einem auf 4 °C vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten Nalgene-*Cryo Freezing Container* über Nacht in einen –80 °C Tiefkühlschrank gestellt und zur längeren Lagerung in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden dem Dewargefäß ein entsprechendes Kryoröhrchen mit Zellen entnommen, schnell aufgetaut und in 10 ml Vollmedium (RT) überführt. Die Zellen wurden sofort abzentrifugiert (5 min, 1.200 UpM, RT), um das DMSO zu entfernen, in frischem Medium resuspendiert und im Brutschrank kultiviert. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

#### **2.4.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung**

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (0,08 % (v/v) in PBS) versetzt. Lebende Zellen sind in der Lage Trypanblau aktiv auszuscheiden, während tote oder geschädigte Zellen dazu nicht mehr fähig sind und sich Blau färben.

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{ausgezählte Zellen / Großquadrat} \times 2 \times 10^4$$

Die Zellvitalität ergab sich aus dem Verhältnis der toten (gefärbten) zu den lebenden (ungefärbten) Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl (Summe der lebenden und toten Zellen).

#### **2.4.3 Methylenblau-Färbung**

Zur Färbung der lebenden Zellen in Mikrotiterplatten eignet sich Methylenblau. Dazu wurde das Medium von den Zellen entfernt, zweimal mit warmen PBS gewaschen und anschließend die Methylen-Färbelösung für 2 min auf den Zellen inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen mit kaltem Wasser gewaschen und konnten anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

#### 2.4.4 Stimulation von Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte in serumhaltigen Vollmedium. Dazu wurde das Medium der Zellen am Tag des Versuches durch Frisches ersetzt und das jeweilige Agens zugefügt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zusätze im Medium, bei denen ebenfalls ein Medienwechsel durchgeführt wurde. Dadurch konnte ein Stimulationseffekt des Serums ausgeschlossen werden. Die Inkubationszeiten richteten sich nach der Fragestellung.

In den Versuchen wurden verschiedene Stimuli eingesetzt. Die nachfolgende Liste gibt einen Überblick über die eingesetzten Konzentrationen. Abweichungen sind bei den entsprechenden Experimenten vermerkt.

<u>Substanz:</u>	<u>Konzentration:</u>
IL-1 $\alpha$	10 ng/ml
Sorbitol	500 mM
Anisomycin	5 $\mu$ g/ml
TNF	1000 U/ml
EGF	50 ng/ml

#### 2.5 Mikrobiologische Methoden

##### 2.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Um die verwendeten *E. coli*-Stämme kompetent für die einschleusende superhelikale Plasmid-DNA zu machen, wurde die TSS-Methode nach Chung (1989) verwendet.

Der *E. coli*-Stamm wurde in LB-Medium bis zu einer Zelldichte von 0,3 – 0,5 OD<sup>600</sup> angezogen und die Bakterien anschließend abzentrifugiert (1.000 x g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 1/10 des Originalvolumens eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert (100  $\mu$ l), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei –80 °C gelagert.

## 2.5.2 Transformation von Bakterien

Ein 100 µl Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Dann wurde die entsprechende DNA (10-100 ng) hinzugefügt. Nach Inkubation auf Eis (1 h), wurde der Ansatz im Wasserbad 45 sec bei 42 °C erhitzt, anschließend wieder auf Eis gelagert (2 min). Nach Verdünnung des Ansatzes in 1,5 ml LB-Medium, wurden die Zellen 60 min unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (12.000 UpM, 1 min), resuspendiert und auf einer LB/Amp-Platte ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank (37 °C) wurden die herangewachsenen Bakterienklone wieder in LB/Amp-Medium hochgezogen, um genügend Zellmaterial für die DNA-Analyse zu erhalten.

## 2.5.3 Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung der transformierten Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde eine LB/Amp-Flüssigkultur des entsprechenden Klons über Tage hochgezogen ( $OD^{600}$  ca. 0,5). 200 µl dieser Zellsuspension wurden in 1 ml sterilem LB/50 % (v/v) Glycerol pipettiert, vermischt und bei -80 °C gelagert.

## 2.6 Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren

### 2.6.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation, bis 20 µg DNA) wurde mit Hilfe des QSQ-Plasmid-Isolations-Kits der Firma MoBiTec durchgeführt.

Präparationen im mittleren (Midi-Präparationen, bis 100 µg DNA) und großem (Maxi-Präparationen, bis 500 µg DNA) Maßstab wurden mit Hilfe der Plasmid-Isolations-Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

Ausgehend von Einzelzellklonen nach einer Transformation oder mit Bakteriensuspension aus einem bei -80 °C gelagerter Glycerinkultur erfolgte die Anzucht der Kolonie in Selektivmedium über Nacht unter Schütteln bei 37 °C. Das Kulturvolumen (3 ml für eine Mini-Präparation, 100 bis 750 ml bei einer Midi- / Maxi-Präparation) richtete sich nach der

Präparationsmethode und dem Plasmid-Typ (*low*-oder *high-copy* Plasmid). Alle verwendeten eukaryontischen Expressionsvektoren sind *low-copy*-Plasmide.

Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien (5.000 x g, 14 min, RT) erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß den Herstellerangaben und wird hier nicht im Detail beschrieben. Das Prinzip beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen nach Birnboim und Doly (1979) und der Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine patentierte Anionenaustauscher-Säule. Die DNA wurde in 50 bzw. 200 µl sterilem Wasser gelöst.

### **2.6.2 Präparation von genomischer DNA**

Die Isolation von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp Tissue Kits der Firma Qiagen. Aus  $1 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz wurde RNA freie genomische DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert. Nach einem Proteinase-K-Verdau der Zellen und einer anschließenden RNase A Inkubation zum Entfernen der RNA, wurde die genomische DNA über eine Membran gebunden, mehrmals gewaschen und anschließend mit 100 µl bidest Wasser eluiert.

### **2.6.3 Präparation von Gesamt-RNA**

Die Gesamt-RNA der eukaryontischen Zellen wurde mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen nach der Vorschrift des Herstellers isoliert.

Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit einem sterilem, RNase freien Einwegschaaber und kaltem, sterilem PBS vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, pelletiert (1.200 UpM, 5 min, RT), nochmals in PBS gewaschen und wiederum pelletiert. Die Zellpellets wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Das Zellpellet wurde im mitgeliefertem Puffer des Herstellers lysiert und durch Zentrifugation durch ein QIAshredder-Röhrchen homogenisiert. Dieses Lysat wurde dann auf eine Säule gegeben, die eine RNA-bindende Membran besaß. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der RNA mit 50 µl bidest Wasser.

Um RNA-Degradationen auszuschließen, wurde ein Aliquot der präparierten RNA auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt.

#### 2.6.4 Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorptionsmessung

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA erfolgte durch Aufnahme eines UV-Spektrums in einem Bereich von 220 - 320 nm gegen Wasser in einer Halb-Mikro-Quarzküvette (1 ml).

Für das Absorptionsmaximum gilt folgende Näherung:

1 OD <sup>260</sup> entspricht	50 µg/ml dsDNA
	40 µg/ml ssDNA
	30 µg/ml Oligonukleotide
	40 µg/ml RNA

#### 2.6.5 Reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis von Transkripten auf mRNA-Ebene wurde die präparierte Gesamt-RNA der Zellklone mit pd(N)<sub>6</sub> (*random hexamer*) revers transkribiert und anschließend in der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Hilfe spezifischer *Primer* untersucht. Um DNA-Kontaminationen in der Gesamt-RNA auszuschließen, wurden Kontrollansätze ohne Reverser Transkriptase mitgeführt.

Als Positivkontrolle der RT-PCR diente der Nachweis des konstitutiv exprimierten Tubulins. Die eingesetzten *Primer* wurden durch eine PCR mit der Plasmid-DNA des Konstruktes überprüft.

### 2.6.5.1 Reverse Transkription

Das Gesamtvolumen eines RT-Ansatzes betrug 20  $\mu$ l und setzte sich wie folgt zusammen.

<u>Bestandteil:</u>	<u>Konzentration:</u>	<u>V (<math>\mu</math>l) pro Ansatz:</u>	<u>finale Konzentration:</u>
Gibco-RT-Puffer	5x	4	1x
Magnesiumchlorid	50mM	2	5 mM
dNTP's	10mM	2	1 mM
<i>Random Hexamer</i>	50 $\mu$ M	1	2,5 $\mu$ M
RNAse Inhibitor	40 U/ $\mu$ l	0,5	20 U
Gesamt-RNA		1 $\mu$ g	
M-MLV RT	200 U/ $\mu$ l	1	200 U
			ad 20 $\mu$ l bidest H <sub>2</sub> O

dNTP's: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Gibco-RT-Puffer (5x):

- 250 mM Tris, pH 8,3
- 375 mM Kaliumchlorid
- 15 mM Magnesiumchlorid

Vor der Reaktion wurden die Ansätze mit je 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet, dann in einem Thermocycler inkubiert. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 10 min bei 23 °C, 60 min bei 37 °C (Reaktion), 5 min 95 °C (Denaturierung), 10 min 5 °C. Direkt im Anschluß wurden die Ansätze in die PCR eingesetzt.

### 2.6.5.2 Polymerasekettenreaktion

Die aus der RT-PCR gewonnene cDNA wurde nun mit spezifischen *Primern* amplifiziert, um das zu erwartende Produkt nachzuweisen.

Zur Amplifikation von spezifischen Fragmenten aus Plasmid-DNA oder genomischer DNA wurden die PCR-Ansätze anstatt mit dem RT-Produkt, mit 1  $\mu$ g genomischer DNA bzw. 500 ng – 1  $\mu$ g Plasmid-DNA in jeweils 20  $\mu$ l bidest Wasser versetzt.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt zusammenpipettiert.

<u>Bestandteil:</u>	<u>Konzentration:</u>	<u>V (µl) pro Ansatz:</u>	<u>finale Konzentration:</u>
PCR-Puffer	10x	8	0,8x
Magnesiumchlorid	50 mM	2,5	2,2 mM
dNTP's	10 mM	1,6	0,36 mM
<i>Primer 1 (sense)</i>	10 µM	5	2,5 µM
<i>Primer 2 (as)</i>	10 µM	5	2,5 µM
RT-Produkt	20 µl		

dNTP's: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Taq-PCR-Puffer (10x):

200 mM Tris, pH 8,4

500 mM Kaliumchlorid

Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet (50 µl) und einem sog. „Hot-Start“-Protokoll vor Zugabe der Polymerase unterzogen. Dazu wurden die Proben zuerst 5 min bei 95 °C und anschließend 5 min bei 85 °C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von je 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (Gibco: 5 U/µl) und die weitere Inkubation im Thermocycler. Es wurden mit folgendem Programm 30 Zyklen durchgeführt.

Temperaturprogramm:

- 5 min 95 °C (Schmelzen der DNA)
- 1 min 55 °C (*Primer*-Anlagerung)
- 1 min 72 °C (DNA-Polymerisation)

Das Auftrennen der PCR-Produkte erfolgte auf einem Agarosegel (1,0-2 % (w/v)). Zur spezifischen Amplifikation von größeren Produktmengen, wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und extrahiert (siehe Kapitel 2.6.9, Seite 31), und in eine zweite PCR eingesetzt.

### 2.6.5.3 Verwendete Primer

*Primer* SAPKBS346 (sense *Primer*):

5'- GTT GTC AAA CAT TAC AAC -3'

*Primer* SAPKBA1661 (antisense *Primer*):

5'- GAA GAA CGC TGG GTT TC -3'

*Primer* 3 (sense *Primer*):

5'- CTC GAC AGA ATT GTC GCG ATT AGG AAG CTC AGC AGA CCC TTC C -3'

*Primer* 4 (antisense *Primer*):

5'- GTG ACG AAC CAT TTC TCC CAT G -3'

## **2.6.6 Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (*Southern-Blot*)**

Der Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran vollzog sich über die Kapillarwechselwirkungen der aufgebauten Apparatur. Zunächst wurde das Gel zweimal je 15 min in Denaturierungspuffer inkubiert und anschließend weitere 30 min in Neutralisationspuffer äquilibriert. Danach wurde der *Blot* wie folgt aufgebaut:

Auf eine mit 10 x SSC gefüllte Glasschale wurde eine Glasplatte als Steg gelegt, so daß ein Plateau entstand. Anschließend wurde ein Whatman3MM-Filterpapier so auf den Steg gelegt, daß dessen beide Enden in den SSC-Puffer hingen. Auf das Whatman-Filterpapier kam das DNA-Gel, darauf die in 10 x SSC äquilibrierte Nylonmembran. Gel und Membran wurden mit zwei Filterpapieren bedeckt, und zum Abschluß wurden noch zwei Windeln aufgelegt, die die gleichen Flächengrößen hatten wie das Gel und die Membran. Zum Beschweren wurde ein Bleiblock verwendet. Die DNA wanderte durch die entstandenen Kapillarwirkungen innerhalb von 18 h aus dem Gel an die Membran.

Die Nylonmembran wurde in 2 x SSC gewaschen und für 10 min bei 80 °C getrocknet. Anschließend wurde die DNA unter UV-Licht (302 nm) für 90 sec fixiert. Dabei kann die Transfereffizienz optisch geprüft werden.

## 2.6.7 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die auf eine Nylonmembran übertragene DNA wurde mit einer p54SAPK $\beta$ -Sonde hybridisiert. Diese Sonde bestand aus der gesamten kodierenden Region und wurde als Fragment nach Standardprotokoll aus dem pcDNA3-p54SAPK $\beta$ -Plasmid isoliert. Die Markierung der doppelsträngigen DNA erfolgte mit dem *Random-prime DNA Labeling* System der Firma Amersham nach Anleitung des Herstellers. Eingesetzt wurde die Sonde einzelsträngig, sie wurde unmittelbar vor Gebrauch denaturiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte nach gängigem Standardprotokoll (Ausubel *et al.*, 1996). Die Detektion der radioaktiven Banden erfolgte mittels Autoradiographie.

## 2.6.8 Gelelektrophoretische Auftrennung

### 2.6.8.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarose-Gele verwendet. Die Agarose-Konzentration richtete sich hierbei nach der zu trennenden Fragmentgröße. In der Regel wurde mit 1 %igen (w/v) Agarose-Gelen gearbeitet, die lineare DNA-Fragmente von ca. 500 – 10.000 bp auftrennen können.

Die erforderliche Agarosemenge wurde in 1x TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle aufgekocht, nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit Ethidiumbromid versetzt (0,5  $\mu$ g/ml Endkonzentration) und in die nivellierte Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt und die mit Auftragspuffer versetzten Proben wurden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm.

Die Anwesenheit von Ethidiumbromid ermöglichte die Detektion der Banden nach der Elektrophorese auf einem UV-Transilluminator. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und tritt auch in Wechselwirkung mit einzelsträngiger DNA und RNA.

Als Größenmarker wurde sowohl mit *Hind* III und *Eco* RI gespaltene  $\lambda$ -DNA, als auch mit *Hae* III geschnittene  $\phi$ 174-DNA verwendet.

### 2.6.8.2 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Zur Kontrolle der RNA-Extraktion wurde ein Aliquot (2-4 µg) der Gesamt-RNA auf einem denaturierendem Agarosegel aufgetrennt. Das in der Regel 1,6 %ige (w/v) Agarose-Gel wurde in 1x MOPS-Puffer angesetzt und enthielt 6,8 % (v/v) Formaldehyd. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 1x MOPS.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die RNA-Proben (ad 5 µl mit bidest Wasser) mit Formaldehyd (3,75 µl), 10x MOPS (1,5 µl) und Ethidiumbromid (200 µg/ml: 2 µl) versetzt, 5 bis 15 min bei 56 °C denaturiert und auf Eis abgeschreckt.

### **2.6.9 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen**

Die präparative Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraktions-Kits der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufreinigungsmethode basiert auf der spezifischen Bindung und Elution von DNA an ein bestimmtes Säulenmaterial und ist optimal für Fragmente zwischen 100 und 500 Nukleotide.

### **2.6.10 Analyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Analytische und präparative Restriktionsverdauungen wurden mit den entsprechenden Enzymen von MBI und Pharmacia in dem OPA-Reaktionspuffer (Pharmacia) durchgeführt.

Für analytische Zwecke wurden in der Regel 10 µl-Ansätze mit 1 µg DNA und 1-2 U Restriktionsenzym für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Versetzen des Ansatzes mit dem Auftragspuffer wurde der Ansatz im Agarose-Gel analysiert.

Die präparativen Spaltansätze wurden in größeren Volumina (50-100 µl) durchgeführt.

## 2.7 Präparative und analytische Methoden für Proteine

### 2.7.1 Gewinnung von Proteinen aus einem Gesamtzellsat

Sowohl für den Nachweis der c-Jun N-terminalen Kinaseaktivität als auch für den Nachweis von Proteinen im *Western-Blot* wurden Gesamtzellsate verwendet.

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten, welche die zu untersuchenden Kinasen enthielten, wurde der Zellaufschluß durch Scherung der Membran durchgeführt. Dazu wurden die im Kinasepuffer befindlichen Zellen je 3x durch eine Kanüle mit 0,9 mm Durchmesser (20 gauge) und anschließend durch eine Kanüle mit 0,45 mm Durchmesser (26 gauge) gezogen. Alternativ wurde die Zellmembran mit Hilfe von Detergenz in der Kälte aufgebrochen, wobei entweder dem Kinase-Lysepuffer 0,5 % (v/v) NP-40 zugesetzt oder der Triton-Lysepuffer (mit 1 % (v/v) Triton X-100) verwendet wurde. Die genauen Bedingungen sind bei den entsprechenden Experimenten vermerkt.

Pro Ansatz wurden die in kaltem PBS mit einem Einwegschaaber vom Boden des Kulturgefäßes abgelösten Zellen pelletiert (1.200 UpM, 5 min, 4 °C), anschließend im Kinase-Lysepuffer oder Triton-Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis gelagert. Falls kein Detergenz verwendet wurde, wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Kanülen aufgebrochen. Das rohe Lysat wurde anschließend abzentrifugiert; für eine grobe Zellfraktionierung bei 15.000 x g (4 °C, 15 min), für reinere Lysate mittels Ultrazentrifugation (100.000 x g, 45 min, 4 °C). Auch diese Bedingungen sind bei den entsprechenden Experimenten vermerkt.

Die Zellmenge und das Puffervolumen richtete sich nach den jeweiligen Fragestellungen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Mengen.

<u>Zellzahl:</u>	<u>Lyse-Puffer-Menge:</u>
2 x 10 <sup>6</sup> Zellen	35 µl
5 x 10 <sup>6</sup> Zellen	50 µl
1-1,5 x 10 <sup>7</sup> Zellen	150 µl

In dem verwendeten Lyse-Puffer wurden jeweils kurz vor Versuchsbeginn folgende Protease- und Phosphataseinhibitoren zugefügt.

<u>Kinase-Lysepuffer:</u>			<u>Triton-Lysepuffer:</u>		
1	mM	PMSF	0,5	mM	PMSF
10	$\mu$ M	E64	0,5	$\mu$ g/ml	Leupeptin
0,5	$\mu$ g/ml	Pepstatin	0,5	$\mu$ g/ml	Pepstatin
4	mM	DTT	400	nM	Okadainsäure

### 2.7.2 Gewinnung von Kernextrakten

Die Herstellung der Kernextrakte orientierte sich an der Methode von Dignam (1990), wobei den Puffern weitere Inhibitoren zugesetzt wurden.

Bei allen Verarbeitungsschritten wurde darauf geachtet, in der Kälte zu arbeiten (4 °C) und zusätzlich wurden in allen verwendeten Puffern jeweils kurz vor Versuchsbeginn folgende Protease- und Phosphataseinhibitoren zugefügt.

300	$\mu$ M	PMSF
10	$\mu$ M	E64
400	nM	Okadainsäure
0,5	$\mu$ g/ml	Leupeptin
0,5	$\mu$ g/ml	Pepstatin
5	mM	DTT

Für die Kernextrakt-Präparation wurden pro Ansatz  $1-1,5 \times 10^7$  Zellen in kaltem PBS mit einem Einwegschaaber vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und pelletiert (1.200 UpM, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 150  $\mu$ l Puffer A resuspendiert und wieder pelletiert (10.000 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Puffer A / 0,1% (v/v) NP-40 resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Um den Zellaufschluß mit dem „milden“ Detergenz zu fördern, wurden die Proben zwischendurch gevortext. Nach der Zentrifugation der Proben (10.000 x g, 5 min, 4 °C) pipettierte man den zytosolischen Überstand (zytosolische Fraktion) vorsichtig ab und das Pellet mit den

Kernen wurde in 50 - 70  $\mu$ l Puffer B (mit 25 % (v/v) Glycerol versetzt) aufgenommen. Zur Lyse wurden diese Proben dann 1 h auf Eis gelagert und zwischendurch kurz gevortext. Nach einer weiteren Zentrifugation (10.000 x g, 5 min, 4 °C) gewann man die gelösten nuklearen Proteine im Überstand (Kernfraktion).

Die Protein-Bestimmung der zytosolischen Fraktionen und Kernfraktionen erfolgte im Bradford-Test, ihre Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der hergestellten Lysate beruht auf der Methode nach Bradford (1976). Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant Blau (CBB) an basische und aromatische Aminosäuren verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm.

Durchgeführt wurde die Proteinbestimmung im Mikromaßstab mit dem *Protein Assay Kit* der Firma Bio-Rad. 100  $\mu$ l einer verdünnten Probenlösung (zwischen 1:50 und 1:1.000 in PBS) wurden in einer Mikrotiterplatte (96-Loch Flachbodenplatte) vorgelegt und mit 100  $\mu$ l des Bio-Rad-Reagenz (40 % (v/v)) versetzt. Nach 5-10 min erfolgte die Messung der Extinktion gegen einen Leerwert im ELISA-Reader (595 nm). Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Eichreihe mit BSA (0-35  $\mu$ g/ml in PBS) verwendet. Alle Messungen wurden in Dreifachwerten ausgeführt. Durch experimentelle Überprüfungen wurde bei den verwendeten Verdünnungen keine Störung der Extinktionsmessung durch Pufferbestandteile festgestellt.

### 2.7.4 Aktivitätsbestimmung von Proteinkinasen

Der Aktivitätsnachweis der SAPK/JNK's in Zellysaten wurde mittels verschiedener Methoden durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, ein exogen zugeführtes Substrat in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP *in vitro* zu phosphorylieren. Dabei kann das Substrat entweder gelöst in den Ansatz eingesetzt werden (Kinaseassay und GSH-Beads-Assay) oder in einem SDS-Gel polymerisiert vorliegen (*In-Gel-Kinase-Assay*).

Als Substrate dienten folgende Proteine:

GST-c-Jun Fusionsprotein (AS 1-135) (final 1  $\mu$ g) und Hsp27 (final 1  $\mu$ g).

#### 2.7.4.1 *In vitro* Kinase-Assay

In einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden 5 µl (5-10 µg Protein) Zellextrakt pro Ansatz vorgelegt, wobei für alle Ansätze in einem Assay die eingesetzte Proteinmenge identisch war. Dazu wurden 5 µl Substrat und 5 µl eines ATP/\*ATP-Mixes zugegeben. Die Ansätze wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Laemmli-Auftragspuffer beendet. Die Proben wurden dann direkt über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt, getrocknet und autoradiographiert. Die Färbung der Proteine mit Coomassie ermöglichte eine quantitative Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge.

##### ATP/\*ATP-Mix:

60 µM ATP  
0,2-0,4 µCi/µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP  
in ATP-Puffer

#### 2.7.4.2 *GSH-Beads-Assay*

Der *GSH-Beads-Assay* stellt eine modifizierte Form des *in-vitro* Kinaseassays dar (Price *et al.*, 1996). Hierbei wird nach der Kinasereaktion das Substrat (ein GST-Fusionsprotein) mit Hilfe von Glutathion Sepharose entfernt, gewaschen und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Dadurch werden Phosphoproteine, die sonst mit der Autoradiographie detektiert werden, abgetrennt und deshalb wird die Sensitivität des Assays stark erhöht.

Zuerst wurde pro Ansatz 30 µl GSH-Sepharose *Slurry* in Triton-Lysepuffer (mit 1 mM DTT versetzt) zweimal gewaschen und danach in 30 µl Puffer aufgenommen.

Für die Kinasereaktion wurden 10 µl Zellextrakt (30 µg Protein, ad 10 µl mit Triton-Lysepuffer ohne Zusätze), 10 µl GST-c-Jun-Substrat (1 µg Protein, ad 10 µl mit bidest Wasser) und 10 µl ATP/\*ATP-Mix (siehe 2.7.4.1) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der 30 µl äquilibrierten GSH-Sepharose wurden die Ansätze 30 min bei 30 °C auf dem Thermomixer langsam geschüttelt. Nach Zentrifugation (13.000 UpM, 3 min, 4 °C) und quantitativen Entfernens des Überstandes, wurden die Sepharose-Kügelchen zweimal mit je 200 Triton-Lysepuffer gewaschen und pelletiert (13.000 UpM, 3 min, 4 °C). Anschließend wurden die Proben in

20 µl 1x Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen und die GST-Fusionsproteine durch Erhitzen (5 min 95 °C) eluiert. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 UpM, 3 min, 4 °C) konnte der erhaltene Überstand auf einem SDS-Gel aufgetragen werden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel gefärbt, getrocknet und autoradiographiert. Das Anfärben der Proteinbanden auf dem Gel ermöglichte eine quantitative Kontrolle der eingesetzten Probenmengen.

#### 2.7.4.3 In-Gel-Kinase-Assay

Durchgeführt wurde der *In-Gel-Kinase-Assay* nach dem Protokoll von Zinck *et al.* (1995). Für die Aktivitätsbestimmung wurden zwei SDS-Gele (0,75 mm dick) vorbereitet und in nur einem Gel 40 µg GST-c-Jun pro ml Gelmatrix einpolymerisiert. Pro Ansatz wurden auf beiden Gelen jeweils 15 µg Zellextrakt aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurden beide Gele in Puffer A / 20 % (v/v) Isopropanol zweimal für 10 min gewaschen (dient zum Entfernen des SDS aus den Gelen) und dann für 1 h in Puffer A äquilibriert (beides bei RT). Die vollständige Denaturierung der Proteine im Gel erfolgte durch zweimalige Inkubation für je 30 min in Puffer A / 6 M Guanidiniumhydrochlorid bei RT. Anschließend erfolgte die Renaturierung bei 4 °C über Nacht in Puffer A / 0,04 % (v/v) Tween 20. Zur Vorbereitung der Kinasereaktion in der Gelmatrix wurden die Gele für 30 min bei RT in Puffer B äquilibriert.

Alle vorangegangenen Inkubationsschritte wurden in großen Puffervolumina unter ständigem Schwenken der Flüssigkeit durchgeführt.

Nachdem das Puffervolumen reduziert wurde (5 ml pro Gel), wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µCi  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]ATP pro Gel gestartet. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur. Durch Entfernen des radioaktiven Überstandes und Waschen der Gele in Puffer C wurde die Reaktion gestoppt und die Proteine im Gel fixiert. Die Gele wurden ca. 6 h mit halbstündigem Pufferwechsel gewaschen, bis die Radioaktivität mit einem  $\beta$ -Counter auf 20-50 ips reduziert war.

Anschließend wurden die Gele mit Coomassie angefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

### **2.7.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)**

Das Trennverfahren nach Laemmli (1970) erlaubt die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Denaturierte Proteine bilden mit SDS einen negativen Ladungskomplex, der im elektrischen Feld zur Anode wandert, so daß alleine der Vernetzungsgrad des Acrylamid-Geles die Trennleistung bestimmt. In dieser Arbeit wurden Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 30:1 verwendet, wobei der Vernetzungsgrad durch Variation des Volumenanteils (7,5-12,5 %) bestimmt wurde.

In einem Gelgießstand wurde zuerst das Trenngel gegossen, nach dem Auspolymerisieren darüber das Sammelgel (5 %) mit den Probetaschen. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert, abzentrifugiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA.

### **2.7.6 Färbung von Proteingelen mit Coomassie**

Das Anfärben und Fixieren der Proteinbanden erfolgte mit einer Coomassie-Lösung. Hierzu wurden die SDS-Polyacrylamidgele für 15-30 min bei RT mit der Färbelösung inkubiert. Da der Farbstoff das gesamte Gel zunächst auch unspezifisch färbt, wurden die Gele anschließend mit Entfärbelösung behandelt (mind. 2 h unter Rütteln), bis nur noch die gefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Anschließend wurden die Gele auf dem Gel-trockner in der Wärme unter Vakuum getrocknet.

Die Autoradiographie getrockneter, mit radioaktiv markierten Proteinen beladener, Gele erfolgte bei -80 °C.

### **2.7.7 Quantitative Auswertung von radioaktiven Gelen**

Zur densitometrischen Auswertung der radioaktiven Gele wurden diese mit einem *Phospho-Imager*-Gerät eingelesen und anschließend ausgewertet.

## 2.7.8 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran (*Western-Blot*)

Zur Immobilisierung der aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Membran und ihre anschließende immunologische Detektion wurden zwei *Western-Blot*-Verfahren verwendet.

Bei dem *Semi-Dry-Blot*-Verfahren befand sich das Gel und die Membran zwischen mehreren, mit verschiedenen Puffern getränkten, Filterpapierlagen, in einer Elektrotransfer-Apparatur mit zwei Graphit-Plattenelektroden. Aufgrund der geringen Pufferkapazität ist die Transferzeit beschränkt und insofern auch die Transferkapazität (Proteinmenge und -größe). Das *Tank-Blot*-Verfahren bot die Möglichkeit, große Proteinmengen effizient in einer kurzen Zeit zu transferieren, da das Puffervolumen zusätzlich gekühlt werden konnte.

### 2.7.8.1 *Semi-Dry*-Verfahren

Zur Vorbereitung wurden die benötigten Filterpapiere (1,5 mm dick) in den entsprechenden Puffern äquilibriert und dann feucht eingesetzt. Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch wenige Sekunden in 100 % Methanol aktiviert, danach in Wasser äquilibriert. Der Aufbau in der Elektrotransfer-Apparatur war wie folgt:

Anode der <i>Blotting</i> -Apparatur	
2 Lagen Filterpapier	Puffer IV
1 Lage Filterpapier	Puffer III
PVDF-Membran	
SDS-PAGE	
1 Lage Filterpapier	Puffer II
2 Lagen Filterpapier	Puffer I
Kathode der <i>Blotting</i> -Apparatur	

Der Transfer erfolgte mit 0,75 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche für 2h.

### 2.7.8.2 Tank-Blot-Verfahren

Die PVDF-Membran wurde in 100 % (v/v) Methanol aktiviert, in Wasser äquilibriert und mit dem Gel in je eine Lage Puffer getränktes Filterpapier (1,5 cm) in die Tank-Kassette gelegt. Die Kassette wurde anschließend vertikal in den Blot-Tank hineingeschoben, mit kaltem Puffer aufgefüllt und bei 4 °C für 4 h bei konstanten 240 mA (bzw. für 16 h bei 60 mA) im Kühlraum geblottet.

### 2.7.8.3 Färbung der PVDF-Membran mit Coomassie

Zur Visualisierung des Proteintransfers auf die Membran, wurde diese mit Coomassie-Färbelösung für ca. 5 min gefärbt, anschließend mit 50 % (v/v) Methanol entfärbt, fotografiert und dann vollständig mit 100 % (v/v) Methanol entfärbt. Zur anschließenden Immunfärbung wurde die Membran in TBS-Puffer äquilibriert und gewaschen.

## **2.7.9 Immundetektion transferierter Proteine mittels Chemilumineszenz (ECL)**

Zur spezifischen Detektion der auf der PVDF-Membran befindlichen Antigene wurde nach Absättigung freier Bindungsstellen durch Blocken (5 % (w/v) Milchpulver in TBS, über Nacht bei 4 °C) mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert (4 °C über Nacht). Die Verdünnungen des Antikörpers wurden in TBS / 5 % (w/v) Milchpulver / 0,01 % (w/v) Natriumazid angesetzt, richteten sich jeweils nach den Herstellerangaben und betragen, wenn nicht anders angegeben, 1:1.000. Der Primärantikörper wurde mehrere Male wiederverwendet. Nach Entfernung und mehrmaligen Waschen der Membran in TBS (6 x 10 min) wurde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2.500 in TBS / 5 % (w/v) Milchpulver) für 4 h bei RT inkubiert. Nach dem Verwerfen des Sekundärantikörpers und dem erneuten Waschen (1/2 h mit TBS bei RT) der Membran, erfolgte die Detektion. Alle verwendeten Sekundärantikörper (siehe dazu Kapitel 2.3.1) waren konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, dies ermöglichte die Detektion der Banden als Chemilumineszenzsignale mittels einem ECL-Reagenz und Autoradiographiefilmen.

Eine PVDF-Membran konnte mehrmals für verschiedene Immunfärbungen eingesetzt werden. Um gebundene HRP zu inaktivieren, wurde die Membran in 100 % (v/v)

Methanol gewaschen, anschließend wieder in TBS äquilibriert. Diese Methode entfernt zwar nicht die gebundenen Antikörper von den Proteinen, es sind aber in der Regel noch genügend freie Bindungsstellen für weitere Detektionen vorhanden.

## **2.8 Interleukin-8-Bestimmung**

Zur Konzentrationsbestimmung des Zytokins Interleukin-8 in Zellüberständen, wurden diese in einen IL-8-ELISA-Test (DuoSet) der Firma Genzyme gemessen.

$2,2 \times 10^5$  Zellen wurden pro Ansatz in eine 6-Lochplatte einen Tag vor Versuchsbeginn in 2 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, die Zellen mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für 24 h stimuliert. Die Medienüberstände wurden danach gesammelt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS abgelöst und ihre Zellzahl bestimmt, um am Ende der Messung die Zytokinmenge auf die Zellzahl zu normieren.

Der ELISA-Test wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Verdünnung der Kontroll-Überstände war 1:50, die der stimulierten Zellüberstände 1:1.000.

## **2.9 Transfektionsmethoden**

Alle Kalziumphosphat- und Lipid-vermittelte Transfektionen wurden in 6-Loch-Platten durchgeführt. Hierzu wurden einen Tag vor Transfektion pro Ansatz  $2,25 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Vollmedium ausgesät.

### **2.9.1 Elektroporation**

Bei der Elektroporation werden die Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt, daß durch eine schnelle Entladung eines Kondensators erzeugt wird. Die zytoplasmatische Membran bildet reversible Poren, durch die Fremd-DNA eingeschleust werden kann. Bei dieser Methode, die erstmals Neumann *et al.* (1982) beschrieb, sind die Ladespannung und

die Kapazität des verwendeten Kondensators von Bedeutung, von dem wiederum die Pulslänge und die Feldstärke abhängen.

Die adhärenen Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst, pelletiert (1.200 UpM, 5 min, RT) und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Vollmedium eingestellt. 400  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in eine Elektroporationsküvette (0,4 mm Spaltbreite) überführt und mit DNA versetzt. Parallel dazu wurden Kontrollansätze ohne DNA identischen Bedingungen unterzogen. Bei einer Kapazität von 960  $\mu$ F und Voltstärken von 90 V bis 290 V wurden die Zellen bei RT elektroporiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Pasteurpipette entnommen, in 25 cm<sup>2</sup> Kultuflaschen mit Vollmedium überführt und im Brutschrank kultiviert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen dann mit kaltem PBS abgelöst, ausgezählt bzw. Zellysate hergestellt.

### **2.9.2 Kalziumphosphat-Transfektion**

Die Kalziumphosphat-Transfektion beruht auf der Methode nach Graham *et al.* (1973). Durch Ausbildung eines DNA-Kalziumphosphat-Präzipitats, welches an die Zellmembran adsorbiert, kann Fremd-DNA eingeschleust werden. Dieser Vorgang kann in Anwesenheit von Serum durchgeführt werden. Zusätzlich verhindert das Kalziumphosphat DNase-Verdau der einzuschleusenden DNA. Die gesamte Methode ist extrem pH-Sensitiv, so daß zum einen der pH-Wert des 2x HeBS-Puffers zwischen 7,05 und 7,12 liegen muß. Zum anderen darf bei der Inkubation der Zellen die CO<sub>2</sub>-Zufuhr nicht stark schwanken, um den pH-Wert des Mediums konstant zu halten.

1 h vor Transfektionsbeginn wurde das Medium der Zellen gewechselt (2 ml pro 6-Loch). Pro Transfektionsansatz wurden in einem Polystyrenröhrchen 225  $\mu$ l 2x HeBS, 250  $\mu$ l steriles Wasser und die DNA (ad 20  $\mu$ l) vorgelegt. Dazu wurde tropfenweise und langsam 31,5  $\mu$ l 2M Kalziumchlorid-Lösung zugefügt und durch Inkubation (5 min, RT) eine Präzipitatbildung ermöglicht. Der Ansatz wurde dann mit der Pipette durchmischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 4 h im Brutschrank inkubiert. Das Präzipitat wurde danach durch Waschen (2-3 mal) mit warmen PBS von den Zellen entfernt. Mit frisch zugefügtem Vollmedium wurden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung im Brutschrank kultiviert.

Abweichende Bedingungen bei dieser Transfektionsmethode sind jeweils bei den Experimenten vermerkt.

### 2.9.3 Lipid-vermittelte Transfektion

Die kationische Lipid-vermittelte Transfektion basiert auf der Methode von Felgner *et al.* (1987). Hierbei bindet das polykationische Lipid die negativ geladene DNA, der in der Summe positiv geladene Komplex wechselwirkt mit der Zellmembran über deren Ladung und Zusammensetzung und die DNA kann in die Zelle eingeschleust werden.

Aus der Vielzahl käuflicher liposomaler Transfektionsreagenzien wurde für die vorliegenden Experimente das Dosp<sup>er</sup><sup>®</sup>-Reagenz von der Firma Boehringer Mannheim gewählt.

Gemäß den Herstellerangaben wurde eine Optimierung der Transfektion vorgenommen, die im Ergebnisteil beschrieben ist. Daraus wurde für die transienten und stabilen Transfektionsexperimente von KB-Zellen folgendes Protokoll etabliert:

Vor Transfektionsbeginn wurden die Zellen in den 6-Lochplatten zweimal mit serumfreien Medium gewaschen und mit 1 ml serum- und antibiotikafreien Medium bedeckt.

Die Lösungen A und B wurden vorbereitet, mit der Pipette gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Ansätze 2 h im Brutschrank inkubiert.

Dann wurde 1 ml Vollmedium mit 20 % (v/v) FKS auf die Zellen gegeben und die Zellen erneut im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit der DNA durch frisches Medium ersetzt und die Ansätze bis zur weiteren Verarbeitung im Brutschrank inkubiert.

Lösung A: 0,5-10 µg Plasmid-DNA  
ad 50 µl mit HBS-Puffer

Lösung B: 1-20 µl Dosp<sup>er</sup><sup>®</sup>-Reagenz  
ad 50 µl mit HBS-Puffer

## 2.10 Selektion von Transfektanten

### 2.10.1 Herstellung stabiler Transfektanten-Zellpools

Die Kotransfektion des Resistenzgens Neomycin ermöglichte die Selektion stabil transfizierte Zellpools mit dem Antibiotikum Geneticin (G418). Für KB-Zellen betrug die Selektionskonzentration 600 µg/ml G418. Hierzu wurden 24 h nach Transfektion die

Ansätze 1:14 geteilt, d.h. der Ansatz einer 6-Lochplatte wurde in eine 75 cm<sup>2</sup>- und zwei 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen überführt und mit Vollmedium (enthielt Penicillin / Streptomycin / G418) versetzt. Am Anfang wurde alle 2-3 Tage das Medium erneuert, um die im Überstand befindlichen toten Zellen zu entfernen. Nach etwa zehn Tagen waren einzelne Zellklone erkennbar, die soweit vermehrt wurden (insg. ca. 3 Wochen ab der Selektion), bis sie einen Zellrasen bildeten. Aliquote dieser Zellpools wurden zeitgleich eingefroren und analysiert (Überexpressions-Kontrolle des entsprechenden Proteins im *Western-Blot*). Nach der Selektion von Pools erfolgte die Erhaltungs-Kultivierung in Vollmedium mit 300 µg/ml G418.

## **2.10.2 Einzelzellklonierung von Transfektanten**

Da die erhaltenen Pools eine gemischte Zellpopulation darstellten, wurden zur Erzeugung von Einzelzellklonen zwei verschiedene Methoden angewandt.

### 2.10.2.1 Einzelzellklone mit Hilfe von Klonierungs-Ringen

Klonierungs-Ringe aus Glas ermöglichten das Abgrenzen von einzelnen Zellklonen in der Gesamtpopulation. Nach dem Abtrypsinisieren der Zellklone und anschließende Kultivierung in Lochplatten, konnten Klone erzeugt und analysiert werden.

Um möglichst viele klar definierte Zellklone zu erhalten, ist es bei dieser Methode wichtig, die Zellklone zu picken, wenn sie noch vereinzelt sind.

### 2.10.2.2 Einzelzellklone mit Hilfe des *Limiting Dilution* Verfahrens

Zur Erzeugung von Einzelzellklonen aus einem positiven Zellpool wurde dieser so stark verdünnt, daß statistisch einzelne Zellen vorlagen (sog. *Limiting Dilution* Verfahren).

Es wurden Zellen aus den Pools in einer Dichte von 0,1 Z/Loch und 0,5 Z/Loch in 100 µl konditioniertem Medium (Vollmedium ohne G418 und sterilfiltrierter Medienüberstand kultivierter Zellen im Verhältnis 1:2) auf 96-Lochplatten ausgesät. Die Vorverdünnung der Zellen war zuerst 1:20, anschließend 1:80, daraus wurde dann die entsprechende Zellmenge für eine 96-Lochplatte eingesetzt (8 Zellen pro 8 ml bzw. 40 Zellen pro 8 ml).

Die nach 4 bis 6 Wochen herangewachsenen Einzelzellklone wurden soweit passagiert und kultiviert, bis genügend Zellen zur Expressionskontrolle und zum Einfrieren vorhanden waren.

Die Erhaltungs-Kultivierung der Einzelzellklone erfolgte in Vollmedium ohne Zusatz von G418.

## 2.11 Expression von Reporter-gen-Konstrukten

### 2.11.1 Verwendete Vektoren

#### 2.11.1.1 pBHEluc

Der pBHEluc-Vektor (4652 bp) kodiert für das Reporter-gen Luziferase unter der Kontrolle eines SV40 Promotors. Für die Selektion in *E. coli* besitzt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen.

#### 2.11.1.2 pcDNA3.1/His B/lacZ

Dieser 8,6 kbp große Vektor kodiert unter der Kontrolle eines CMV-Promotors das Reporter-gen  $\beta$ -Galaktosidase. Es besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in *E. coli* und ein Neomycinresistenzgen für die eukaryontische Selektion.

#### 2.11.1.3 pNF $\kappa$ B-Luc

Bei diesem 5674 bp großen Vektor wird die Expression des Reporter-gens Luziferase über ein synthetisches Transkriptions-Kontrollelement reguliert. Das Verstärker-Element ist eine NF $\kappa$ B-DNA-Bindungssequenz in fünffacher Wiederholung, daran schließt sich die TATA-Box an. Für die Selektion in *E. coli* besitzt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen.

Bindungssequenz des Verstärkerelements: (T GGGGACTTCC GC)<sub>5</sub>

#### 2.11.1.4 puhc133IL8promotorluc

Dieser 4863 bp große Vektor kodiert unter der Kontrolle eines minimalen IL8-Promotors das Reporter-gen Luziferase. Der minimale IL-8 Promotor enthält drei DNA-Bindungs-element mit folgender Sequenz:

AP-1:	TGACTCA
NF-IL6 (C/EBP):	CAGTTGCAAATCGT
NFκB:	GGAATTCCTC

### **2.11.2 Transfektionsbedingungen**

#### 2.11.2.1 Zur Optimierung von Transfektionen

Um die optimalen Transfektionsbedingungen für die verwendeten Zelllinien zu finden, wurden 1-10 µg Reporter-gen-Plasmid transfiziert. Die jeweiligen Bedingungen richteten sich nach der Transfektionsmethode und sind jeweils im entsprechenden Kapitel genannt.

#### 2.11.2.2 Etabliertes Standardprotokoll für die Transfektion von KB-Zellen

Alle transienten und stabilen Transfektionen wurden mit Hilfe des polykationischen Lipides Dosp<sup>er</sup>® (Firma Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die Bedingungen sind in Kapitel 2.9.3 (Seite 42) aufgeführt.

### **2.11.3 Präparation zytosolischer Extrakte**

In Abhängigkeit von den Experimenten erfolgte die Lyse der transient transfizierten Zellen 24-72 h nach Transfektionsbeginn.

Nach vollständigem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit kaltem PBS bei 4 °C abgelöst, pelletiert (1.200 UpM, 5 min, 4 °C) und in 125 µl Luziferase-Lysereagenz pro Transfektionsansatz resuspendiert. Die Zellen wurden durch kräftiges Vortexen und Inkubation auf Eis aufgeschlossen. Eine anschließende Zentrifugation (13.000 x g, 10 min, 4 °C) trennte die zytosolische Fraktion von Zellkern, DNA, etc. ab. Bis zur Messung der Reporter-genaktivität wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

#### 2.11.4 Messung der Luziferase-Aktivität

Zum Nachweis der Luziferase-Aktivität wurde die bei der enzymatischen Luziferin-Luziferase-Reaktion entstehende Chemilumineszenz direkt in einem Luminometer gemessen. Dazu wurden 20  $\mu$ l Probelysate in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, in das Luminometer gestellt und die Reaktion gestartet. Das Gerät injizierte 100  $\mu$ l Luziferase-Meßreagenz und maß nach einer Verzögerungszeit von 10 sec für 10 sec die erzeugten Lichtquanten über einen *Photomultiplier* (380-630 nm). Die Proben wurden in Doppelwerten gemessen und gemittelt.

#### 2.11.5 Histochemischer Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase (X-Gal-Färbung)

Zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase auf Einzelzellebene wurden die transfizierten Zellen zunächst mit warmem PBS gewaschen, mit X-Gal-Fixierlösung bedeckt und für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Fixierer von den Zellen mit kaltem PBS heruntergewaschen und die X-Gal-Färbelösung zugesetzt. Nach Inkubation der Zellen bei 37 °C für 4 - 24 h konnten die positiv transfizierten blauen Zellen im Lichtmikroskop ausgezählt und fotografiert werden.

### 2.12 Expression der p54SAPK $\beta$ -Konstrukte

Die Klonierung und Mutagenese der p54 SAP Kinase  $\beta$  erfolgte in der Arbeitsgruppe Dr. M. Kracht nach folgender Strategie. Mit Hilfe zweier spezifischer *Primer* wurde zuerst die cDNA amplifiziert, wobei gleichzeitig an den Enden des offenen Leserasters (*Open Reading Frame*, ORF) *Bam*H1-Restriktionsschnittstellen für die Klonierung eingeführt wurden. Als *Template* diente das Expressionsplasmid pGEXKGSAPK $\beta$ . Das so entstandene p54SAPK $\beta$ -Wildtyp (wt)-Fragment konnte direkt in die Klonierungen eingesetzt werden.

Zur Einführung einer Punktmutation in der Subdomäne II der katalytischen Domäne (Lysin (K) 55 gegen Arginin (R)), wurde durch die überlappende *Primer*-PCR-Methode (*site directed mutagenesis*) mit Pfu-Polymerase, mutagenen *Primern* und dem p54SAPK $\beta$ -wt-Fragment als *Template*, das *Insert* p54SAPK $\beta$ (K-R)-Mutante (mut) für die Klonierung

hergestellt. Zusätzlich zum Austausch der Aminosäure Lysin gegen Arginin wurde eine neue *NruI*-Restriktionsschnittstelle im ORF erzeugt, die zum Nachweis der erfolgreich eingeführten Mutation diene.

Die generierten *Inserts* (Wildtyp (wt) und Mutante (mut)) wurden anschließend über die *BamH1*-Restriktionsschnittstellen in die entsprechenden eukaryontischen Expressionsplasmide nach Standardprotokoll kloniert, wobei die Mutante sowohl in sense (s)- als auch in antisense (as)-Richtung integriert wurde. Verwendet wurden zwei Vektoren, pcDNA3 und peVRF0 mit HA- bzw. HA/His-tag carboxyterminal von der *BamH1*-Schnittstelle. Die Sequenzbereiche der Klonierung sind im Anhang aufgeführt.

## 2.12.1 pcDNA3-p54SAPK $\beta$ -Konstrukte

### 2.12.1.1 pcDNA3

Der pcDNA3-Leervektor (5,4 kbp) besitzt eine multiple Klonierungsstelle (mit *BamH1*-Schnittstelle) und das Neomycinresistenzgen des Transposons 5 (Tn5). Der *Polylinker* steht unter der Kontrolle eines hCMV-Promotors, dagegen steht das Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Zur Selektion in *E. coli* besitzt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen.

### 2.12.1.2 pcDNA3-p54SAPK $\beta$ Wildtyp und Mutante

Bei der Klonierung der p54SAPK $\beta$ (K-R) (mut sense) in den pcDNA3-Vektor, wurden immer mehrere bakterielle Klone generiert. Nur einer davon wurde für die Plasmid-Präparation verwendet, noch einmal kontrolliert und dann in den Transfektionen eingesetzt.

pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R)mut (sense) Klon 19

pcDNA3-p54SAPK $\beta$ wt (hier existiert nur ein Klon)

## 2.12.2 peVRF0HA- bzw. HA/His-p54SAPK $\beta$ -Konstrukte

### 2.12.2.1 peVRF0HA bzw. HA/His

Der 4,5 kbp große Leervektor peVRF0HA bzw. HA/His ((Matthias *et al.*, 1989) besitzt eine kleine multiple Klonierungsstelle unter der Kontrolle eines hCMV-Promotors. Direkt hinter dem Promotor ist die Translations-Initiationssequenz aus dem HSV Thymidin-Kinase Gen. Hinter der *Bam*H1-Schnittstelle befindet sich die Sequenz eines Hämagglutinin-*tags* bzw. das eines gekoppelten Hämagglutinin-6xHistidin-*tags*. Dies ermöglicht die Expression eines carboxyterminalen Fusionsanteiles nach Klonierung in die *Bam*H1-Position.

Ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht die selektive Anzucht in *E. coli*.

### 2.12.2.2 peVRF0HA- bzw. HA/His-p54SAPK $\beta$ -Konstrukte

Aus der Klonierung der erzeugten wt- und mut-Fragmente in die peVRF0-Vektoren mit den HA bzw. HA/His-tag, wurde eine Vielzahl positiver bakterieller Klone generiert. Die in der Arbeit verwendete Plasmid-DNA und deren *E. coli*-Klon sind im Folgenden aufgelistet:

peVRF0- HA-p54SAPK $\beta$  wt (sense) Klon 1

HA/His-p54SAPK $\beta$  wt (sense) Klon 4

HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) mut (sense) Klon 5

HA/His-p54SAPK $\beta$ (K-R) mut (sense) Klon 4

HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) as mut Klon 4

HA/His-p54SAPK $\beta$ (K-R) as mut Klon 1

### 3 Ergebnisse

Zentrale Zielsetzung dieser Arbeit war die Rolle der SAPK/JNK's in der IL-1 induzierten Signaltransduktion zu untersuchen, mit der Intention, Erkenntnisse über die Genregulation und eventuelle Wechselwirkungen mit anderen Signalkaskaden zu erlangen. Als Modellsystem wurde die humane epidermale Karzinomazelllinie KB verwendet, da bei dieser nach IL-1 Stimulation v.a. SAP Kinasen/JNK's nachweislich aktiviert und acht Gene (c-Jun, JunB, IL-6, IL-8, MKP-1, ICAM-1, COX-2) massiv induziert, sowie reguliert werden (Gould *et al.*, 1996; Grewe *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1989 und 1991; Kracht *et al.*, 1994; Krutmann *et al.*, 1990).

Zur Untersuchung der Bedeutung des SAP Kinaseweges sollte dieser mit Hilfe zweier molekularbiologischer Methoden stark beeinflusst werden. Zum einen sollte eine Kinase-inaktive JNK-Isoform stabil überexprimiert werden, um die endogene aktive Kinasemenge zu reduzieren. Zum anderen sollte antisense-RNA stabil überexprimiert werden, um die Genexpression der endogenen JNK's zu unterdrücken. Diese Methoden wurden schon erfolgreich bei der Aufklärung der Signaltransduktionswege der MAPKK (Seger *et al.*, 1994) und der ERK's (Pages *et al.*, 1993) eingesetzt.

Die Erzeugung einer inaktiven Kinase setzt das Wissen über ihre katalytische Domäne voraus. Bei der Familie der Protein-Serin/Threonin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Kinasen konnten durch Sequenz-Homologie-Vergleiche elf hochkonservierte Regionen identifiziert werden, die bei der ATP-Bindung und dem Phospho-Transfer eine Rolle spielen (Hanks *et al.*, 1988). Insbesondere die Subdomäne II mit ihrem konservierten Motiv Ala-X-Lys (X stellt eine beliebige Aminosäure dar) ist sehr gut charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß der Austausch des Lysins gegen andere Aminosäuren, einschließlich Arginin, zum Verlust der Kinaseaktivität führen (Hanks *et al.*, 1988). Somit scheint dieses Lysin direkt in dem Transfer des Phosphatrestes involviert zu sein, es könnte z.B. den Protonentransfer übermitteln (Kamps und Sefton, 1986).

Bei der Überexpression von antisense-RNA ist aus der Literatur bekannt, daß große Mengen der vollständigen antisense-RNA ausreichen, um die endogene Genexpression

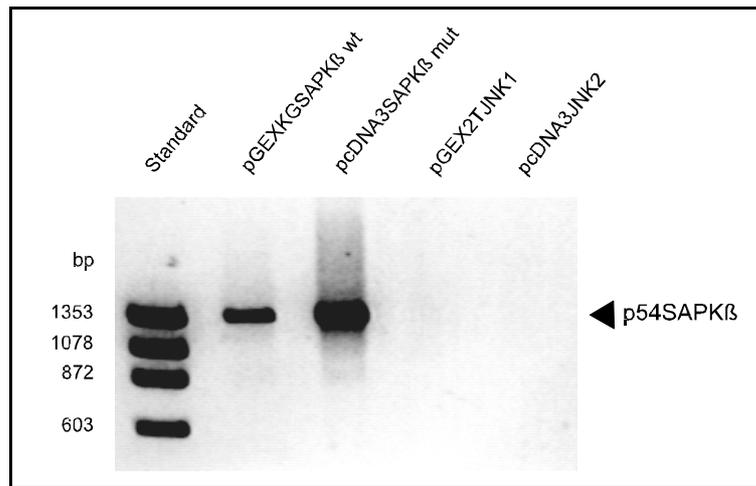
stark zu vermindern (Crooke und Bennett, 1996; Izant und Weintraub, 1984 und 1985; Robinson-Benion *et al.*, 1995). Es kann sowohl die Transkription als auch die Translation des endogenen Gens beeinflusst werden, wobei die gesamten Mechanismen dieser Inhibition bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind, insbesondere die in Eukaryonten (Curcio *et al.*, 1997; Bejarano und Lichtenstein, 1992). Ein gut charakterisierter Effekt der überexprimierten antisense-RNA ist ihre Hybridisierung mit komplementärer endogener RNA. Die gebildete dsRNA wird von RNase abgebaut (Walder und Walder, 1988).

Für die vorliegende Arbeit wurde die p54 SAPK $\beta$  Kinase, die auf Aminosäureebene identisch ist mit JNK3  $\alpha$ 2 (siehe Tab. 1.1, Seite 7), in der katalytischen Subdomäne II durch Austausch der Aminosäure Lysin (K) gegen Arginin (R) (Position 55) mutiert. Zusätzlich wurde gleichzeitig eine neue *Nru*I Restriktionsschnittstelle eingeführt (Position 46-51), um die Punktmutation nachzuweisen. Nach Klonierung des mutierten *Inserts* in ein prokaryontisches Expressionsplasmid (pGEXKG) konnte ein funktionelles Protein in *E. coli* exprimiert werden, welches nur eine minimale Kinaseaktivität im *in vitro* Kinase-Assay aufwies (M. Kracht, unveröffentlichte Daten). Die Sequenz der Kinase-Mutante, sowie der Wildtyp als auch die Mutante in antisense-Orientierung wurden in zwei verschiedene eukaryontische Expressionsplasmide, dem pcDNA3-Vektor und dem pVRF0HA(His)-Vektor, einkloniert. Die Einführung der Mutation und die Herstellung aller Konstrukte wurde von der Arbeitsgruppe Dr. M. Kracht durchgeführt und ist detaillierter im Kapitel 2.12 (Seite 46) beschrieben.

Die Abbildung auf der nächsten Seite liefert einen Überblick über die pcDNA3-p54SAPK $\beta$ -Konstrukte (Wildtyp und mutierte Form), wobei die relevanten Sequenzen gekennzeichnet sind. Die ausführliche Sequenz befindet sich im Anhang. Über dem Kasten und in ihm sieht man die konservierte Region der Subdomäne II (VAIKK), und deren Punktmutation (K $\rightarrow$ R).

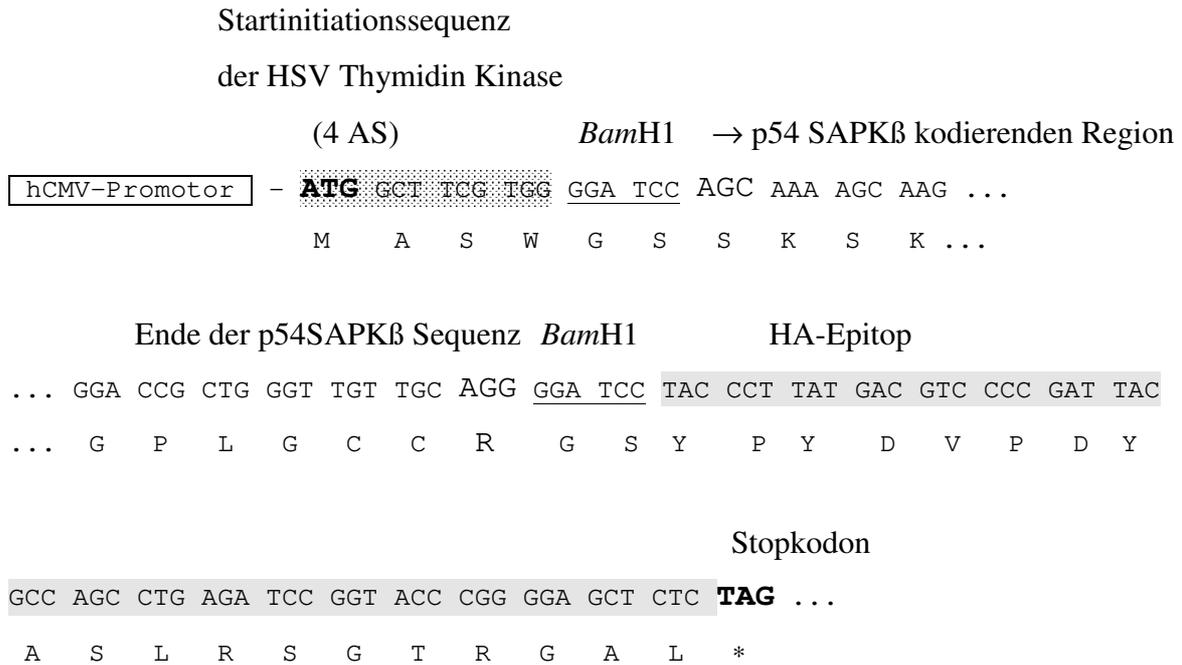


Ausgangsplasmid (pGEXKGSAPK $\beta$  wt), welches die gesamte cDNA von p54SAPK $\beta$  beinhaltet, sowie das klonierte pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Mutanten (mut) Plasmid eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten zwei weitere Plasmide mit den cDNA-Sequenzen von JNK1 und JNK2. In der Abbildung sieht man das spezifisch amplifizierte 1331 bp große p54SAPK $\beta$ -Fragment.



**Abb. 3.2: Nachweis der Primerspezifität von SAPKBS346 und SAPKBA1661**

Im direkten Vergleich zur vorigen Sequenz (Abb. 3.1) zeigt die nächste Abbildung einen Sequenzausschnitt aus dem Klonierungsbereich des peVRF0HA-p54SAPK $\beta$  (wt und mut)-Konstruktes. Der Beginn und das Ende der kodierenden p54SAPK $\beta$  Region ist eingezeichnet, die gesamte kodierende Sequenz befindet sich im Anhang. Im Gegensatz zu den pcDNA3-Konstrukten besitzen diese Expressionsplasmide carboxyterminal ein HA-Epitop (siehe Abbildung) bzw. ein HA/His-Epitop (nicht dargestellt). Des weiteren besteht die Startinitiationssequenz aus den ersten vier Aminosäuren der HSV Thymidin Kinase.



**Abb. 3.3: Sequenzausschnitt von peVRF0HA-p54SAPKβ wt und mut**

Bei der Verwendung von Expressionsplasmiden mit dem mutierten Fragment in antisense Orientierung wird p54SAPKβ(K-R) antisense-mRNA überexprimiert, welche durch seine hohe Homologie zu allen endogenen JNK-Isoformen, mit allen JNK-mRNA's hybridisieren kann. Gleichzeitig kann die antisense-mRNA auch bis zum Stopkodon translatiert werden und es entsteht ein kurzes Peptid folgender Sequenz:

5'- ATG GCT TCG TGG GGA TCC CCT AGA GTC CGA CCG CAT TAG -3'  
 Met Ala Ser Trp Gly Ser Pro Arg Val Arg Pro His \*

Obwohl dieses kurze Peptid bei der Überexpression in den Zellen angereichert werden kann, haben wir keine Hinweise gefunden, daß es ein toxisches Produkt darstellt und Einfluß auf die Zellphysiologie nimmt.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Überexpression der vorhandenen Expressionsplasmide in der als Modell gewählten KB-Zelllinie, war die erfolgreiche Transfektion. Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden Reportergenkonstrukte verwendet.

Die verwendeten molekularbiologischen Ansätze sollten die endogene Kinasemenge beeinflussen. Die Detektion auf Proteinebene erforderte einen geeigneten Antikörper.

Nach erfolgreicher Überexpression (transient oder stabil) der verwendeten p54SAPK $\beta$ (K-R)-Mutante (sense oder antisense) und dem Nachweis der verminderten endogenen JNK-Aktivität, konnte zuletzt eine Analyse der Genexpression im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen durchgeführt werden.

### 3.1 Darstellung verschiedener Transfektionsmethoden und ihre Optimierung

Die Effizienz einer DNA-Transfektion hängt von vielen Faktoren ab. Entscheidend sind dabei die zu transfizierende DNA und Zelllinie, sowie die Transfektionsmethode.

Bei der Plasmid-DNA spielt deren Größe und Qualität eine Rolle. Ebenso wirken sich Verunreinigungen durch RNA, Proteine (v.a. Lipopolysaccharide aus der prokaryontischen Aufarbeitung) und andere Chemikalien nachteilig auf die Transfektionseffizienz aus. Dagegen ist ein hoher superhelikaler Anteil in der Plasmid-DNA vorteilhaft. Bei den durchgeführten Transfektionen wurden Plasmide zwischen 4 und 7 kbp transfiziert, die alle mit Hilfe des Qiagen-DNA-Extraktions-Kits aufgereinigt wurden. Diese DNA hatte einen hohen superhelikalen Anteil mit nur geringen Verunreinigungen.

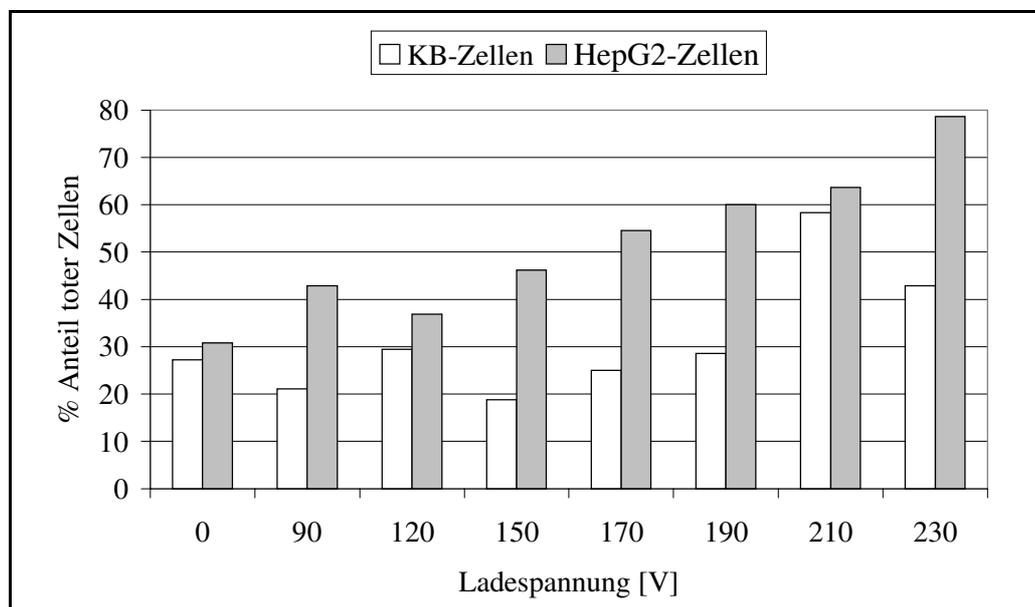
Die epidermale Karzinomazelllinie KB stellte das Modellsystem für die Aufgabenstellung dar. Zur Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode für diese Zelllinie wurden drei häufig verwendete Verfahren (Elektroporation, Kalziumphosphat-Transfektion, Lipid-vermittelte Transfektion) miteinander verglichen. In der Literatur ist die KB-Zelllinie, aufgrund ihrer geringen Transfektionseffizienz, für transiente Experimente kaum erwähnt (Johnson, 1996; Kotani *et al.*, 1995; Ponnazhagan *et al.*, 1995). Vorteilhafter scheint deshalb die Generierung stabiler KB-Linien, wobei auch diese in der Literatur nur von wenigen Arbeitsgruppen beschrieben werden (Luhrs *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1994; Ohga *et al.*, 1996; Ohmori *et al.*, 1992).

Zum direkten Vergleich wurden bei den Experimenten andere Zelllinien (HeLa, HEK293) verwendet, die in der Literatur für die verschiedensten Transfektionsexperimente erfolgreich eingesetzt wurden.

Die häufig verwendeten Transfektionsmethoden Elektroporation, die Kalziumphosphat-Transfektion und die über Lipide vermittelte Transfektion, wurden getestet und sind im Folgenden dargestellt.

### 3.1.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation sind die Ladespannung und die Kapazität des verwendeten Kondensators, von denen wiederum die Pulslänge und die Feldstärke des bei der Entladung erzeugten Feldes abhängt, von Bedeutung. Bei einer Kondensator-Kapazität von  $960 \mu\text{F}$  wurden zur Optimierung  $1,5\text{-}2 \times 10^6$  Zellen in  $400 \mu\text{l}$  PBS, Medium (ohne FKS und Antibiotika) bzw. Vollmedium bei verschiedenen Ladespannungen ohne DNA elektroporiert. Es wurden sowohl KB-Zellen als auch HepG2-Zellen eingesetzt. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen abgelöst, mit Trypanblau gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach einer empirisch aufgestellten Regel gilt, daß man die besten Transfektionsergebnisse erzielt, wenn 50 % bis 80 % der Zellen absterben (Andreason, 1988).



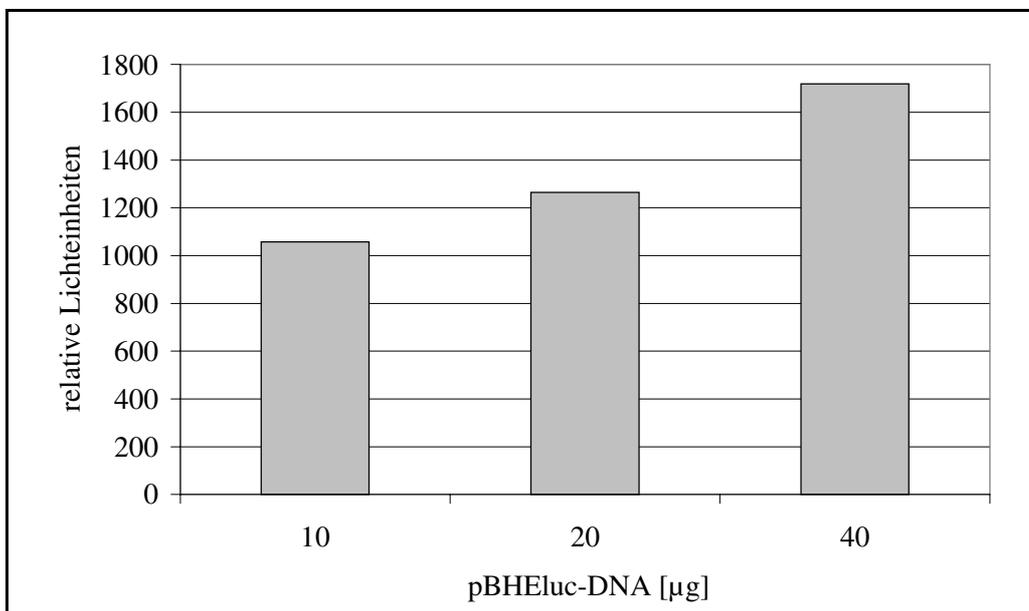
**Abb. 3.4: Variation der Elektroporationsbedingungen**

Die in Abb. 3.4 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß über 50 % tote KB-Zellen bei einer Ladespannung von 210 V erzeugt werden. Dagegen sind HepG2-Zellen wesentlich empfindlicher; zur Erzeugung einer 50 %igen Sterberate reicht schon eine geringere Lade-

spannung (170 V) aus. Die Kontrollergebnisse mit 0 Volt Ladespannung zeigen, daß alleine das Herauspipettieren aus der Elektroporationsküvette mit anschließender Kultivation der Zellen bis zu 30 % der Zellen absterben läßt.

Bei der Variation des Elektroporationsmediums (PBS, DMEM ohne/mit FKS, Antibiotika) zeigten sich keine Einflüsse auf die Sterberate der Zellen (nicht dargestellt), so daß alle nachfolgenden Elektroporations-Experimente im Vollmedium durchgeführt wurden.

Zur quantitativen Bewertung der Transfektionseffizienz wurde das Reportergenkonstrukt pBHEluc in verschiedenen Konzentrationen elektroporiert. 24 h nach Transfektion wurden zytosolische Extrakte hergestellt und deren Luziferase-Aktivität im Luminometer gemessen. Man erkennt in Abb. 3.5 eine nur geringe Zunahme der exprimierten Luziferase mit steigender DNA-Menge, es zeigt sich aber nicht das zu erwartende lineare Verhältnis, bei dem eine Verdoppelung der transfizierten DNA-Menge zum korrelierenden Anstieg der exprimierten Luziferase führt. Trotz der hohen Plasmid-Mengen (10 bis 40 µg) wurde in die KB-Zellen, im Vergleich zu HeLa-Zellen (siehe Tab. 3.1), nur sehr wenig Plasmid erfolgreich elektroporiert und damit auch exprimiert.



**Abb. 3.5: Variation der DNA-Menge bei der Elektroporation von KB-Zellen**  
Elektroporation von KB-Zellen mit 960 µF und 210 V mit variablen pBHEluc-DNA-Mengen

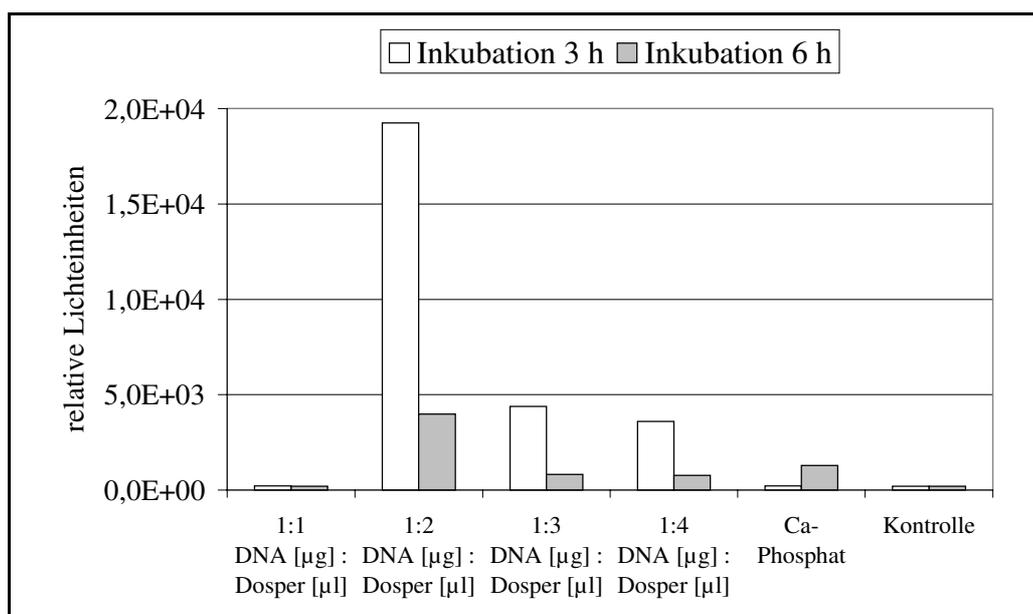
### 3.1.2 Kalziumphosphat-Transfektion

Bei KB-Zellen war es nicht gelungen pBHEluc-Plasmid-DNA mit Hilfe von Kalziumphosphat-Präzipitaten nach Standardmethode (siehe 2.9.2, Seite 41) einzuschleusen. Der Vergleich mit der leicht transfizierbaren HEK293-Zelllinie zeigte, daß die Methode funktionierte, die KB-Zelllinie für diese Transfektion aber nicht geeignet ist. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 zusammengefaßt.

### 3.1.3 Lipid-vermittelte Transfektion mit Dospers<sup>®</sup>

Bei der Transfektion mit dem polykationischen Lipid Dospers<sup>®</sup> sind mehrere Parameter von Bedeutung. Das DNA-Lipid-Verhältnis entscheidet über die Komplexbildung. Die Zelldichte und die Inkubationszeit des Gemisches auf den Zellen hat Einfluß auf die Aufnahme und spielt auch eine Rolle bei der Toxizität des Lipides auf die Zellen.

Bei allen Experimenten wurden 24 h vor Transfektionsbeginn pro Ansatz  $2,25 \times 10^5$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen bildeten zum Transfektionszeitpunkt keinen geschlossenen Zellverband, so daß eine große Zelloberfläche zur Aufnahme der DNA vorhanden war. Um eine nachteilige Wechselwirkung von FKS mit dem Lipid zu vermeiden, wurde der Komplex im serumfreien Medium inkubiert.



**Abb. 3.6: Transfektion von KB-Zellen mit Dospers<sup>®</sup>**

Es wurden je 2 µg pBHEluc-DNA transfiziert, die Inkubationszeiten des DNA-Dospers<sup>®</sup> Gemisches auf den Zellen variierten zwischen 3 h und 6 h.

Um das optimale DNA-Dosper<sup>®</sup>-Verhältnis und eine ideale Inkubationszeit zu erhalten, wurden 2 µg pBHEluc-DNA transfiziert. Das Ergebnis, in Abb. 3.6 dargestellt, zeigt die signifikant höchste Luziferase-Aktivität bei einem Verhältnis von 1:2 und einer dreistündigen Inkubationszeit.

### 3.1.4 Vergleich aller verwendeten Transfektionsmethoden

Ziel war es, eine geeignete Transfektionsmethode für die KB-Zelllinie zu finden. Ein Vergleich aller drei getesteten Methoden an dieser Zelllinie und Kontrollen mit anderen Linien zeigte, daß die Lipid-vermittelte Transfektion mit Dosper<sup>®</sup> für KB-Zellen die geeignetste Methode darstellt. Die folgende Tabelle gibt einen zusammenfassenden Überblick der Ergebnisse.

Transfektionsart	Elektroporation	Dosper <sup>®</sup> -Transfektion	Kalziumphosphat-Transfektion
DNA-Menge	10 µg pBHEluc	2 µg pBHEluc	2 µg pBHEluc
KB-Zellen	1.057 rel. LE	252.841 rel. LE	1.291 rel. LE
HeLa-Zellen	13.214 rel. LE	133.116 rel. LE	n. g.
HEK293-Zellen	n. g.	608.089 rel. LE	2.295.990 rel. LE

**Tab. 3.1: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden**

n. g.: nicht gemessen; rel. LE: relative Lichteinheiten

### 3.1.5 Nachweis der Expression auf Einzelzellebene nach transienter Transfektion

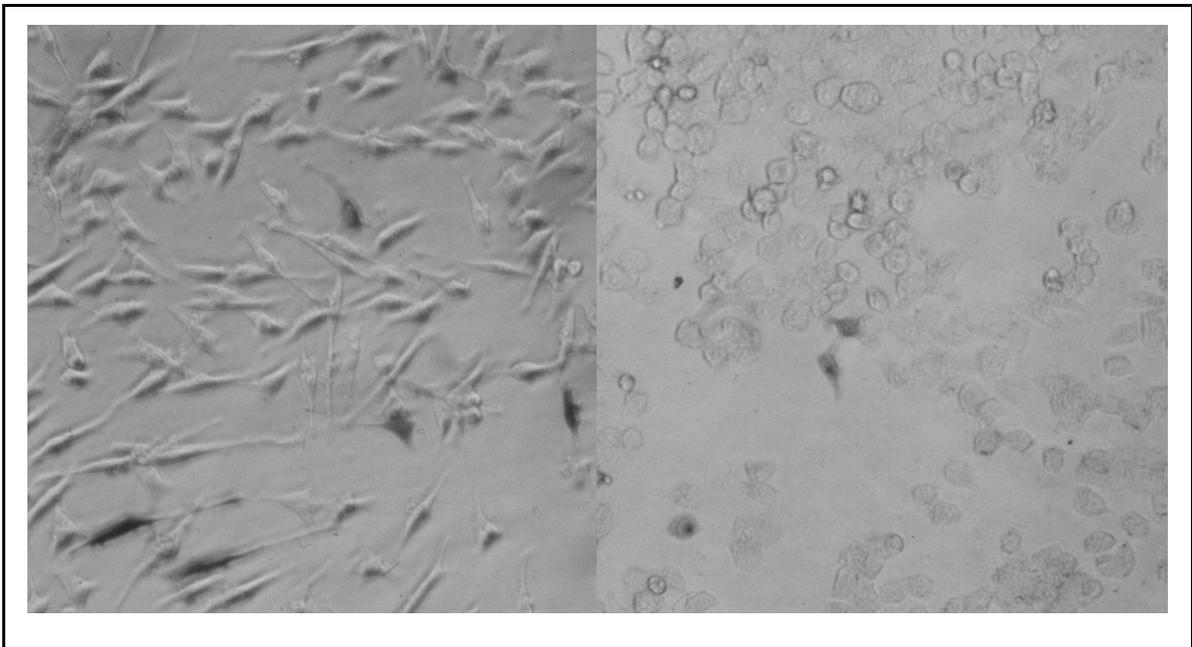
Der Nachweis eines Reporterproduktes im Ganzzellextrakt läßt quantitative Vergleiche zu, aber läßt keine Rückschlüsse zu über die tatsächliche Anzahl der Zellen, die das Protein exprimieren und folglich transfiziert wurden. Mit der histochemischen Färbung der  $\beta$ -Galaktosidase (X-Gal-Färbung) besteht die Möglichkeit des Nachweises in fixierten

Zellen, nachdem sie mit einem *lacZ*-Genkonstrukt transfiziert wurden. Dieser Nachweis hat eine geringere Sensitivität im Vergleich zum photometrischen  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis, ermöglicht aber quantitative Vergleiche mit anderen Zelllinien.

Nach Transfektion von KB-, HEK293- und HeLa-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1/HisB/*lacZ* (3  $\mu$ g), wurde die  $\beta$ -Galaktosidase 24 h nach Transfektion histochemisch nachgewiesen. Durch Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop konnte die Transfektionseffizienz abgeschätzt werden. Sie betrug bei KB-Zellen ca. 1-5 %, bei HeLa-Zellen ca. 10 % und bei HEK293-Zellen bis zu 50 %.

(A)

(B)



**Abb. 3.7: Histochemischer Nachweis exprimierter  $\beta$ -Galaktosidase auf Einzelzellebenen**

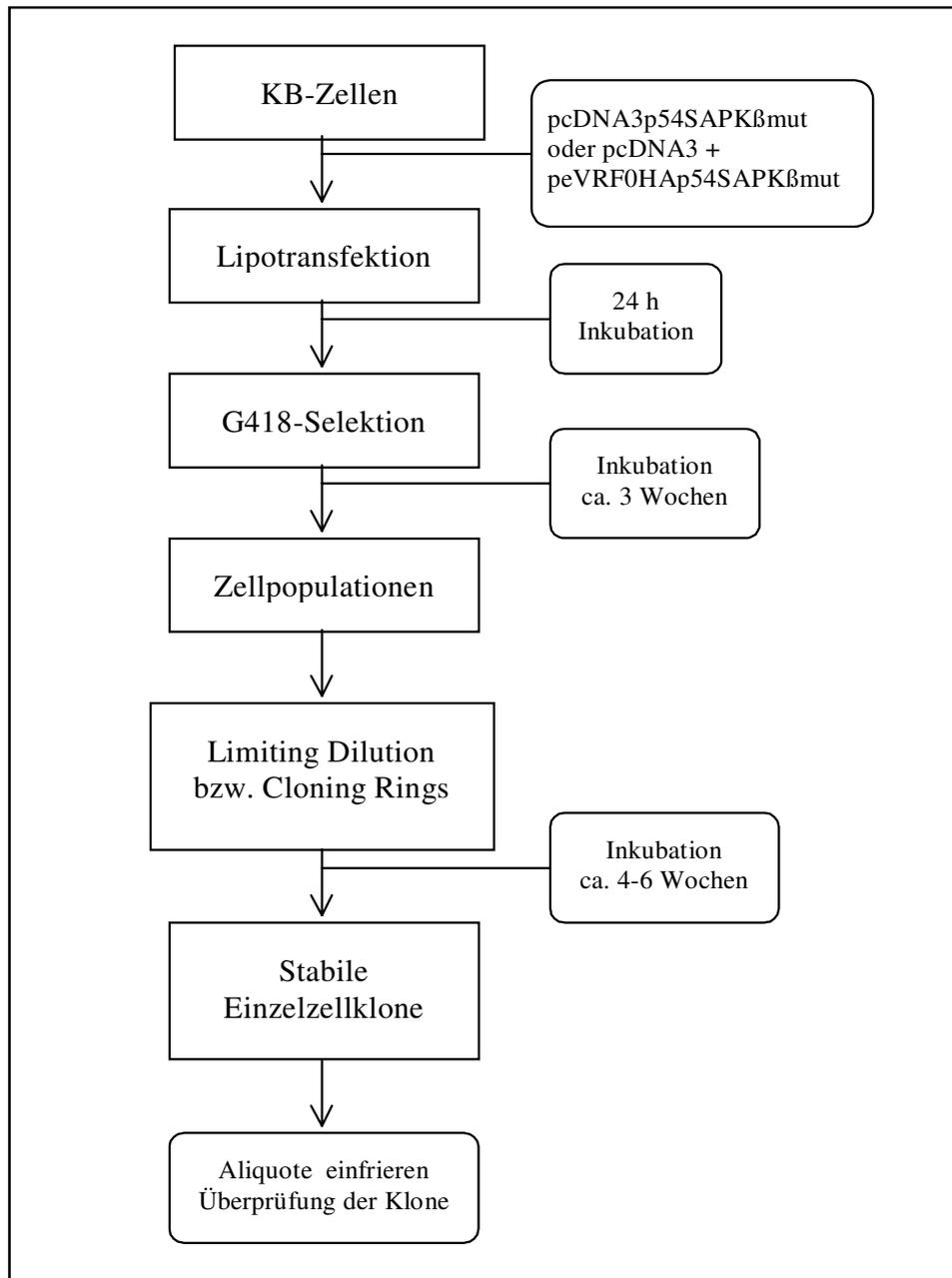
**(A) HeLa-Zellen, (B) KB-Zellen**

Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung.

Transiente Transfektion von je 3  $\mu$ g pcDNA3.1/His B/*lacZ* mit Dospers<sup>®</sup>. X-Gal-Färbung 24 h nach Transfektion.

### **3.2 Experimentelles Vorgehen zur Erzeugung stabiler Transfektanten**

Wie der Vergleich der verschiedenen Transfektionsmethoden gezeigt hatte, ist die Transfektionseffizienz für KB-Zellen relativ niedrig. Bei transienten Experimenten exprimiert deshalb nur ein Bruchteil der Gesamtpopulation das Fremdprotein. Da bei der vorliegenden Arbeit neben den endogenen JNK-Proteinen die Kinase-inaktive p54SAPK $\beta$ (K-R) Mutante bzw. deren antisense-RNA überexprimiert werden sollte, waren transiente Experimente nicht geeignet. Zur Erzeugung von stabilen Zelllinien mit integrierter p54SAPK $\beta$ (K-R)(sense bzw. antisense)-DNA, wurde das Neomycinresistenzgen kotransfiziert. Dies ermöglichte die Selektion der Transfektanten. Das Schema auf der nächsten Seite zeigt die Strategie der Vorgehensweise.



**Abb. 3.8: Transfektionsstrategie**

Die dafür benötigten Methoden wurden etabliert und sind im Material- und Methodenteil, sowie im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

### 3.2.1 Optimierung der Selektionsbedingungen (Titration von G418)

Durch Kotransfektion eines Antibiotikaresistenzgens und anschließender Selektion, ist es möglich, stabile Transfektanten zu erhalten. Dazu wurde das Neomycinresistenzgen

benutzt, welches auf dem pcDNA3-Vektor ist. Durch Selektion mit dem Antibiotikum G418 konnten dadurch transfizierte von nicht transfizierten Zellen getrennt werden.

Die optimale Antibiotikakonzentration hängt von der verwendeten Zelllinie ab, daher wurden  $1 \times 10^4$  nicht transfizierte KB-Zellen in 12-Loch-Platten ausgesät und einen Tag später mit 0 bis 1000  $\mu\text{g/ml}$  G418 versetzt. Die Titration erfolgte in 100  $\mu\text{g/ml}$  Schritten. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Die Vitalität der Zellen wurde nach zwölf Tagen durch Methylenblau-Färbung und einer mikroskopischen Auszählung ermittelt. Quantitativ konnte festgestellt werden, daß KB-Zellen ab 200  $\mu\text{g/ml}$  G418 in der Proliferation beeinflusst wurden, ab 400  $\mu\text{g/ml}$  gab es keine überlebenden Zellen mehr. Deswegen wurde für die Selektion der Transfektanten die Konzentration von 600  $\mu\text{g/ml}$  G418 ausgewählt, für die Erhaltung von stabil transfizierten Zellpools 300  $\mu\text{g/ml}$  G418.

### **3.3 Detektion von endogenen JNK-Proteinen in verschiedenen Zellkompartimenten mit Hilfe des Antikörpers Ab681**

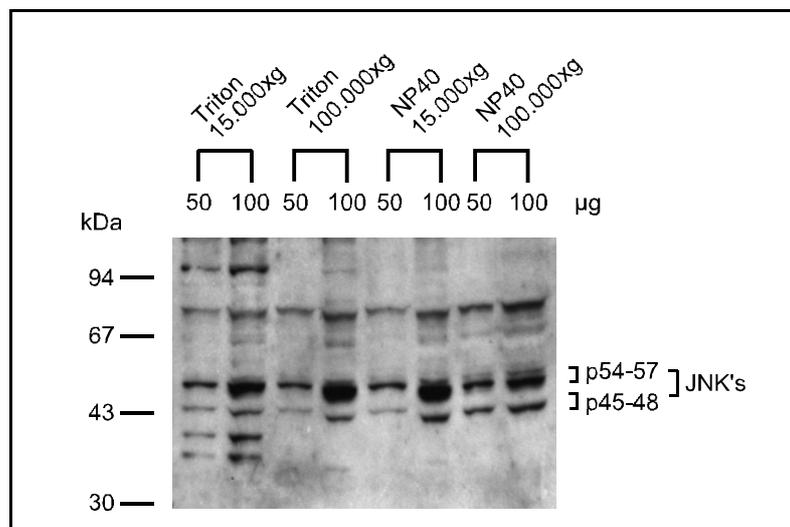
Ausgehend von drei JNK-Genen (JNK1, JNK2, JNK3) sind zehn JNK-Protein-Isoformen im menschlichen Gehirn nachgewiesen worden (Gupta *et al.*, 1996). Zur Unterscheidung dieser Isoformen wären spezifische Antikörper nötig, die bisher aufgrund der hohen Homologie aber nicht vorliegen. Die in der Ratte vorkommenden fünf beschriebenen p54SAPK-Isoformen sind auf Proteinebene identisch mit den humanen Isoformen (siehe Tab. 1.1, Seite 7).

Um, wie angestrebt, auf Proteinebene die transfizierte und überexprimierte p54SAPK $\beta$ -Isoform der Ratte in humanen KB-Zellen nachzuweisen, mußte zunächst die Zelllinie auf ihre endogene Expression von JNK-Proteinen untersucht werden. Dies war möglich durch den polyklonalen anti-p54 SAPK $\beta$  Antikörper (Ab681), welcher durch Immunisierung von Hühnern mit dem rekombinanten GST-p54 SAPK $\beta$ -Protein aus *E. coli* hergestellt wurde. Dieser Antikörper erkennt spezifisch bakteriell exprimiertes GST-SAPK $\beta$ , sowie aus Kaninchen aufgereinigte p50/p55 SAPK $\alpha$  (M. Kracht, unveröffentlichte Daten). In Lysaten aus humanen Zellen erkennt er JNK1, JNK2 und JNK3 sowie SAPK $\beta$ , die JNK3-Isoform der Ratte, falls sie überexprimiert wird.

Zunächst wurde die Spezifität des Antikörpers durch Nachweis der endogenen JNK-Proteine in verschiedenen Zellextrakten untersucht.

### 3.3.1 Nachweis von endogenen JNK's in Gesamtzellysaten

Die Lyse der Zellen erfolgte entweder in dem Kinase-Lysepuffer mit 0,5 % (v/v) NP-40 oder im Triton-Lysepuffer mit 1 % Triton X-100 (v/v). Beide verwendeten Detergenzien sind nichtionische Polyoxyethylene mit identischer Strukturformel, so daß sich die Puffer in ihrem Detergenzgehalt und ihrer ionischen Zusammensetzung, durch die verschiedenen Pufferkomponenten, unterscheiden. Die anschließende Zentrifugation des rohen Zell-Lysates erfolgte entweder bei 15.000 x g oder 100.000 x g. Um sicherzustellen, daß in allen verwendeten Aufarbeitungen der Nachweis der endogenen JNK's im *Western-Blot* mit dem Antikörper Ab 681 gleichermaßen möglich ist, wurden von unstimulierten KB-Zellen Lysate in beiden Puffern hergestellt und jeweils Aliquote unterschiedlich zentrifugiert. Je 50 µg und 100 µg Proteinlysate wurden auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Tank-Verfahren geblottet. Abb. 3.9 zeigt die Anfärbung mit dem Antikörper Ab 681. Neben unspezifischen Kreuzreaktionen (höherer Molekulargewichtsbereich), erkennt man die endogenen JNK's, jeweils zwei Banden bei 45-48 kDa und 54-57 kDa. Wobei sich die schwerere Bande bei einer verlängerten Gel-Laufstrecke in zwei Banden auftrennt. Bei den 15.000 x g Triton-Lysaten sieht man aber auch zwei prägnante Banden (ca. 35-38 kDa), die nur hier auftauchen. Dies könnten fragmentierte JNK-Proteine sein, die durch die Aufarbeitung und den verwendeten Puffer entstehen.



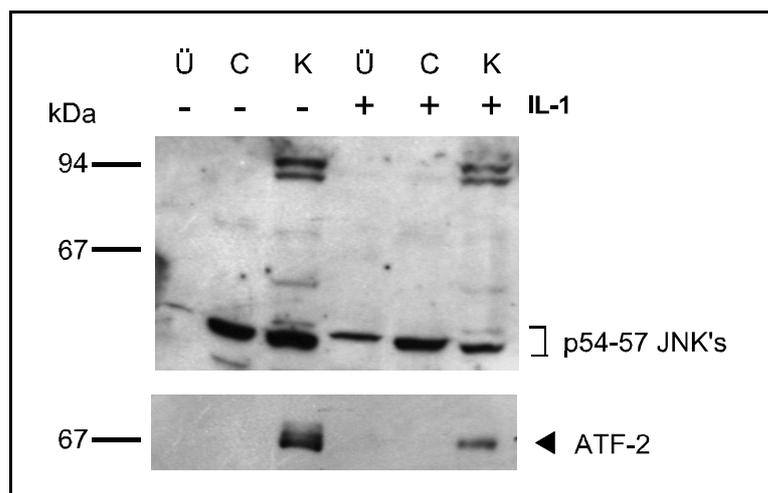
**Abb. 3.9: Nachweis von endogenen JNK's in Gesamtzellextrakten**

*Western-Blot* einer 10 % SDS-PAGE, Färbung mit Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3])

### 3.3.2 Nachweis von endogenen JNK's in Kernextrakten

Zur Detektion der Kinasen in der zytosolischen Fraktion und im Kernextrakt von KB-Zellen, wurden unstimulierte und stimulierte (15 min, 10 ng/ml IL-1 $\alpha$ ) Zellen nach Vorschrift aufgearbeitet. Jeweils 25  $\mu$ g Proteinlysate des eigentlich bei der Aufarbeitung zu verworfenden Überstandes (Ü), sowie je 200  $\mu$ g Zytosol- (C) und Kernfraktion (K) wurden auf einem 10 % SDS-Gel getrennt, geblottet (*Semy-Dry-Verfahren*) und mit Ab 681 gefärbt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.10 dargestellt. In allen Fraktionen ließ sich spezifisch die 54-57 kDa große JNK-Proteinbande nachweisen, wobei in den stimulierten Fraktionen ein Shift durch die Phosphorylierung zu erkennen ist. Die 45-48 kDa-Bande war auch vorhanden, ist hier aber nicht dargestellt. Da im ersten Überstand schon Kinase nachweisbar war, obwohl dieser Aufarbeitungsschritt die Zellen wäscht, müssen hier schon wenige Zellen aufgebrochen worden sein. Bezogen auf das Volumen der Waschfraktion ist dieser Anteil aber vernachlässigbar.

Um die Lysebedingungen zu überprüfen, wurde die PVDF-*Blot*-Membran anschließend mit anti-ATF-2 gefärbt. Der 68 kDa große Transkriptionsfaktor wurde, wie nach der Literatur zu erwarten, nur in den Kernfraktionen nachgewiesen (unterer Teil der Abb. 3.10). Dies zeigt auf, daß die zytosolische Fraktion nicht durch Kernkompartimente verunreinigt ist.



**Abb. 3.10: Nachweis von endogenen JNK's in Kernextrakten**

*Western-Blot* einer 10 % SDS-PAGE

Oberer Teil: Färbung mit Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3])

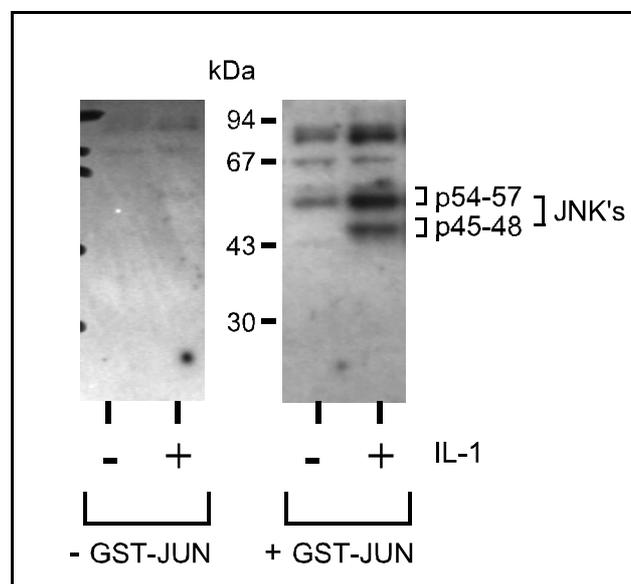
Unterer Teil: Färbung mit anti-ATF-2

Ü=Überstand; C=zytosolische Fraktion; K=Kernfraktion

### 3.3.3 Unterscheidung zwischen verschiedenen Isoformen und ihrer Aktivierung

Zur gezielten Untersuchung der vorhandenen Isoformen in den Zellextrakten auf JNK-Aktivierung, wurde der *In-Gel-Kinase-Assay* eingesetzt. Bei dieser Methode wurden zuerst die Lysate (unstimuliert und stimuliert) über ein SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine vollständig denaturiert und anschließend renaturiert. Danach wurde das gesamte Gel einer Kinasereaktion unterzogen, wobei das Substrat (GST-c-Jun) zu Anfang schon in das Gel einpolymerisiert wurde. Als Kontrolle wurde dieselbe Prozedur mit einem SDS-Gel ohne einpolymerisiertem GST-c-Jun durchgeführt.

Das Ergebnis (Abb. 3.11) war eine sichtbare IL-1 induzierte Aktivierung der JNK's in KB-Zellen, wobei die Isoformen als Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von 45-48 kDa und 54-57 kDa sichtbar sind. Eine Zuordnung der einzelnen SAPK/JNK-Isoformen ist nicht möglich, da alle drei *jnk*-Gene für Produkte von 45 bis 57 kDa kodieren (siehe dazu Tab. 1.1, Seite 7). Momentan gibt es auch noch keine Antikörper die eine eindeutige Unterscheidung ermöglichen.



**Abb. 3.11: Nachweis von endogenen JNK's im *In-Gel-Kinase-Assay***

Aufgetragen wurden pro Bahn 15 µg Zytosol aus unstimulierten und stimulierten (10 ng/ml IL-1 $\alpha$ ) KB-Zellen.

Mit diesem *Assay* sind innerhalb der Isoformen keine eindeutigen Unterschiede in der Aktivierbarkeit festzustellen. Ein großer Nachteil dieser Methode ist, daß die Detektion

von der Renaturierung der Proteine abhängt. Da nicht meßbar ist, wieviel Protein der verschiedenen Isoformen funktionell renaturiert wurde, ist auch kein direkter quantitativer Vergleich möglich. Daher eignet sich diese Methode nicht zur quantitativen Betrachtung der Aktivierung einzelner JNK-Isoformen.

### **3.4 Transiente und stabile Überexpression von p54SAPK $\beta$ mit Hilfe zweier eukaryontischer Expressionsplasmide**

#### **3.4.1 Expression mit Hilfe des pcDNA3-Vektors**

##### 3.4.1.1 Restriktionsanalyse der Konstrukte

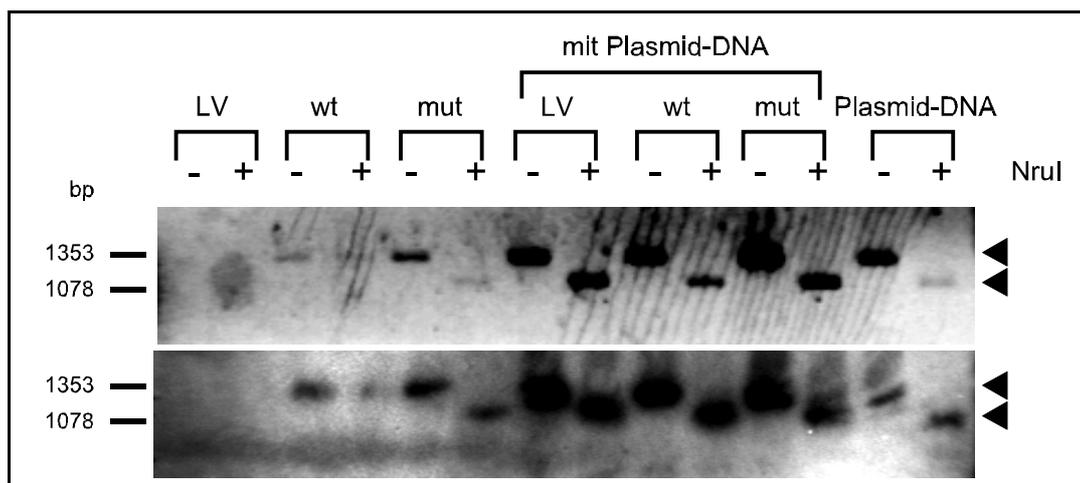
Zur Überprüfung der verwendeten p54SAPK $\beta$ -Konstrukte für die Transfektion, wurden diese nach der Plasmidpräparation überprüft. Dazu wurde ein Fragment aus dem Vektor-konstrukt mit Hilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten. Die Enzyme wurden so gewählt, daß sowohl das Vorhandensein der p54SAPK $\beta$ -Sequenz als auch deren Orientierung (sense oder antisense) kontrolliert werden konnte. Die eine gewählte Spaltstelle (*Bgl* II) liegt in der Vektorsequenz, die zweite Schnittstelle (*EcoRV*) im *Insert*. Der Restriktionsverdau der pcDNA3-p54SAPK $\beta$ -Konstrukte mit *Bgl* II und *EcoRV* führte zu zwei Fragmenten mit einer Größe von 1873 bp und 5212 bp bei der sense Orientierung des *Inserts*, bzw. zu 1251 bp und 5834 bp großen Fragmenten bei der antisense-Orientierung des *Inserts* im Vektor.

##### 3.4.1.2 Transiente Transfektion von pcDNA3-p54SAPK $\beta$ in KB-Zellen

Pro Ansatz wurden jeweils 6  $\mu$ g pcDNA3-Leervektor, pcDNA3-p54SAPK $\beta$  wt und pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) mut (Klon19) sense transfiziert. Zur Analyse der transienten Expression wurden 24 h und 48 h nach Transfektion aus den Ansätzen RNA präpariert. Anschließend wurden diese einer RT-PCR und PCR, einer anschließenden Gelextraktion des Fragmentes, sowie einer weiteren PCR, unterzogen. Als Positivkontrolle der PCR wurden RT-Ansätze mit 5 ng pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) mut (Klon19)-DNA versetzt. Als *Primerpaare* dienten SAPKBS346 und SAPKBA1661, ihre Sequenzen sowie ihre

Bindungsregion auf dem Plasmid sind am Anfang dieses Kapitels, sowie im Material- und Methodenteil erläutert. Nach einer Ammoniumacetat-Fällung der PCR-Produkte, wurde jeweils ein Aliquot mit *NruI* inkubiert. Durch diesen Restriktionsverdau sollten p54SAPK $\beta$ (K-R)-Transkripte nachgewiesen werden, denn nur die Mutante enthält eine Schnittstelle im erzeugten Fragment. Die Analyse der unverdauten und verdauten PCR-Produkte erfolgte anschließend auf einem 2 % (v/v) Agarose-Gel, welches nach der Ethidiumbromid-Färbung geblottet wurde (*Southern-Blot*), um mit Hilfe einer p54SAPK $\beta$ -Sonde spezifisch das erwartete, amplifizierte Fragment nachzuweisen.

Sowohl 24 h als auch 48 h nach der Transfektion konnten in den transfizierten Zellen die mRNA-Transkripte der transfizierten SAPK $\beta$  cDNA nachgewiesen werden. Durch den spezifischen Restriktionsverdau mit *NruI* wurde nur das PCR-Fragment, welches aus der transfizierten Mutante p54SAPK $\beta$ (K-R) resultierte, geschnitten. Die Abb. 3.12 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR mit den RNA-Präparationen 48 h nach Transfektion. Man erkennt bei dem Leervektor-transfiziertem Ansatz keine Transkripte; bei dem Plasmid-DNA-Ansatz und den Ansätzen in denen die Positivkontrolle hineintitriert wurde, konnte dasselbe 1331 bp große SAPK $\beta$  Transkript detektiert werden. Auch bei dem transienten Wildtyp- und Mutantenansatz konnte jeweils das Transkript nachgewiesen werden, wobei nur Letzteres durch *NruI* spezifisch verkürzt wurde auf 1156 bp.



**Abb. 3.12: Transiente Überexpression (48 h) der pcDNA3-Konstrukte in KB-Zellen**

Oberer Teil: Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarose-Gel

Unterer Teil: *Southern-Blot*, mit p54SAPK $\beta$ -Sonde hybridisiert

LV: pcDNA3-Leervektor; wt: pcDNA3-p54SAPK $\beta$  Wildtyp; mut: pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R)

Mutante; Plasmid-DNA: pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) mut (Klon19)-DNA

Bei weiteren transienten Transfektionsexperimenten wurde versucht, die Überexpression auf Proteinebene nachzuweisen. Da keine Überexpressions-Signale im *Western-Blot* auf der Höhe der endogenen SAPK/JNK's nachzuweisen waren, wurden stabile Zellpools generiert.

#### 3.4.1.3 Stabile Transfektion von pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) in KB-Zellen

Zur Etablierung von stabilen Transfektanten wurden KB-Zellen mit 20  $\mu$ g pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) mit Klon 19-sense-DNA transfiziert. Die Selektion erfolgte in 600  $\mu$ g/ml G418, die Einzelzellklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringen erhalten. Von den insgesamt zwölf gepickten Zellklonen hatten acht die Zellexpansion überlebt (67 %). Diese Klone (Nr.:1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11) wurden anschließend charakterisiert.

In einer anschließenden Transfektion wurden weitere pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Zellklone erzeugt, sowie die Kontrollzellen mit pcDNA3-p54SAPK $\beta$ -Wildtyp und pcDNA3-Leervektor (je 10  $\mu$ g DNA transfiziert). Die Einzelzellklone wurden auch hier durch Klonierungsringe erhalten.

Von den anfänglich sechs Kinase-inaktiven Zellklonen konnten vier expandiert werden (mut 1, 2, 5neu, 6neu), das entspricht 67 %. Auch von den gepickten sechs Wildtyp-Klonen (Nr. 1 bis 5) überlebten fünf (83 %).

Bei den Leervektor-transfizierten Klonen konnten von zwölf Klonen sechs (50 %) erhalten werden (LV 1, 2, 4, 7, 9, 10).

Die Zellklone aus der zweiten Transfektion wurden nicht mehr charakterisiert, da sich die Arbeit dann auf das peV-Expressionsplasmid fokussiert hatte.

##### 3.4.1.3.1 Nachweis der überexprimierten p54SAPK $\beta$ Kinase auf Proteinebene in stabilen Zellklonen

Ein Nachweis der überexprimierten p54SAPK $\beta$  Kinase (Kinase-inaktive Mutante und Wildtyp) auf Proteinebene war sehr schwierig, da dieses Protein keinen Fusionsanteil trug und so nicht von der endogenen Kinase unterscheidbar war. In den durchgeführten *Western-Blots* konnte visuell anhand der Autoradiographie kein sichtbarer JNK-Konzentrationsanstieg, im Vergleich zu nicht transfizierten KB-Zellen mit endogener Kinase, festgestellt werden.

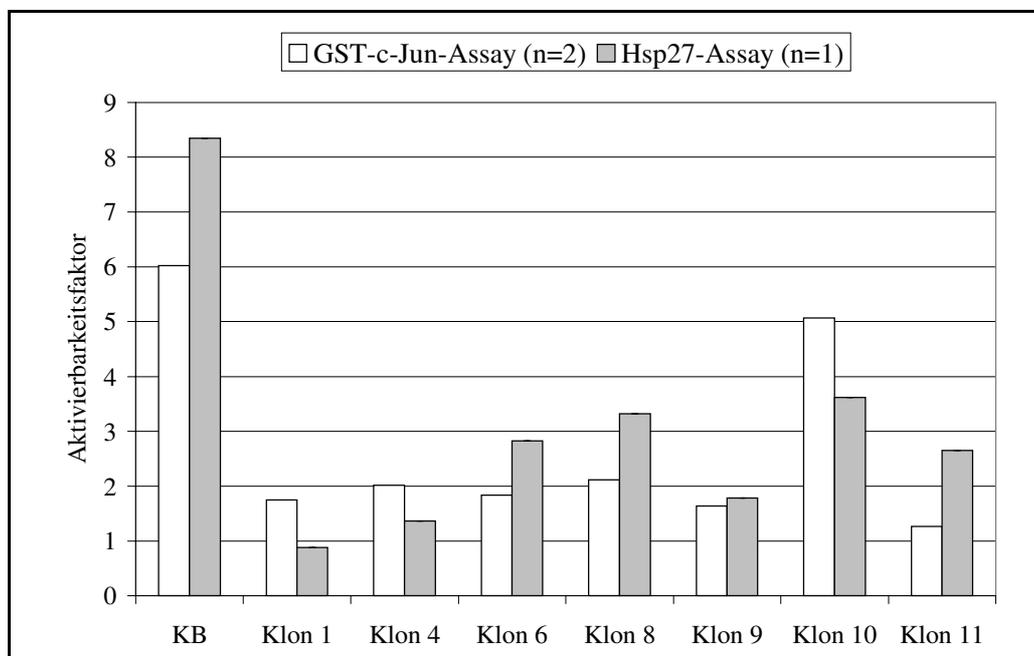
### 3.4.1.3.2 Nachweis der JNK-Aktivierung in stabilen KB-pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) Zellklonen

In *in vitro* Kinase-Assays mit GST-c-Jun als Substrat konnte nachgewiesen werden, daß alle erzeugten Einzelzellklone eine stark verminderte Aktivierung (über 75 %) der SAPK/JNK's nach 15 min IL-1 Stimulation (20 ng/ml) aufzeigten. Im Experiment zeigten alle Klone, außer Klon 10, einen Aktivierbarkeitsfaktor unter zwei, nicht transfizierte KB-Zellen zeigten einen Faktor von sechs.

Bei der Verwendung von Hsp27 als Substrat im *in vitro* Kinase-Assay, konnte ebenfalls ein deutlich verminderter Effekt in den Zellklonen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu nicht transfizierten KB-Zellen (Faktor 8,3) zeigten die Zellklone Faktoren zwischen 0,9 und 3,6.

Für die Experimente wurden Ganzzellextrakte (5  $\mu$ g pro Ansatz) eingesetzt, die durch Lyse der Zellen im Kinase-Lysepuffer mit NP-40 Zusatz und anschließender 100.000 x g Zentrifugation gewonnen wurden. Die Substratphosphorylierung wurde quantifiziert (Phospho-Imager).

Die Ergebnisse der Kinase-Assays sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt.



**Abb. 3.13: Kinase-Assays von stabilen KB-pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) Zellklonen**

Pro Ansatz wurden 5  $\mu$ g Ganzzellextrakte eingesetzt (Kinase-Lysepuffer mit NP-40; 100.000 x g Zentrifugation)

### 3.4.1.3.3 Nachweis der integrierten p54SAPK $\beta$ (K-R)-DNA in stabilen Zellklonen

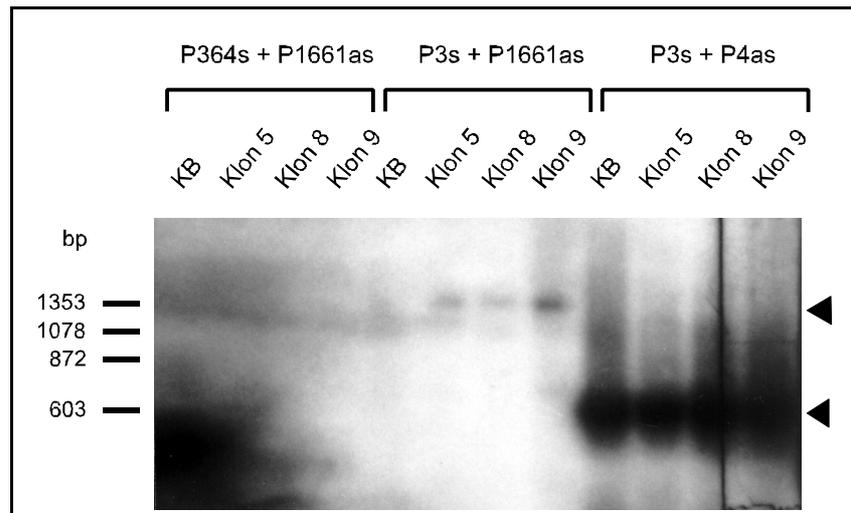
Zum Nachweis der stabilen Integration der transfizierten DNA wurde genomische DNA von den vorhandenen Zellklonen präpariert. Durch eine anschließende PCR mit verschiedenen *Primer*kombinationen der vorhandenen vier *Primer*, wurde versucht, das Fragment spezifisch nachzuweisen. Nach der Auftrennung der amplifizierten Fragmente auf einem 2 %igen Agarosegel wurde ein *Southern-Blot* angefertigt, um mit Hilfe der p54SAPK $\beta$ -Sonde die Fragmente zu identifizieren. Bei den drei verschiedenen *Primer*kombinationen waren folgende Fragmentgrößen zu erwarten:

- a.) SAPKBS346 und SAPKBA1661: 1331 bp
- b.) Primer 3 (s) und SAPKBA1661: 1172 bp
- c.) Primer 3 (s) und Primer 4 (as): 522 bp

Wie in der Abb. 3.14 sichtbar, konnten in den stabil transfizierten Zellklonen 5, 8 und 9 nur mit den *Primer*kombinationen b.) und c.) die erwarteten Fragmente nachgewiesen werden. Auffällig ist auch, daß mit der Kombination c.), diese *Primer* binden beide in der kodierenden Region der p54SAPK $\beta$ -Sequenz, auch in nicht transfizierten KB-Zellen ein 522 bp großes Fragment nachweisbar war. Hierbei kann es sich nur um die Amplifikation endogener JNK-Sequenzen handeln, die Homolog zu der transfizierten p54SAPK $\beta$ (K-R)-Sequenz sind. Wobei wahrscheinlich nur solche DNA-Abschnitte in der PCR amplifiziert wurden, die zwischen den Bindungsstellen beider *Primer* keine Intronsequenzen aufweisen. Mit dem sense *Primer* SAPKBS346 und dem *Primer* SAPKBA1661 als antisense *Primer* ließ sich kein Fragment nachweisen; beide *Primer* binden sehr spezifisch an SAPK $\beta$  (siehe Abb. 3.2). Die Bindungsstelle für den sense *Primer* ist vermutlich nicht vorhanden. In den Kontrollansätzen konnten mit dem *Primer*paar a.) die amplifizierten Transkripte des Fremdgens (Wildtyp und Mutante) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß sich im Genom der stabilen KB-Klone nicht die komplette p54SAPK $\beta$ (K-R)-Fremd-DNA integriert wurde, sondern mindestens die Sequenz vor dem ATG-Startkodon -an die der SAPKBS346-*Primer* spezifisch binden kann- fehlte. Wieviel von der DNA-Region zwischen Start und Bindungssequenz des sense *Primers* 3 stabil in den Zellklonen integriert war, wurde nicht weiter untersucht.

Aufgrund des fehlenden Startkodons ist somit nicht zu erwarten, daß das Fremd-Gen in den stabilen Zellklonen exprimiert wird.



**Abb. 3.14: Nachweis der stabilen Integration von pcDNA3-p54SAPK $\beta$ (K-R) in KB-Klonen**

*Southern-Blot*, mit p54SAPK $\beta$ -Sonde hybridisiert

P364s: sense *Primer* SAPKBS364

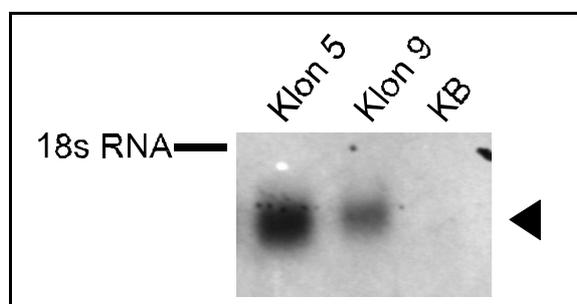
P1661as: antisense *Primer* SAPKBA1661

P3s: sense *Primer* 3

P4as: antisense *Primer* 4

#### 3.4.1.3.4 Nachweis des Neomycin-Resistenzgens in stabilen Zellklonen

Mit Hilfe der *Northern-Blot*-Analyse wurde die RNA von stabilen Zellklonen auf das Vorhandensein von Neomycin-Transkripten in einer Größe von 782 bp untersucht. Wie zu erwarten, konnten diese in den untersuchten Zellklonen nachgewiesen werden. Das Neomycinresistenzgen wurde also nach der Transfektion stabil in die chromosomale DNA der Zellklone integriert und konstitutiv exprimiert. In der nachfolgenden Abbildung sind zwei Klone und KB-Zellen exemplarisch dargestellt.



**Abb. 3.15: Nachweis der stabilen Integration des Neomycinresistenzgenes in KB-Zellklonen**

*Northern-Blot*, mit Neomycin-Sonde hybridisiert

#### 3.4.1.3.5 Zusammenfassung der stabilen Transfektionsergebnisse

Unter der Verwendung des eukaryontischen Expressionsplasmides pcDNA3 ließ sich zwar p54SAPK $\beta$ -Wildtyp und p54SAPK $\beta$ (K-R)-Mutante transient exprimieren, denn mRNA-Transkripte waren nachweisbar, auf Proteinebene konnte aber keine massive Überexpression detektiert werden. In stabil transfizierten KB-p54SAPK $\beta$ (K-R) Zelllinien konnte im *Southern-Blot* nur ein Teil der kodierenden Sequenz nachgewiesen werden, die Startregion fehlte. Da dadurch die Genexpression des Fremd-Gens sehr unwahrscheinlich ist, war ein Nachweis des mutierten p54SAPK $\beta$ (K-R)-Proteins in diesen Zellklonen nicht zu erwarten, die entsprechenden Untersuchungen bestätigten dies.

Interessanterweise zeigten die stabilen KB-p54SAPK $\beta$ (K-R) Mutanten-Zellklone aber eine deutliche Hemmung der IL-1 induzierten SAPK/JNK-Aktivierung und Hsp27-Phosphorylierung. Da nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob diese Effekte durch das Fremdgen und/oder durch die klonale Selektion der Zellen hervorgerufen wurden, wurden diese Linien nicht weiter untersucht.

Diese Experimente zeigten auch, daß bei den transfizierten Linien mit dem zweiten Expressionsplasmid (peVRF0-Vektor), es zum einen besonders wichtig ist die Überexpression nachzuweisen und zum anderen alle Signalwege sorgfältig zu analysieren sind.

### **3.4.2 Expression der p54SAPK $\beta$ -Konstrukte mit Hilfe der peVRF0-Vektoren**

#### 3.4.2.1 Restriktionsanalyse der Konstrukte

Durch Restriktionsverdau der verschiedenen peVRF0HA- bzw. HA/His-p54SAPK $\beta$ -Konstrukte mit *EcoRV* und *Bgl II* war es möglich, die Orientierung des *Inserts* im Vektor nachzuweisen. Das Restriktionsenzym *EcoRV* besitzt eine Schnittstelle im *Inserts*, dagegen befindet sich die Spaltstelle des Restriktionsenzym *Bgl II* in der Vektorsequenz.

Bei einer sense-Orientierung wurden zwei Fragmente in der Größe von 1137 bp und 4671 bp nachgewiesen, dagegen waren die Fragmente bei der antisense-Orientierung 1714 bp und 4094 bp groß. Überprüft werden konnte auch das Vorhandensein der eingeführten Punktmutation, denn diese Konstrukte besitzen eine *NruI*-Restriktionsschnittstelle, die nur im Mutanten-*Insert* und nicht im Vektor vorliegt (siehe Abb. 3.1).

### 3.4.2.2 Transiente Transfektion der peVRF0-Konstrukte und Nachweis der Überexpression im *Western-Blot*

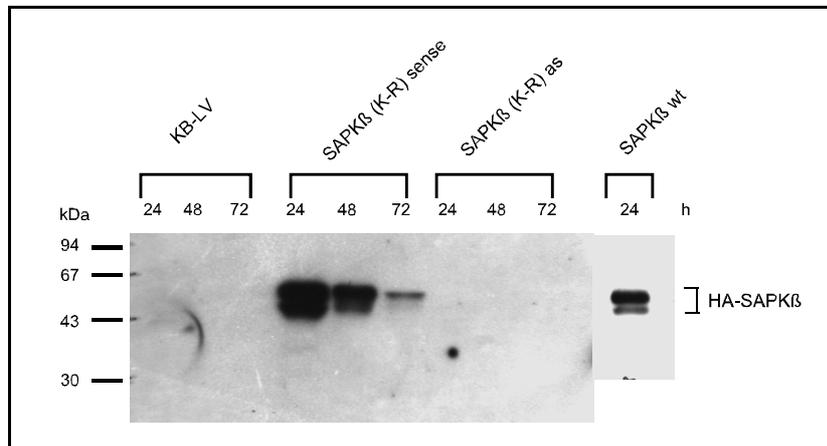
Die Analyse der transienten Expression der Konstrukte in KB-Zellen wurde auf Proteinebene durchgeführt. Dabei ist der Fusionsanteil (HA- bzw. HA-His-tag) zur Unterscheidung des überexprimierten Proteins (wt und mut) von den endogenen JNK's von Vorteil. Obwohl der zusätzliche Proteinanteil nur wenige kDa ausmacht, ist aus der Literatur bekannt, daß solche Fusionsproteine in der SDS-PAGE ein höheres, apparentes Molekulargewicht als berechnet aufzeigen. In einem *Western-Blot* können die HA- und His-Epitope des exprimierten Proteins mittels spezifischer Antikörperfärbung nachgewiesen werden.

Da in dieser Arbeit neben dem überexprimierten Kinase-inaktiven SAPK $\beta$ (K-R)-Protein aber auch die Proteinexpression der endogenen JNK-Isoformen parallel beobachtet werden sollte, um eine mögliche Abnahme der endogenen Proteinmenge festzustellen, wurde meist der Antikörper Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3]) (siehe Kapitel 3.3) verwendet.

Alle Konstrukte wurden transient in KB-Zellen transfiziert (3  $\mu$ g Plasmid-DNA), anschließend wurden die Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h in Kinase-Lysepuffer lysiert, auf einem 10 % (v/v) SDS-Gel getrennt und anschließend geblottet (*Semi-Dry-Verfahren*). Der spezifische Nachweis erfolgte durch Färbung mit dem Antikörper Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3]). Es konnte gezeigt werden, daß das Wildtyp-Konstrukt und auch beide sense-Mutanten-Konstrukte transient überexprimiert werden. Bei den Transfektionsansätzen der beiden antisense-Konstrukte war es nie möglich, eine Abnahme der endogenen JNK-Proteine zu zeigen. Der Grund dafür ist die sehr geringen Transfektionseffizienz bei KB-Zellen (siehe dazu 3.1.4).

Abb. 3.16 zeigt eine transiente Expressionskinetik der peVRF0HA/His-p54SAPK $\beta$  Mutante sense und antisense, des entsprechenden Leervektors, sowie des Wildtyps. In dieser Abbildung sind die endogenen JNK-Proteine nicht zu erkennen, da es sich um eine kurze Filmexposition handelt. Man erkennt zwei Expressionsbanden des HA/His-p54SAPK $\beta$ -Proteins. Die Bande mit dem geringeren Molekulargewicht könnte durch Proteindegradation entstanden sein. Möglich ist auch eine posttranslationelle Modifikation, die auch bei SAPK/JNK-Proteinen bekannt ist.

Sichtbar ist auch die zeitliche Expressionsabnahme durch Verlust der transient transfizierten DNA. Das es sich bei den Banden um das überexprimierte Fusionsprotein handelt, konnte durch Färbung mit einem HA-Antikörper nachgewiesen werden (nicht dargestellt).



**Abb. 3.16: Transiente Überexpression der peVRF0-Konstrukte in KB-Zellen**

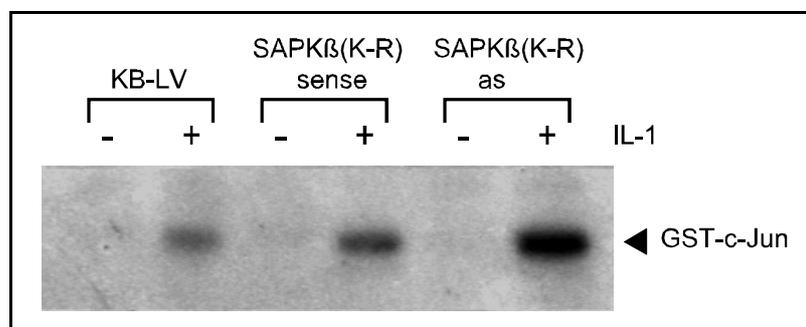
Western-Blot einer 10 % SDS-PAGE; aufgetragen wurden pro Bahn 50  $\mu$ g Gesamtzelleextrakt. Färbung mit Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3])

### 3.4.2.3 Fehlender funktioneller Effekt auf endogene SAPK/JNK's nach transienter Transfektion von peVRF0-Konstrukten

Das im vorangegangenen Kapitel beschriebene Experiment zeigte, daß das Kinase-inaktive SAPK $\beta$ (K-R)-Protein transient in KB-Zellen überexprimiert werden kann. Bei der Expression der antisense-RNA konnten keine Einflüsse auf die endogenen JNK-Proteine festgestellt werden. Inwieweit die transiente Überexpression der Konstrukte Einfluß auf den IL-1 vermittelten SAPK/JNK-Aktivierung nimmt, wurde mit Hilfe eines GST-c-Jun Kinase-Assays gemessen. Dazu wurden mit peVRF0HA/His-Konstrukten transfizierte KB-Zellen (Bedingungen wie im Kapitel 3.4.2.2) 48 h nach der Transfektion für 15 min mit IL-1 $\alpha$  stimuliert, Ganzzelleextrakte hergestellt und einem *in vitro* Kinase-Assay unterzogen. In mehrmals wiederholten Experimenten zeigte sich, daß die Aktivierbarkeit der endogenen SAPK/JNK's unbeeinflußt bleibt von dem überexprimierten Kinase-inaktiven SAPK $\beta$ (K-R) Protein und auch von der überexprimierten antisense-RNA. Dies ist auch leicht verständlich, denn da KB-Zellen zu ca. 1-5 % transfiziert werden, ist der Großteil der Zellen unbeeinflußt von der transfizierten Kinase. Um also den Einfluß des mutierten Proteins in *in vitro* Kinase-Assays zu messen, muß der endogene Hintergrund gesenkt

werden. In einer transienten gemischten Zellpopulation ist dies nicht möglich, so daß zur Klärung dieser Fragestellung nur *in vitro* Kinase-Assays von stabilen Einzelzellklone verwendet werden können.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Autoradiographie des beschriebenen *in vitro* Kinase-Assays. Obwohl hier eine deutlich verstärkte Phosphorylierung des Substrates bei den Transfektionsansätzen mit sense- und antisense-Konstrukt im Vergleich zu Leervektor-transfizierten KB-Zellen zu erkennen ist, konnte in weiteren Experimenten nur festgestellt werden, daß in allen Transfektionsansätzen die Aktivierbarkeit schwanken kann.



**Abb. 3.17: GST-c-Jun Kinase-Assay transient transfizierter KB-Zellen mit peVRF0-Konstrukten**

#### 3.4.2.4 Stabile Transfektion der peVRF0HA-Konstrukte

Zur Generierung stabiler Transfektanten wurden KB-Zellen mit Dosp<sup>®</sup> transfiziert. Da der peVRF0-Vektor kein Neomycinresistenzgen trägt, wurde jeweils mit dem pcDNA3-Leervektor kotransfiziert. Nach Selektion mit G418 wurden die erhaltenen Zellpools auf Proteinebene (*Western-Blot*) kontrolliert und Einzelzellklone über das *Limiting Dilution* Verfahren aus positiven Populationen erzeugt (siehe 2.10.2.2, Seite 43). Die so erhaltenen Zellklone wurden wieder auf Proteinebene analysiert.

Anzumerken ist, daß bei der stabilen Transfektion von peVRF0HA/His-Konstrukten keine Zellpools generiert werden konnten, die HA/His-SAPKβ (Wildtyp und Mutante) exprimierten.

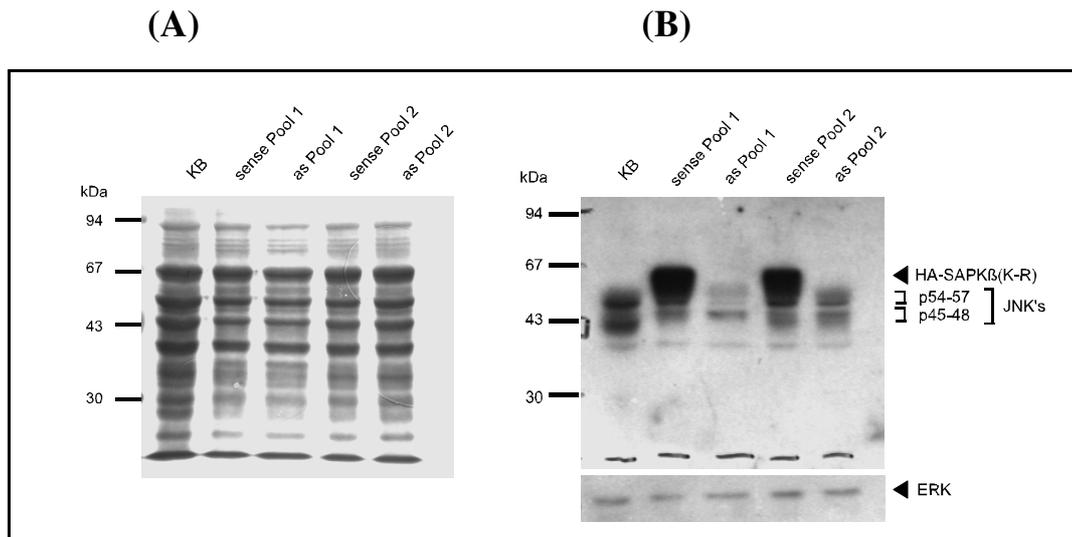
#### 3.4.2.4.1 Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-Leervektor-Zellpools

Es wurden je 1 µg pcDNA3-Leervektor und peVRF0HA-Leervektor stabil in KB-Zellen transfiziert. Die erhaltenen Zellpopulationen besaßen eine stabile G418-Resistenz, die Kultivierung dieser Zellen erfolgte dauerhaft in Anwesenheit von 300 µg/ml G418. Inwieweit diese antibiotikaresistenten Zellen beide Leervektoren in ihre chromosomale DNA integriert hatten, konnte nicht überprüft werden. Es wurden daher keine Einzelzellklone erzeugt. Als Kontroll-Zellen für Experimente diente der gesamte Zell-Pool.

#### 3.4.2.4.2 Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPKβ(K-R) Mutanten(s, as)-Zellpools

Durch Kotransfektion von 1 µg pcDNA3 mit peVRF0HA-p54SAPKβ(K-R) mit sense bzw. antisense in KB-Zellen, konnten jeweils zwei Pools erzeugt werden (s/as Pool 1 und 2). Zur Überprüfung dieser generierten Zellpopulationen wurden 100 µg Proteinlysate (Kinase-Lysepuffer, 100.000 x g zentrifugiert) auf einer SDS-PAGE (10 % Gel) aufgetrennt; als Kontrolle dienten nicht transfizierte KB-Zellen. Nach dem anschließendem *Western-Blot* (*Semy-Dry-Verfahren*), konnte durch Anfärben mit dem Antikörper Ab681 (anti-[SAPKβ; JNK1, 2, 3]) die Expression des Fremdgens und der endogenen SAPK/JNK-Proteine beurteilt werden.

Wie die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (CBB) der PVDF-Membran zeigt (Abb. 3.18 (A)), ist der Proteintransfer sehr gleichmäßig. Die Färbung mit Ab681 (anti-[SAPKβ; JNK1, 2, 3]) (Abb. 3.18, (B) oberer Teil) zeigt die deutliche Überexpression des Kinase-inaktiven Fusionsproteins bei den beiden sense-Pools. Beide antisense-Pools zeigen stark verminderte endogene JNK-Proteinbanden. Zur Kontrolle erfolgte eine weitere Anfärbung der Membran mit anti-ERK (Abb. 3.18 (B), unterer Teil).



**Abb. 3.18: Nachweis der Überexpression von HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) in stabilen KB-Zellpools im Western-Blot**

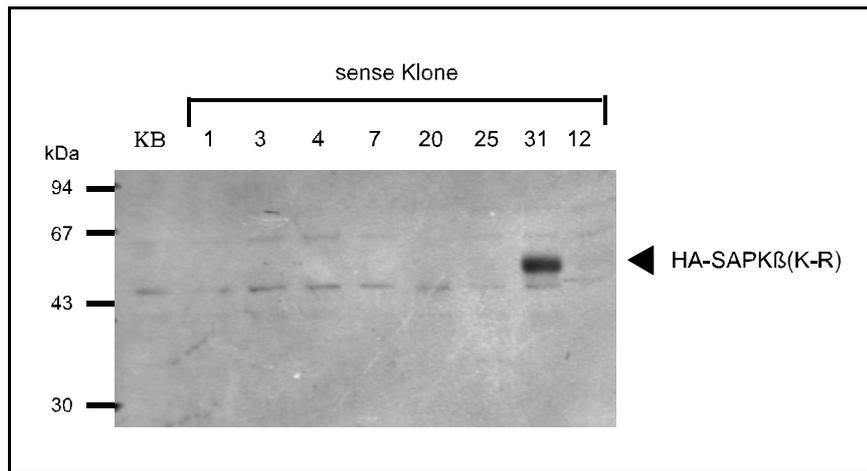
Pro Bahn wurden 100  $\mu$ g Ganzelleextrakt aufgetragen

(A) CBB-Anfärbung der PVDF-Membran

(B) oberer Teil: Färbung mit Ab681 (anti-[p54SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3])  
unterer Teil: Färbung mit anti-ERK

#### 3.4.2.4.3 Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) sense Einzelzellklone

Zur Etablierung klonaler Zelllinien wurde der oben beschriebene sense-Pool 1 im *Limiting Dilution* Experiment eingesetzt. Von 56 so erhaltenen Klonen überlebten fünf die Zell-expansion nicht (9 %). Die restlichen 51 Zellklone wurden alle auf Überexpression des Fusionsproteins im *Western-Blot* (*Semi-Dry-Verfahren*) getestet. Die verwendeten Lysate wurden mit Kinase-Lysepuffer und 100.000 x g Zentrifugation hergestellt, es wurde jeweils 50  $\mu$ g Ganzelleextrakt auf dem Gel aufgetragen. Abb. 3.19 zeigt einen Beispiel-*Blot* für die Überprüfung der generierten Zellklone. In der Abbildung sind die endogenen JNK-Proteine fast nicht sichtbar, da sehr kurze Autoradiographie-Expositionen der ECL verwendet wurden, um nur die deutliche Überexpressionsbande einwandfrei zu detektieren.

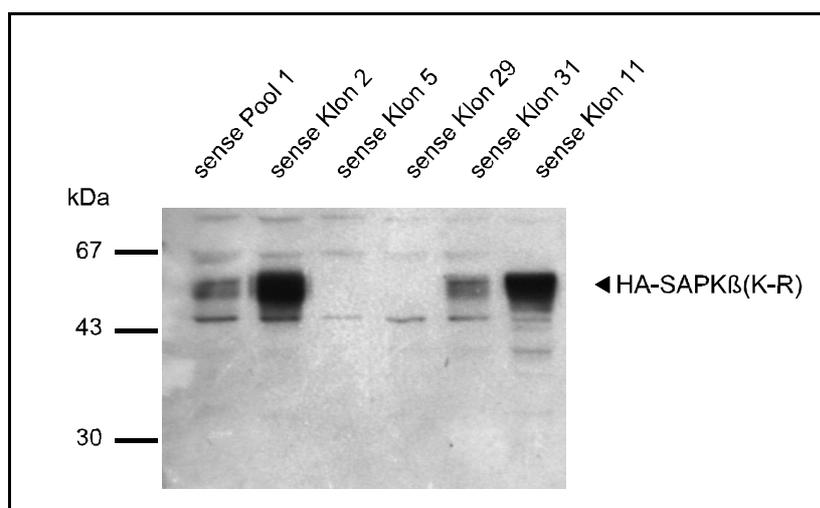


**Abb. 3.19: Überprüfung von verschiedenen stabilen sense Zellklonen auf Überexpression im Western-Blot**

Auf einer 10 % SDS-PAGE wurden 50 µg Ganzzellextrakt pro Bahn aufgetragen. Färbung der PVDF-Membran mit Ab681 (anti-[SAPKβ; JNK1, 2, 3]).

Aus den 51 überprüften Zellklonen konnten sechs positive Klone etabliert werden (12 %), wobei die Expressionsstärke des Fusionsproteins bei den Klonen unterschiedlich war. Eine sehr starke Überexpression zeigten die Klone 2, 11, 50. Mittelstark war die Expression bei Klon 31, und relativ schwach war die Expression bei Klon 41 und 51. Einige dieser Einzelzellklone sind in Abb. 3.20 dargestellt.

Aus den erhaltenen Daten läßt sich die Frequenz der erfolgreichen Kotransfektion beider Vektoren in der Gesamtpopulation berechnen. Hier betrug die Kotransfektionseffizienz 12 %.



**Abb. 3.20: Nachweis der Überexpression von HA-p54SAPKβ(K-R) in ausgewählten sense Zellklonen im Western-Blot**

Auf einer 10 % SDS-PAGE wurden 50 µg Ganzzellextrakt pro Bahn aufgetragen. Färbung der PVDF-Membran mit Ab681 (anti-[SAPKβ; JNK1, 2, 3]).

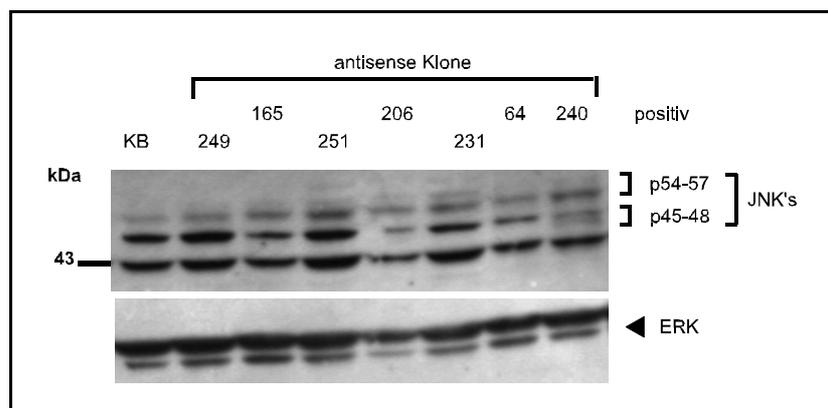
### 3.4.2.4.4 Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense Einzelzellklone

#### 3.4.2.4.4.1 Nachweis im *Western-Blot*

Aus dem antisense-Pool 1 (siehe Abb. 3.18) wurden mit Hilfe des *Limiting Dilution* Verfahrens insgesamt 253 Einzelzellklone erzeugt. Die Expansion der Zellen für das *Screening* überlebten 54 Zellen nicht (21 %). Zum Nachweis der verminderten endogenen Kinase wurden alle 199 Zellklone auf Proteinebene analysiert. Um hier markante Unterschiede zu erkennen, wurden jeweils 200  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Herstellung der Gesamtzellextrakte erfolgte mit Kinase-Lysepuffer und einer 15.000 x g Zentrifugation.

Um einen gleichmäßigen Proteintransfer bei den KB-Kontrollen und den Klonen nachzuweisen, wurde die PVDF-Membran nach dem Blotten mit CBB gefärbt. Zusätzlich wurde durch Anfärben mit dem anti-ERK Antikörper die gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Bahnen in der ECL-Reaktion nachgewiesen. Bei positiven Zellklonen erfolgte die wiederholte Kontrolle in einem neuen *Western-Blot*.

Die Abb. 3.21 zeigt einen *Western-Blot* zur Analyse der stabilen antisense-Zellklone. Die Klone 165, 206, 64 und 240 zeigen, im Gegensatz zur KB-Kontrolle und den Klonen 249, 251 und 231, verminderte JNK-Proteinmengen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Kontrollfärbung, eine normale ERK-Expression in allen transfizierten und nicht transfizierten Zellen.



**Abb. 3.21: Überprüfung verschiedener stabiler antisense-Zellklone auf JNK-Protein-Verminderung mittels *Western-Blot***

Auf einer 10 % SDS-PAGE wurden 200  $\mu$ g Ganzzellextrakt pro Bahn aufgetragen.

Oberer Teil: Färbung mit Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3])

Unterer Teil: Färbung mit anti-ERK

Der *Western-Blot* von Abb. 3.21 zeigt auch, daß es sehr schwer war eine Abnahme der endogenen JNK-Proteinmenge über ECL sicher zu detektieren. Gründe dafür sind die geringe Menge an SAPK/JNK-Proteinen in der Zelle, die Linearität der ECL-Reaktion, die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung und der zu erwartende partielle antisense Effekt in den selektierten Einzelzellklonen. Deshalb wurden von den 199 getesteten antisense-Zellklonen 19 ausgewählt, die eine mehr oder weniger starke Reduktion der endogenen SAPK/JNK-Proteinmenge im *Western-Blot* gezeigt hatten.

#### 3.4.2.4.4.2 Nachweis der JNK-Aktivierung

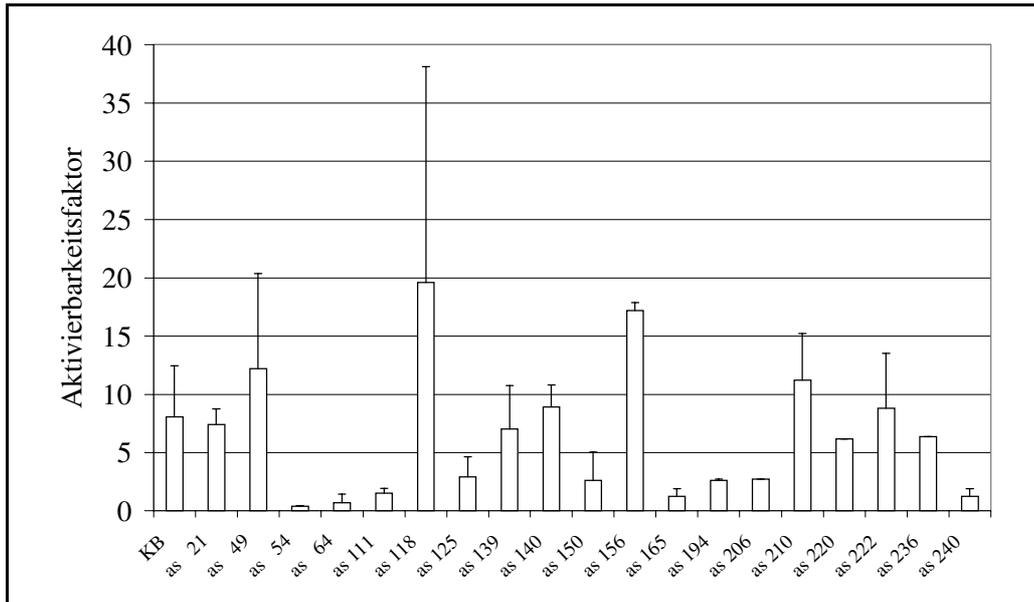
Aus den 199 getesteten antisense-Zellklonen wurden 19 Klone mit verminderter endogener Kinasemenge gefunden (10 %). Diese Klone tragen folgende Nummern: 21, 49, 54, 64, 111, 118, 125, 139, 140, 150, 156, 165, 194, 206, 210, 220, 222, 236 und 240.

Zur Beurteilung dieser 19 Zellklone wurden diese einem funktionellem *Assay* unterzogen. Nach Herstellung von unstimulierten und stimulierten (15 min, 10 ng/ml IL-1 $\alpha$ ) Triton-Lysaten wurde ein GST-c-Jun-Kinase-*Assay* (GSH-*Beads-Assay*) durchgeführt. Der verwendete *Assay* ist sehr sensitiv, da zelluläre Phosphoproteine, die in der Autoradiographie interferieren können, vorher aus dem Ansatz entfernt werden (siehe Kapitel 2.7.4.2).

Die quantitative Auswertung zeigte bei vier antisense-Zellklonen (Nr.: 54, 64, 165 und 240) eine deutlich verminderte SAPK/JNK Aktivierung nach IL-1 Stimulation. Die Faktoren der IL-1-Aktivierung liegen bei diesen Klonen unter 1,2. Anderen Zellklone zeigten einen leichten inhibitorischen Effekt und einige gar keinen. Auffällig sind auch die drei antisense-Zellklone (as 49, 118, 156) die eine deutlich verstärkte Aktivierbarkeit aufzeigten. Ob diese Effekte durch die Überexpression der antisense-RNA verursacht wurden, oder ob die Klone noch andere Defekte aufwiesen, konnte nicht untersucht werden.

Die Untersuchungen zeigten, daß 2 % der getesteten Zellklone einen sehr deutlichen inhibitorischen Effekt nach der Transfektion aufzeigten, der mit einer Verminderung der Kinasemenge im *Western-Blot* korrelierte.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

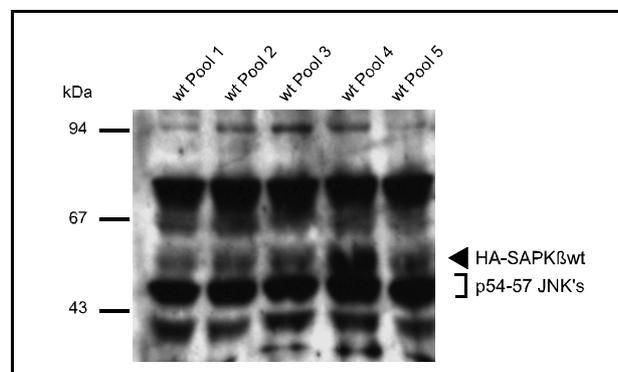


**Abb. 3.22: JNK-Aktivierung ausgewählter stabiler antisense-Zellklone**

Dargestellt sind quantitative Auswertungen von *GSH-Beads-Assays* (30 µg Gesamtzellextrakt pro Ansatz; Substrat: GST-c-Jun).

#### 3.4.2.4.5 Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPKβ Wildtyp-Zellpools

Bei der Etablierung von KB-Zellpopulationen, die die Wildtyp-p54SAP Kinase β exprimierten, wurden insgesamt 15 verschiedene Pools über mehrere Transfektionsansätze erzeugt, von denen zehn eine schwache Überexpression aufwiesen. Eine so starke Überexpression wie bei den sense-Konstrukt oder in den transienten Experimenten gelang nicht. Die Abb. 3.23 zeigt einen *Western-Blot* von fünf verschiedenen wt-Pools, wobei die Exposition der ECL verlängert wurde, um die Überexpression sichtbar zu machen.



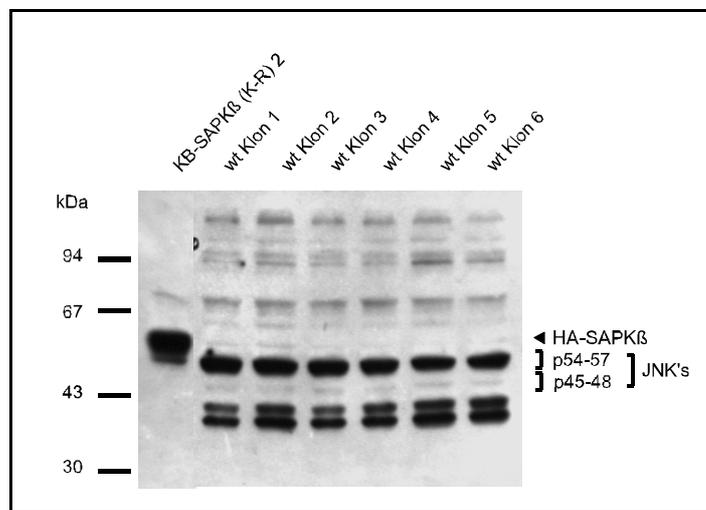
**Abb. 3.23: Nachweis der Überexpression von HA-p54SAPKβwt in stabilen Zellpools**

*Western-Blot* einer 10 % SDS-PAGE; aufgetragen wurden pro Bahn 100 µg Gesamtzellextrakt (Triton-Lysepuffer, 15.000 x g).

Färbung mit Ab681 (anti-[SAPKβ; JNK1, 2, 3])

#### 3.4.2.4.6 Erzeugung stabiler KB-peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ Wildtyp-Zellklone

In mehreren *Limiting Dilution* Ansätzen wurden aus den zehn gering exprimierenden wt-Zell-Pools Einzelzellklone generiert. Von zu Anfang 335 Einzelzellklonen konnten 293 Zellklone expandiert werden, d.h. 13 % der Zellen starben im klonalen Zustand vorzeitig. Die Analyse aller Zellklone erfolgte nach Lysatherstellung (Triton-Lysepuffer, 15.000 x g Zentrifugation) mittels *Western-Blot* (Tank-*Blot*-Verfahren). Als Positivkontrolle wurde ein Lysat des Kinase-inaktiven mut-sense Klones 2 eingesetzt. Die folgende Abb. 3.24 zeigt ein Beispiel für solch einen *Western-Blot*.



**Abb. 3.24: Nachweis der Überexpression von HA-p54SAPK $\beta$ wt in stabilen Zellklonen**

*Western-Blot* einer 10 % SDS-PAGE; aufgetragen wurden pro Bahn 100  $\mu$ g Gesamtzellextrakt (Triton-Lysepuffer, 15.000 x g).

Färbung mit Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3])

Alle 293 getesteten Wildtyp-Einzelzellklone waren negativ, so daß es insgesamt nicht gelang eine KB-Zelllinie zu erzeugen, die p54SAPK $\beta$  im Wildtyp exprimiert.

#### 3.4.2.4.7 Übersicht über die generierten Transfektanten

Zusammenfassend zeigt die folgende Tabelle die Daten der beschriebenen Einzelzellklonierungen. Als Ausgangsvektor für die Konstrukte diente der peVRF0HA-Vektor.

Konstrukt	erzeugte positive Pools	Klone insg.	davon gestorben	Klone im <i>Screen</i>	im <i>Western-Blot</i> positiv	Funktionell positiv
Leervektor	3	-	-	-	-	-
wt	10	335	42	293	0	-
sense mut	2	56	5	51	6	4*
as mut	2	253	54	199	19	4

**Tab. 3.2: Übersicht über alle generierten peVRF0HA-p54SAPK $\beta$ -Zellklone**

\* nur vier Klone getestet

#### 3.4.2.4.8 Zusammenfassung der stabilen Transfektionsergebnisse

Mit Hilfe des peVRF0HA-Expressionsplasmides war es möglich stabile KB-Einzelzellklone zu generieren, die entweder das Kinase-inaktive HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Protein oder p54SAPK $\beta$  antisense-RNA konstitutiv überexprimieren. Betrachtet man die Bilanz der gefundenen positiven Zellen ausgehend von den untersuchten Klonen und den transfizierten Zellpopulationen, zeigt sich eine sehr geringe Effizienz bei der Erzeugung stabiler KB-Klone. Die Gründe für die niedrige Ausbeute sind die sehr niedrige Transfektionseffizienz bei KB-Zellen, und die zusätzlich empirisch ermittelte Tatsache, daß eine stabile Fremdgen-Integration nur bei einer von  $10^4$  Zellen zu erwarten ist (Ausubel *et al.*, 1996). Außerdem kann die unphysiologische konstitutive Überexpression des Kinase-inaktiven HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Proteins oder der SAPK $\beta$ -antisense-RNA einen Nachteil bei der Selektion von Zellen darstellen.

Die Untersuchungen der vielen Zellklone zeigte auch, daß nur eine kombinierte Testung der Klone sinnvoll ist. Nicht nur der Nachweis der Überexpression von HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) auf Proteinebene oder die Detektion der Abnahme der endogenen SAPK/JNK-Proteine durch Überexpression von SAPK $\beta$ -antisense-RNA ist wichtig, auch

der spezifische Nachweis eines funktionellen Effektes der Überexpression ist erforderlich. Mit Hilfe des Antikörpers Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3]) wurden im *Western-Blot* parallel endogene und Fremd-Gen Expression dargestellt. Die Messung der JNK-Aktivierung erfolgte mit quantitativen GSH-*Beads*-Kinase-*Assays*.

### 3.5 Charakterisierung ausgewählter Zellklone

Im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe der zwei völlig verschiedenen molekularbiologischen Ansätze (Überexpression von Protein bzw. antisense-RNA) sense- und antisense-Klone aus Zell-Pools über das *Limiting Dilution* Verfahren generiert wurden, die eine partielle Hemmung der SAPK/JNK-Aktivierung aufwiesen. Einige dieser Zellklone wurden exemplarisch genauer betrachtet.

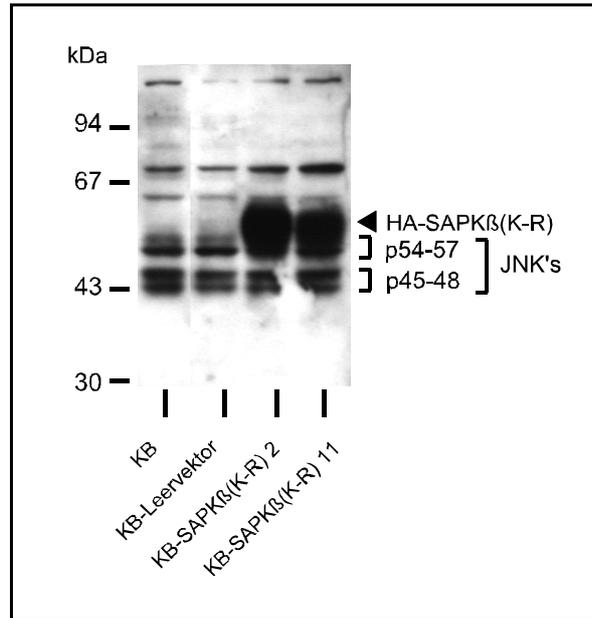
#### 3.5.1 Charakterisierung der KB-p54SAPK $\beta$ (K-R) sense Zellklone 2 und 11

##### 3.5.1.1 Nachweis der stabilen konstitutiven Expression von HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein

Da die generierten Zellklone über einen längeren Zeitraum kultiviert und analysiert wurden, wurde während dieses Zeitraumes die Überexpression mittels *Western-Blot* mehrmals kontrolliert. Hierbei wurde festgestellt, daß der stark überexprimierende Klon 2 stabil konstitutiv exprimierte. Dagegen konnte man beim schwächer exprimierenden Klon 11 nach mehreren Monaten kein Mutanten-Protein mehr nachweisen. Daher wurden in regelmäßigen Zeitabständen, d.h. ca. alle 4 Monate, neue Zellen dieses Klons für Experimente aufgetaut.

Im allgemeinen wurden die Zellklone nur für Experimente eingesetzt, wenn sichergestellt war, daß sie das Kinase-inaktive HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein überexprimieren.

Die folgende Abb. 3.25 zeigt die stabile Überexpression der zwei analysierten Zellklone im Vergleich zu Leervektor-transfizierten und nicht transfizierten KB-Zellen.



**Abb. 3.25: Stabile Überexpression von HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein**

Western-Blot einer 10 % SDS-PAGE; aufgetragen wurden pro Bahn 100  $\mu$ g Gesamtzellextrakt (Triton-Lysepuffer, 15.000 x g).

Färbung mit Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3])

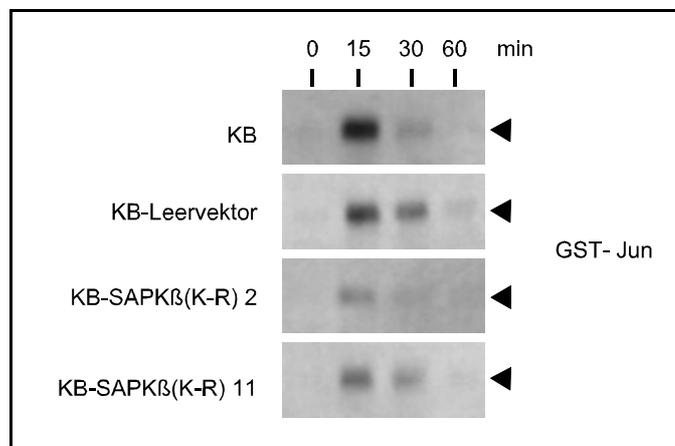
3.5.1.2 Nachweis der Kinase-Inaktivität des überexprimierten Proteins im *In-Gel-Kinase-Assay*

Die Analyse von Triton-Lysaten, aus unstimulierten und stimulierten (10 ng/ml IL1 $\alpha$ , 15 min bis 1 h) Zellklonen, in einem *In-Gel-Kinase-Assay* mit GST-c-Jun als Substrat zeigte, daß das überexprimierte Protein keine Kinaseaktivität besitzt, die endogenen Kinasen aber normal phosphorylieren. Diese Ergebnisse sind hier nicht dargestellt, sie bestätigten sich aber bei den SAPK/JNK-Assays mit Ganzzellextrakten aus nicht stimulierten Zellklonen (siehe Abb. 3.26).

Dieser Befund ist von großer Bedeutung, da eine überexprimierte Kinase-Mutante, die eine normale Restaktivität besitzt, zu einer Erhöhung der basalen Kinaseaktivität führen kann. Bei den sense Zellklonen, die das HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein ohne Restaktivität überexprimieren, ist die basale, endogene Kinaseaktivität unbeeinflusst.

### 3.5.1.3 Analyse der IL-1 abhängigen SAPK/JNK Aktivierung

Mit Hilfe des *GSH-Beads-Assays*, ein empfindlicher und sehr quantitativer Kinase-Assay, wurden unstimulierte und stimulierte (10 ng/ml IL-1 $\alpha$ , 15 min) Ganzzellextrakte und zytosolische Fraktionen aus Kernpräparationen untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei beiden sense Zellklonen die IL-1 abhängige Stimulation der SAPK/JNK Aktivität um 50 % erniedrigt ist, unabhängig von der Lysatpräparation. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Phospho-Imager. Die folgende Abb. 3.26 zeigt die Autoradiographien des Experimentes mit zytosolischen Fraktionen.



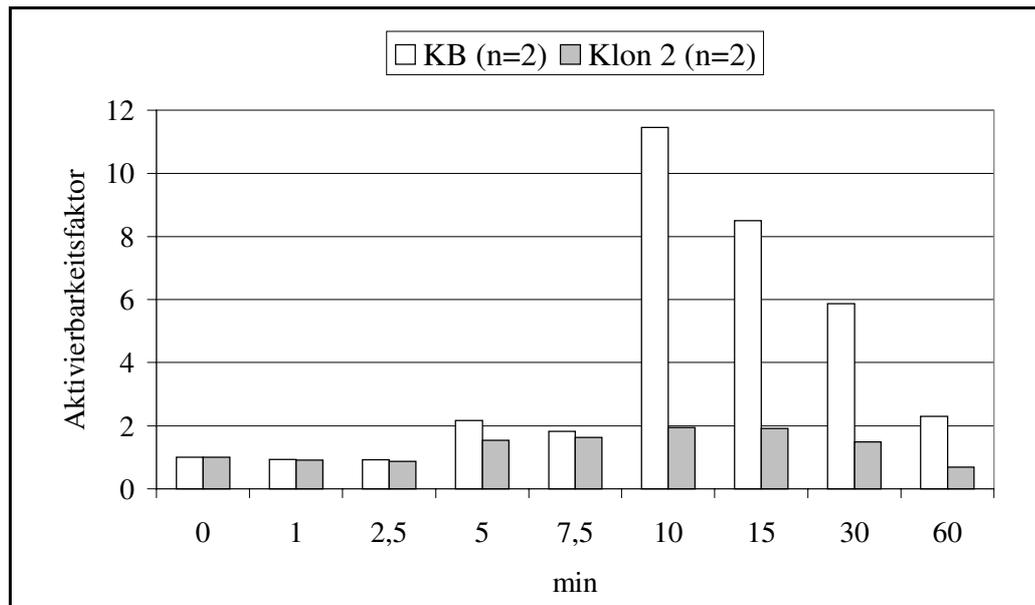
**Abb. 3.26: Nachweis der verminderten JNK-Aktivierung in stabilen sense Zellklonen**

*GSH-Beads-Assay* (Substrat: GST-c-Jun) mit 30  $\mu$ g Zytosol (aus Kernextraktpräparationen) pro Ansatz

Dargestellt ist die Exposition einer Autoradiographie, die hier untereinander dargestellt wird.

Die obige Abbildung zeigt in allen Zellen eine gleichmäßige transiente IL-1 abhängige SAPK/JNK Aktivierung. Wie in den nicht transfizierten KB-Zellen wird auch in den Klonen die SAP-Kinaseaktivität nach 1 h herunterreguliert, obwohl das Kinase-inaktive HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein konstitutiv überexprimiert vorliegt. Die basale Kinaseaktivität der Zellklone ist vergleichbar mit der nicht transfizierter KB-Zellen, insofern ist auch hier gezeigt, daß die überexprimierte Kinase-inaktive Mutante keine eigene Restaktivität mehr besitzt.

Die folgende Grafik gibt einen Überblick über die Kinetik der IL-1 abhängigen SAPK/JNK Aktivierung. Bei KB-Zellen liegt das Maximum der Kinaseaktivität bei 10-15 min und erreicht nach 60 min wieder den basalen Bereich.



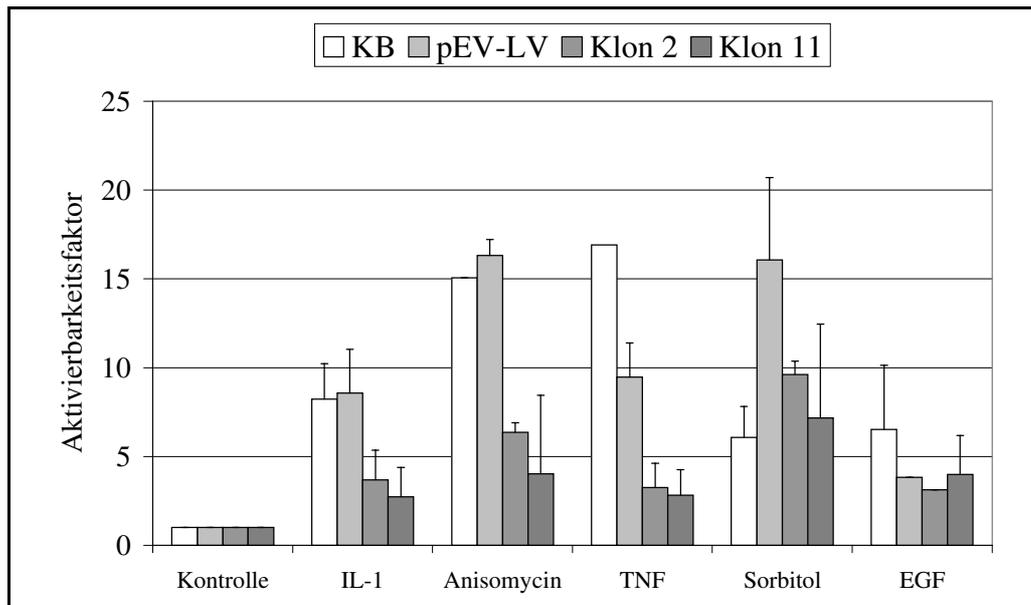
**Abb. 3.27: Messung der JNK-Aktivierung in einer IL-1-Zeitkinetik**  
*GSH-Beads-Assay* (Substrat: GST-c-Jun) mit 30 µg Ganzzellextrakt pro Ansatz

#### 3.5.1.4 Analyse der SAPK/JNK Aktivierung durch verschiedene Stimuli

Triton-Lysate aus unstimulierten und 15 min stimulierten KB-Zellen, Leervektor-transfizierten Zellen und den sense Zellklonen 2 und 11 wurden in *GSH-Beads-Assays* (mit GST-c-Jun als Substrat) analysiert. Als Stimuli wurden IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml), Sorbitol (500 mM), Anisomycin (5 µg/ml), TNF (1000 U/ml) und EGF (50 ng/ml) eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Phospho-Imager.

Die Grafik auf der nächsten Seite zeigt, daß bei IL-1, Anisomycin und TNF die SAK/JNK-Aktivierung in den Zellklonen um mehr als 50 % vermindert ist. Die Sorbitol-Stimulation stellt einen zellulären Streß dar, der p38 MAP Kinase und SAPK/JNK's aktiviert. Hierbei verhalten sich die Klone wie nicht transfizierte KB-Zellen, auffällig sind hierbei nur die stärker aktivierten Leervektor-Zellen.

Nach Stimulation mit EGF, ein sehr schwacher SAPK/JNK-Aktivator, ist in den Zellklonen die SAPK/JNK Aktivierung nicht ganz so stark vermindert (ca. 40 %) wie bei den anderen Stimuli.



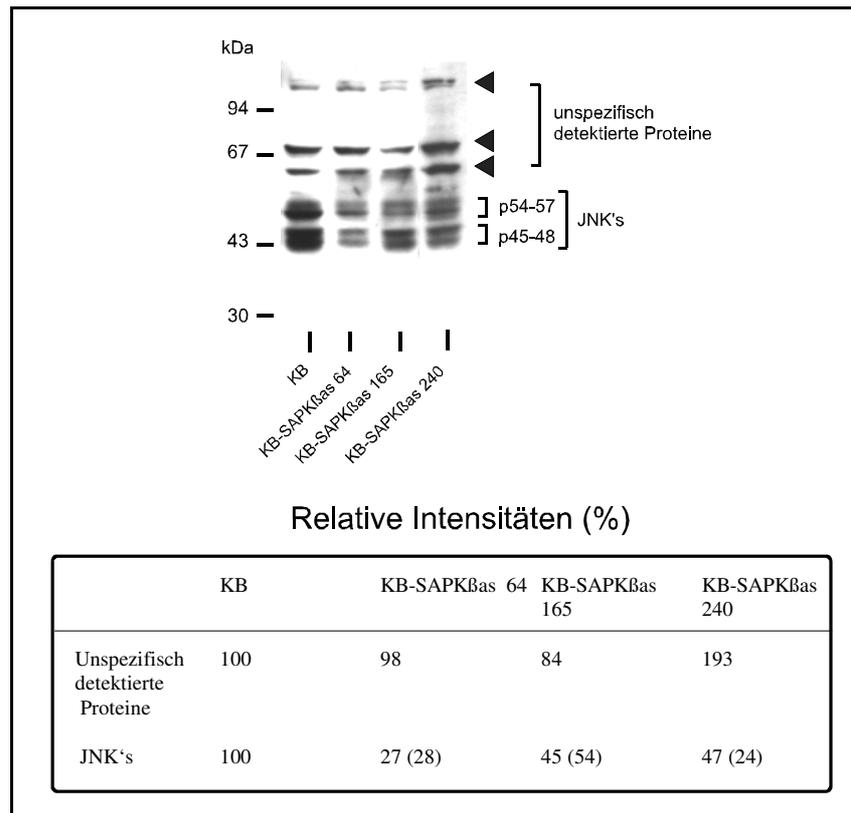
**Abb. 3.28: Messung der JNK-Aktivierung durch verschiedene Stimuli**

Dargestellt sind quantitative Auswertungen von *GSH-Beads-Assays* (30 µg Ganzzellextrakt pro Ansatz; Substrat: GST-c-Jun).

### 3.5.2 Charakterisierung der p54SAPKβ(K-R) antisense Zellklone 64, 165 und 240

#### 3.5.2.1 Nachweis der stabilen konstitutiven Expression von p54SAPKβ(K-R) antisense-RNA auf Proteinebene

Wie auch schon bei den sense Zellklonen erwähnt, wurden auch die kultivierten und für Experimente eingesetzten antisense-Zellklone (64, 165, 240) überprüft, um sicherzustellen, daß die Klone noch die antisense-RNA überexprimieren. Dazu wurden im Falle der antisense-Klone zytosolische Extrakte (100 µg) im *Western-Blot* eingesetzt und die endogene JNK-Veränderung densitometrisch quantifiziert. Durch den Vergleich mit unspezifischen Proteinen (die drei oberen Banden in der Abb. 3.29) und der Expression der endogenen JNK-Proteine in nicht transfizierten KB-Zellen können relative Intensitäten berechnet werden.



**Abb. 3.29: Nachweis der Verminderung endogener JNK-Proteine in stabilen antisense-Zellklonen**

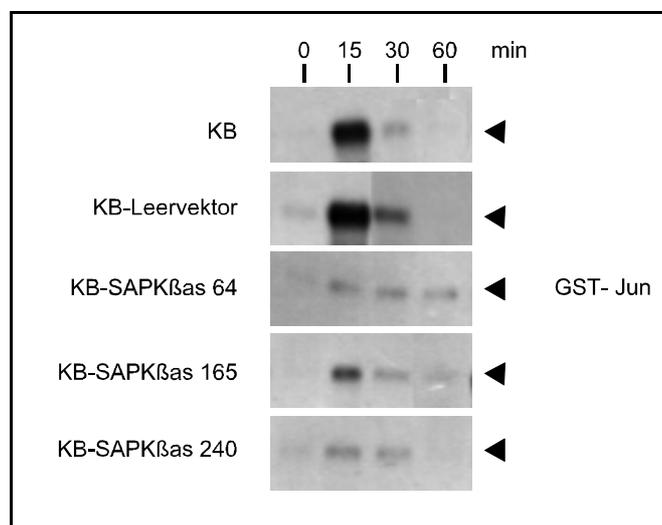
Oberer Teil: *Western-Blot* einer 10 %igen SDS-PAGE; 100 µg zytosolischer Extrakt pro Bahn

Unterer Teil: Densitometrische Auswertung der Proteinbanden, die auf unspezifisch detektierte Proteine normalisierten relativen Intensitäten stehen in Klammern.

In der obigen Abbildung erkennt man bei den untersuchten antisense-Zellklonen die deutliche Verminderung der endogenen JNK-Proteine im Vergleich zu nicht transfizierten KB-Zellen. Durch die quantitative densitometrische Auswertung der endogenen JNK-Banden und ihre Normalisierung auf unspezifisch detektierte Proteinbanden wird der visuelle Eindruck in Zahlen verdeutlicht. Geht man von einer normalen, 100 %igen endogenen JNK-Expression in KB-Zellen aus, so werden bei dem antisense-Klon 240 nur noch 24 % endogene JNK-Proteine exprimiert, bei antisense-Klon 64 sind es nur 28 %. Somit werden bei diesen beiden antisense-Klonen die endogenen JNK's auf Proteinebene um über 70 % vermindert. Der antisense-Klon 165 zeigt eine 46 %ige Verminderung der endogenen JNK-Proteine.

### 3.5.2.2 Analyse der IL-1 abhängigen SAPK/JNK Aktivierung

In *GSH-Beads-Assays* wurde anhand von zytosolischen Extrakten, gewonnen bei Kernpräparationen, der Einfluß der p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense RNA in den Zellklonen im Vergleich zu nicht transfizierten und Leervektor-transfizierten KB-Zellen untersucht. Die Stimulation mit IL-1 $\alpha$  erfolgte zwischen 15 min bis 1 h. Hierbei zeigte sich, daß die SAPK/JNK Aktivierung in den Zellklonen deutlich vermindert ist. Im Vergleich zu den sense Klonen (siehe Abb. 3.26) zeigen diese antisense-Klone eine stärkere Aktivitätsverminderung.

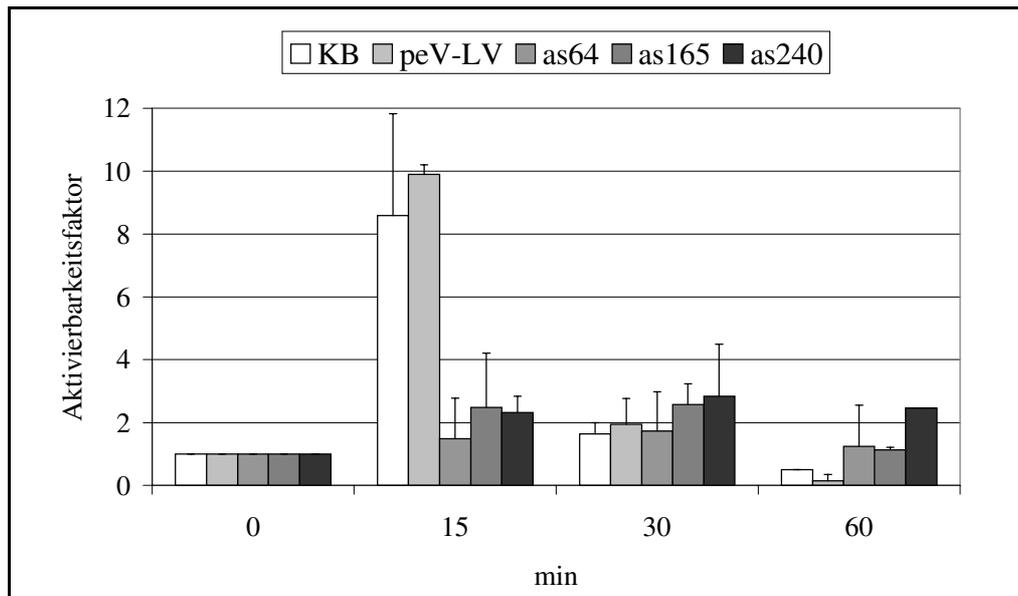


**Abb. 3.30: Nachweis der verminderten endogenen JNK-Aktivierung in stabilen antisense-Zellklonen**

*GSH-Beads-Assay* (Substrat: GST-c-Jun) mit 30  $\mu$ g Zytosol (aus Kernextraktpräparationen) pro Ansatz

Dargestellt ist die Exposition einer Autoradiographie, die hier untereinander dargestellt wird.

Auch bei der Betrachtung der IL-1 abhängigen Aktivierbarkeit über 15 min bis 60 min zeigen die antisense-Klone, wie auch schon die sense Klone, überhaupt keine veränderte Kinetik.



**Abb. 3.31: Messung der JNK-Aktivierung stabiler antisense-Zellklone in einer IL-1-Zeitkinetik**

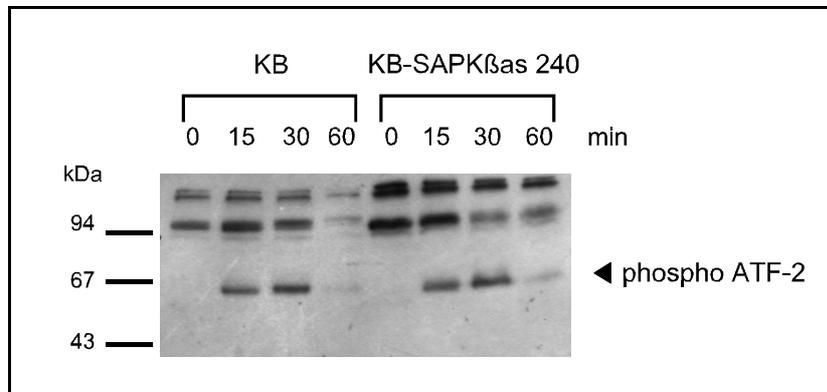
Dargestellt sind quantitative Auswertungen von *GSH-Beads-Assays* (pro Ansatz 30 µg Zytosol aus Kernpräparationen; Substrat: GST-c-Jun).

### 3.5.3 Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2

Zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 müssen Thr 69 und Thr 71 phosphoryliert werden, dies kann sowohl durch SAPK/JNK's als auch durch p38 MAP Kinase erfolgen. In diesem Experiment sollte der Einfluß der Überexpression von Kinase-inaktivem HA-p54SAPKβ(K-R) Protein oder antisense-RNA in den Klonen auf die ATF-2-Phosphorylierung untersucht werden. Dazu wurden von Kontrollzellen, dem sense Klon 2 und dem antisense Klon 240 unstimulierte und stimulierte (15 bis 60 min) Gesamtzelleextrakte (Triton-Lysepuffer) und Kernextrakte hergestellt und der Transkriptionsfaktor auf Proteinebene im *Western-Blot* nachgewiesen. Mit Hilfe von Antikörpern, die zwischen nicht phosphoryliertem und phosphoryliertem Protein unterscheiden, konnte die IL-1 abhängige Aktivierung in Gesamtlisat und Kernfraktion nachgewiesen werden.

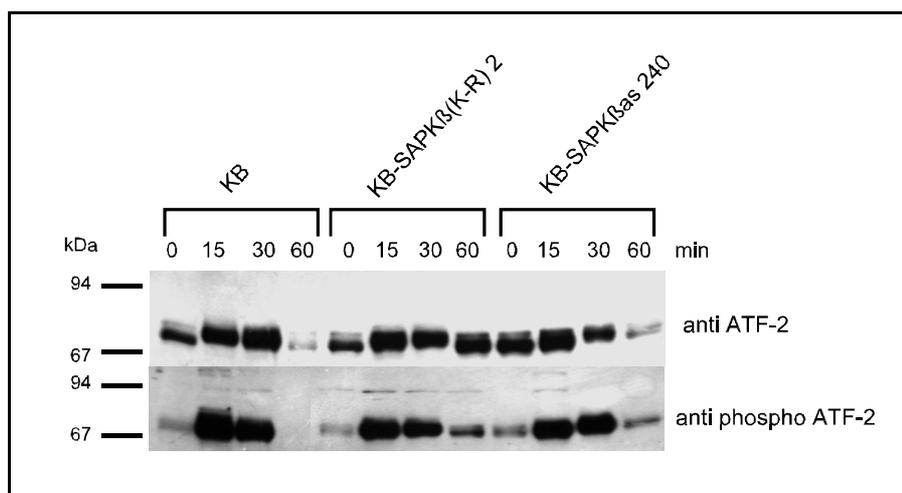
Die Untersuchungen zeigten, daß in den Zellklonen der Transkriptionsfaktor genauso aktiviert wird wie in den Kontroll-Zellen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt einen *Blot* mit Gesamtzellextrakt-Proben und der phospho-spezifischen ATF-2 Färbung.



**Abb. 3.32: Nachweis des Transkriptionsfaktors ATF-2 in Ganzzellextrakten**  
*Western-Blot* einer 10 %igen SDS-PAGE; 100 µg Triton-Proteinlysat pro Bahn  
 Färbung mit anti-phospho ATF-2

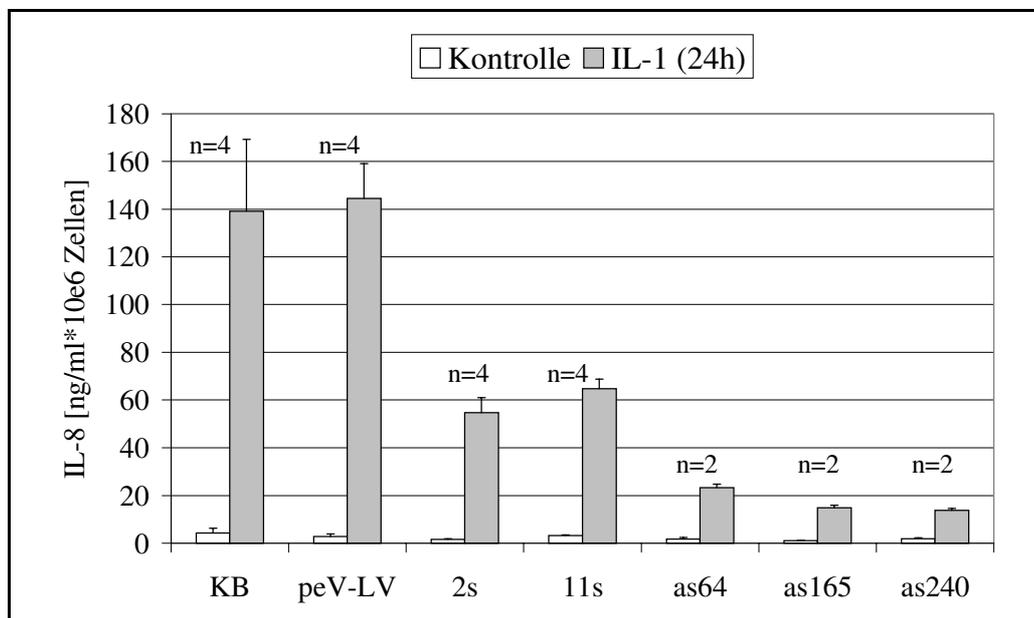
Die untere Abbildung zeigt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors in Kernextrakten von nicht transfizierten KB-Zellen, einem sense und antisense Zellklon. Man sieht auch hier die normale ATF-2 Aktivierung in allen untersuchten Zellen. Bei sense Klon 2 fällt auf, daß die Kinetik des nicht phosphorylierten Proteins verlängert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Beobachtung aber nicht näher untersucht.



**Abb. 3.33: Nachweis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 in Kernextrakten**  
*Western-Blot* einer 10 %igen SDS-PAGE; 100 µg Kernfraktion pro Bahn  
 Oberer Teil: Färbung mit anti-ATF-2  
 Unterer Teil: Färbung mit anti-phospho ATF-2

### 3.5.4 Messung der IL-1 induzierten IL-8 Sekretion

In vielen Zelltypen, wie z.B. auch in Keratinozyten, wird das Chemokin IL-8 nach IL-1 Stimulation verstärkt produziert (Fujisawa *et al.*, 1997). Zur Untersuchung der IL-1 abhängigen Genexpression von IL-8 wurde bei KB-Zellen, Leervektor-transfizierten Zellen, sowie bei sense und antisense Klonen die IL-8 Sekretion nach 24stündiger IL-1-Behandlung im ELISA gemessen. Eine deutlich verminderte IL-8 Produktion konnte sowohl in den HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) überexprimierenden sense Klonen nachgewiesen werden, als auch bei den Klonen, die p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense-RNA überexprimieren.



**Abb. 3.34: Messung der IL-8 Sekretion in stabilen Zellklonen**

Vergleicht man bei den sense Klonen die überexprimierte Proteinmenge (Abb. 3.25), die verminderte JNK-Aktivierung (Abb. 3.26) und die Verminderung der IL-8 Sekretion (Abb. 3.34), so fällt auf, dass diese Werte korrelieren. Die gleichen Zusammenhänge findet man auch bei der verminderten endogenen JNK-Proteinmenge (Abb. 3.29), der JNK-Aktivierung (Abb. 3.30) und der IL-8 Sekretion (Abb. 3.34) bei den verschiedenen antisense-Klonen.

### 3.5.5 Charakterisierung der Regulation des IL-8 Genes auf transkriptioneller Ebene durch Transfektion von Reportergenkonstrukten

Um den Einfluß der transfizierten p54SAPK $\beta$ (K-R) Mutante auf der transkriptionellen Ebene zu untersuchen, wurden spezielle Reportergenkonstrukte transfiziert. Dabei wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren (aktivierend oder hemmend) an spezifische Verstärkerelemente von Promotoren nachgewiesen. Zusammen mit einer TATA-Box kontrollieren die Verstärker-Elemente (*Enhancer*) die Expression eines Reportergens (hier Luziferase), das stromabwärts lokalisiert ist. Das Reportergen ersetzt dadurch das zelluläre Gen und durch den quantitativen Nachweis des Reportergenproteins können Rückschlüsse auf die Regulation des Systems gezogen werden.

Der Promotor des IL-8 Gens besteht aus drei bekannten DNA-Bindungssequenzen (NF $\kappa$ B, AP-1 und NF-IL6) die am 5'-Ende in einem kleinen Bereich lokalisiert sind. Ausgehend von der gemessenen verminderten IL-8 Sekretion in den Zellklonen, sollte mit Hilfe von zwei Reportergenen, die Teile des minimalen IL-8 Promotors enthielten, die transkriptionelle Regulation näher untersucht werden.

#### 3.5.5.1 Transfektion des NF $\kappa$ B-Promotor-Konstruktes

Bei dem Reportergenplasmid pNF $\kappa$ B<sub>luc</sub> besteht das Verstärker-Element aus einer fünf-fachen Wiederholung der NF $\kappa$ B-DNA-Bindungssequenz. Im Experiment wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA in KB-Zellen, peV-Leervektor-Zellen, HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Klon 2 sense und HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Klon 240 antisense transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt und ein Teil der Ansätze mit IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml) für 6 h stimuliert. Anschließend wurden alle Zellansätze getrennt in Luziferase-Puffer lysiert (80  $\mu$ l pro 6-Loch-Ansatz). Es erfolgte eine Proteinbestimmung der Proben und die Messung der Luziferase-Aktivität im Luminometer.

Da die peV-Leervektor-Kontrollzellen in Anwesenheit von 300  $\mu$ g/ml G418 kultiviert wurden, wurde im Experiment auch der Einfluß des Antibiotikums untersucht. Dazu wurden Ansätze dieser Zellen bei der Transfektion und Stimulation G418 entzogen bzw. zugesetzt.

Bei der Transfektion wurde ein DNA-HBS-Mix für alle Ansätze verwendet. Die einzelnen DNA-Dosper<sup>®</sup>-Gemische wurden für jeden Ansatz separat pipettiert, da es technisch nicht

möglich ist, einen Gesamtansatz für alle Ansätze zu machen; die dafür verwendeten Volumina sind nachteilig für die Komplexbildung.

Zur Kontrolle der Aktivierbarkeit des transfizierten Konstruktes wurden Ansätze mit einem Aktivator (MEKK 1) kotransfiziert. Die dabei gemessenen Luziferaseaktivitäten (nicht dargestellt), zeigten, daß das Reportergen in den Zellen über den IL-1 Signaltransduktionsweg anschaltbar ist.

Da die transiente Transfektion von KB-Zellen sehr schwierig ist, schwankten die erhaltenen Lichteinheiten extrem stark (1.000 – 800.000 relative Lichteinheiten).

Alle gemessenen relativen Lichteinheiten (rel. LE) wurden zuerst auf die jeweilige gemessene Proteinkonzentration bezogen, um Schwankungen bei den Präparationen auszugleichen. Die so erhaltenen Werte (rel. LE /  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) wurden nun anhand zweier Methoden verarbeitet, um die Aktivierbarkeit des Promotors durch IL-1 Stimulation (Aktivierbarkeitsfaktor) zu berechnen.

#### 3.5.5.1.1 Methode 1: Mittelwertbildung

Die Gesamtheit der gemessenen Daten (unstimuliert und stimuliert) wurde getrennt gemittelt. Die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und deren Standardabweichung ( $\sigma$ ) berechneten sich wie folgt.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \qquad \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Aus den erhaltenen Mittelwerten wurde der Faktor der Aktivierbarkeit durch Berechnung des Quotienten (stimuliert durch unstimuliert) ermittelt. Die Standardabweichung des Quotienten berechnete sich aus den einzelnen Mittelwerten und Standardabweichungen nach folgender Formel.

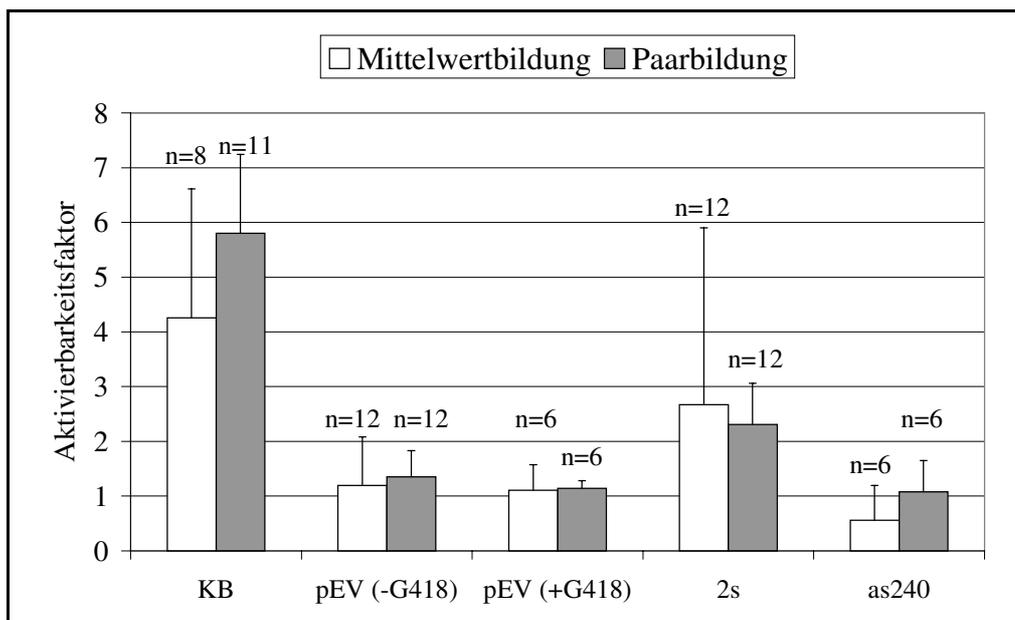
$$\bar{x}_{\text{Aktivierbarkeits-Faktor}} = \frac{\bar{x}_{\text{stimuliert}}}{\bar{x}_{\text{unstimuliert}}}$$

$$\sigma_{\text{Aktivierbarkeits-Faktor}} = \pm \frac{1}{\bar{x}_{\text{unstimuliert}}} \sqrt{\sigma_{\text{stimuliert}}^2 + \left( \frac{\bar{x}_{\text{stimuliert}}}{\bar{x}_{\text{unstimuliert}}} \sigma_{\text{unstimuliert}} \right)^2}$$

### 3.5.5.1.2 Methode 2: Paarbildung

Bei dieser Methode wurden alle Daten nach dem Zahlenwert sortiert. Anschließend wurden Zahlenpaare (unstimuliert-stimuliert) gebildet und der Quotient (Aktivierbarkeitsfaktor) ermittelt. Durch die anschließende Mittelwertbildung aller Quotienten erhielt man die Faktoren und deren Standardabweichung. Hierbei liegt die Idee zugrunde, daß die gebildeten Paare annähernd gleiche Transfektionseffizienzen haben.

Die berechneten Mittelwerte sind in Abb. 3.35 dargestellt. Trotz der großen Standardabweichungen bei beiden Berechnungsmethoden, sind die Mittelwerte sehr ähnlich. Sowohl beide Mutanten-Klone als auch die Leervektor-Zellen zeigen eine verminderte Aktivierbarkeit durch den Stimulus. Bei den Leervektor-Zellen ist kein Einfluß durch das Antibiotikum sichtbar.



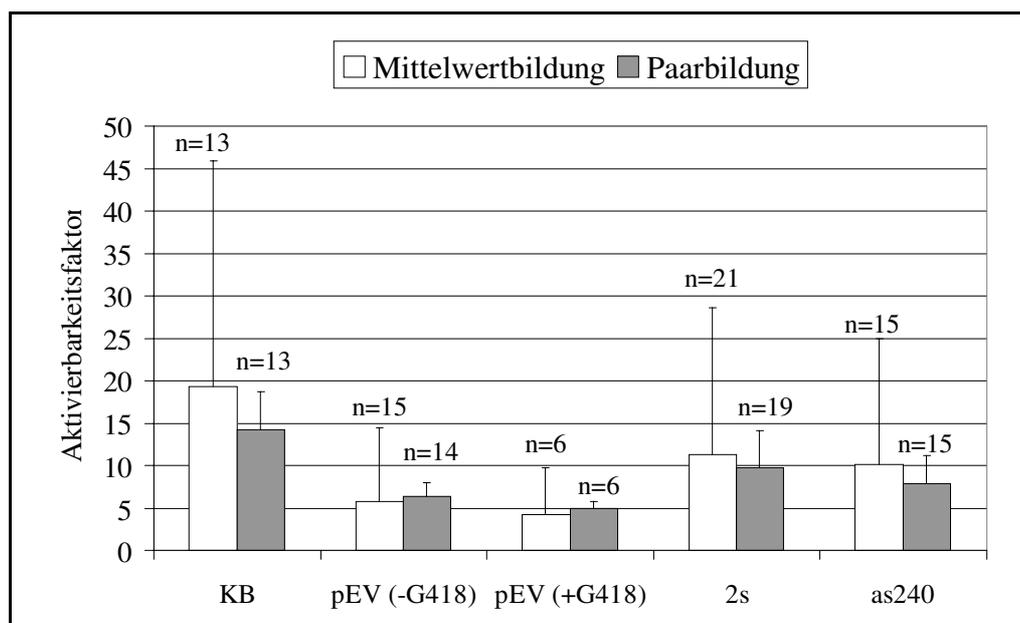
**Abb. 3.35: Reporterogenaktivität nach transienter pNFκBluc-Transfektion**

### 3.5.5.2 Transfektion des IL-8-Promotor-Konstruktes

Der minimale IL-8 Promotorbereich, bestehend aus den AP-1, NF-IL6 und NFκB Sequenzelementen, ist in dem Reportergenkonstrukt puhc133IL8promotorluc enthalten. Zur transienten Transfektion wurden 2,5 µg DNA eingesetzt. Nach 24 h wurde das

Medium mit dem DNA-Lipid-Gemisch entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde erneut das Medium gewechselt und der Stimulus (10 ng/ml IL-1 $\alpha$ ) zugesetzt. Die Zellen wurden nach 6 stündiger Stimulation lysiert (100  $\mu$ l Luziferase-Puffer). Nach Proteinbestimmung und Luziferasemessung wurden die erhaltenen Werte wie unter 3.5.5.1 beschrieben ausgewertet.

Die erhaltenen Mittelwerte zeigen alle eine große Standardabweichung. Die Aktivierbarkeit durch den Stimulus ist bei den Leervektor-Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten KB-Zellen deutlich niedriger. Auch hier ist, wie in der pNF $\kappa$ B-luc Transfektion, kein Antibiotika-Einfluß feststellbar. Die Mutanten-Klone zeigen keine so deutliche Verminderung wie die Leervektor-Zellen. Dargestellt sind die Daten in der Abb. 3.36.



**Abb. 3.36: Reportergenaktivität nach transienter puhc133IL8promotorluc-Transfektion**

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde über zwei verschiedene molekularbiologische Ansätze der IL-1 induzierte Signaltransduktionsweg der SAPK/JNK's in intakten KB-Zellen gehemmt. Hierbei wurde zum einen die Kinase-inaktive Mutante HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) überexprimiert, so daß die geringe endogene SAPK/JNK-Proteinmenge funktionell eine untergeordnete Rolle spielt. Im anderen Ansatz wurde durch Überexpression von SAPK $\beta$  antisense RNA die endogene SAPK/JNK-Expression inhibiert.

Die Basis dieser Experimente war zum einen die Verwendung eines geeigneten eukaryontischen Expressionsplasmides, welches in KB-Zellen die Konstrukte überexprimiert. Zum anderen war die erfolgreiche Transfektion der Konstrukte in das Zellmodell von Bedeutung. Die Etablierung dieser Bedingungen bildeten einen Schwerpunkt dieser Arbeit.

Die generierten Zelllinien wurden auf Beeinflussung ausgewählter IL-1 induzierter Effekte hin untersucht, um funktionelle Konsequenzen der Hemmung des SAPK/JNK Signalweges zu identifizieren.

Für die Diskussion sind die erhaltenen Ergebnisse unter diesen Gesichtspunkten zusammengefaßt.

### 4.1 Darstellung verschiedener Transfektionsmethoden und ihre Optimierung

Ein Ziel war, für die epidermale Karzinoma-Linie KB, die das gewählte Modellsystem darstellte, eine geeignete Transfektionsmethode zu finden. In der Literatur ist diese Zelllinie für transiente Transfektionsexperimente kaum erwähnt, da sie nur mit mäßigem Erfolg transfizierbar ist. Zum Beispiel Kotani *et al.* (1995) mikroinjizierte KB-Zellen transient, Ponnazhagan *et al.* (1995) transfizierte Transient mit einem Lipid und Johnson (1996) benutzte die Kalziumphosphat-Methode. Die Generierung von stabil transfizierten KB-Klonen ist deshalb vorteilhafter, da die Population der nicht transfizierten Zellen entfernt wird. Luhrs *et al.* (1992), Nguyen *et al.* (1994) und Ohmori *et al.* (1992) erzeugten stabile KB-Klone nach Kalziumphosphat-Transfektion, Ohga *et al.* (1996) nach der Lipid-vermittelten Transfektion.

Zur Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode für KB-Zellen wurde die Elektroporation, die Kalziumphosphat-Methode und die über Lipide vermittelte Transfektion getestet und verglichen. Zelllinien, wie HeLa und HEK293, dienten dabei als Vergleichsmodelle, denn diese werden häufig in der Literatur für die verschiedensten Transfektionsexperimente erfolgreich eingesetzt

Für die Elektroporation gilt nach einer empirisch aufgestellten Regel, daß die besten Transfektionsergebnisse erzielt werden, wenn 50 % bis 80 % der Zellen absterben (Andreason, 1988). Die Anwendung dieser Methode zeigte aber auch, daß die gesamte Prozedur ohne Verwendung einer Ladespannung bis zu 30 % der Zellen absterben läßt (Abb. 3.4, Seite 55). Dieser hohe Zellverlust kann ein Problem für transiente Transfektionen darstellen, da sehr große Ausgangszellmengen elektroporiert werden müssen, um noch genügend viele Zellen für die anschließenden Analysen zu erhalten. Mit dieser Methode werden deshalb oft nur stabile Transfektanten generiert.

Die Elektroporation mit einem Reporter gen zeigte, daß nur ein sehr geringer Teil der KB-Zellen erfolgreich transfiziert wurde (siehe Tab. 3.1, Seite 58), so daß diese Methode weder geeignet für transiente Experimente als auch für stabile Transfektionen ist.

Bei der Transfektion von KB-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode nach Standardprotokoll konnten keine höheren Transfektionseffizienzen als mit der Elektroporation erzielt werden (siehe Tab. 3.1, Seite 58), so daß auch diese Methode weniger geeignet erscheint.

Die Lipid-vermittelte Transfektion mit Dosp<sup>®</sup> zeigte nach einer Optimierung, daß ca. 1-5 % KB-Zellen relativ gut reproduzierbar transfiziert werden können (siehe Kapitel 3.1.5, Seite 58). Im Vergleich zu den anderen beiden Methoden liegt diese Effizienz deutlich höher (siehe Tab. 3.1, Seite 58). Zusätzlich zeigte das polykationische Lipid Dosp<sup>®</sup> in der eingesetzten Konzentration keine toxischen Auswirkungen auf die Zellen.

Die Transfektion von KB-Zellen mit Hilfe von Dosp<sup>®</sup> ist im direkten Vergleich mit Elektroporation und Kalziumphosphat-Transfektion die geeignetste Methode und wurde deshalb für die Transfektion der eukaryontischen Expressionsplasmide verwendet.

## 4.2 Überexpression der p54SAPK $\beta$ -Konstrukte mit Hilfe des pcDNA3-Vektors

Nach der transienten Überexpression von p54SAPK $\beta$  als Wildtyp und als Kinase-inaktive (K-R)-Mutante mit Hilfe des pcDNA3-Vektors konnten mRNA-Transkripte des Fremdgens nachgewiesen werden (Abb. 3.12, Seite 67). Die Analyse auf Proteinebene zeigte dagegen kein überexprimiertes Protein. Dies läßt den Schluß zu, daß die Expressionsplasmide in die KB-Zelle transfiziert und dort auch transkribiert wurden. Die Transkriptmenge war aber so gering, um das p54SAPK $\beta$  Fremdprotein (Wildtyp oder (K-R)-Mutante) in großer Menge zu produzieren. Es wurden deshalb keine zellulären Effekte verursacht. Inwieweit die Translation überhaupt stattfand, konnte nicht beurteilt werden, da das überexprimierte Protein im *Western-Blot* die gleiche Größe hatte, wie die endogenen SAPK/JNK Proteinisoformen mit 55 kDa. Es kann ausgeschlossen werden, daß die kodierende Sequenz an der falschen Stelle ein Stopkodon hat, da die klonierten Konstrukte durch Expression in *E. coli* überprüft wurden, hierbei konnte ein funktionelles Protein nachgewiesen werden.

Ein großes Problem bei den transienten Experimenten in KB-Zellen ist die sehr niedrige Transfektionseffizienz von 1-5 %. Bei Inhibition der SAPK/JNK-Aktivität in 5 % der Zellen, ist die die endogene Kinase in den restlichen 95 % der Zellen aktiv. Bei stabil transfizierten Linien jedoch besitzen alle Zellen eine Hemmung der endogenen Kinaseaktivität.

Die generierten stabilen pcDNA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Mutanten-Zellklone zeigen eine deutliche Hemmung der endogenen JNK-Aktivierung. Zusätzlich weisen sie auch eine prägnante Hemmung der Hsp27 Phosphorylierung auf (Abb. 3.13, Seite 69). Beides sind Effekte die über getrennte Signalkaskaden verlaufen, den SAPK/JNK's und der p38 MAP Kinase, die über gemeinsame Aktivatoren reguliert werden können (siehe Abb. 1.1, Seite 5). Beim Nachweis der stabilen Integration der transfizierten Fremd-DNA konnte zum einen der verwendete Selektionsmarker, das Neomycinresistenzgen, nachgewiesen werden. Zum anderen wurde auch ein Teil der p54SAPK $\beta$ (K-R) Sequenz integriert, wobei der Bereich der kodierenden Startregion nicht detektierbar war (Abb. 3.14, Seite 71). Diese Ergebnisse zeigen, daß die erzeugten Zelllinien zwar deutliche Defekte in zwei verschiedenen IL-1 abhängigen Signaltransduktionskaskaden aufweisen, die Ursache aber nicht geklärt ist. Wahrscheinlich wurden die defekten Zelllinien über die klonale Selektion erzeugt. Die generierten Linien wurden deshalb nicht näher charakterisiert.

Die Experimente mit dem eukaryontischen Expressionsplasmid pcDNA3 zeigten, daß sowohl bei transienter als auch stabiler Transfektion der Nachweis des überexprimierten p54SAPK $\beta$  Proteins nicht möglich ist. Es ist denkbar, daß dieses Plasmid nicht geeignet ist für die Überexpression von Proteinen in KB-Zellen, dies wurde aber nicht näher untersucht.

### 4.3 Überexpression der p54SAPK $\beta$ -Konstrukte mit Hilfe des peVRF0-Vektors

Die Verwendung des peVRF0-HA bzw. -HA/His-Vektors bietet die Möglichkeit, das Kinase-inaktive Protein p54SAPK $\beta$ (K-R) als ein HA- bzw. HA/His-Fusionsprotein zu exprimieren. Im *Western-Blot* ermöglicht dieses Epitop-tag die spezifische Detektion des Proteins mit Antikörpern gegen das Epitop. Zusätzlich wird das apparente Molekulargewicht des exprimierenden Proteins p54SAPK $\beta$ (K-R) erhöht. Dies ist ein großer Vorteil, denn neben der überexprimierten SAP Kinase  $\beta$ (K-R) sollten auch die endogenen SAPK/JNK-Proteine parallel beobachtet werden, um einen möglichen Einfluß auf diese Kinasemengen festzustellen. Deshalb wurde in dieser Arbeit fast ausschließlich der Antikörper Ab681 (anti-[SAPK $\beta$ ; JNK1, 2, 3]) zur Detektion aller exprimierten SAPK/JNK-Proteine verwendet (siehe Kapitel 3.3, Seite 62).

Die transiente Transfektion mit den peVRF0HA(bzw. HA/His)-Konstrukten ermöglichte die Überexpression und den Nachweis des HA(bzw. HA/His)-p54SAPK $\beta$  Proteins (Wildtyp und (K-R)-Mutante) (Abb. 3.16, Seite 74), es konnten aber keine Effekte bei der Phosphorylierung der SAPK/JNK-Proteine (JNK-Aktivierung) festgestellt werden (Abb. 3.17, Seite 75). Dies könnte an der niedrigen Transfektionseffizienz liegen.

In den generierten stabil transfizierten Zellpools gelang es, sowohl die Überexpression des mutierten Fremdproteins HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) nachzuweisen, als auch die Abnahme der endogenen JNK-Proteine, hervorgerufen durch die Überexpression der antisense-RNA, zu detektieren (Abb. 3.18, Seite 77). Da es sich bei den Pools aber um eine gemischte Zellpopulationen handelt, in denen Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke, sowie auch Zellen mit anderen Defekten vorliegen können, wurden Einzelzellklone mit stabil im

Genom integriertem sense- oder antisense-Konstrukt, generiert. Hierbei zeigte sich, daß die Anzahl der Zellen, die eine Überexpression auf Proteinebene oder auf RNA-Ebene zeigten, nur bei 10 % lag (Tab. 3.2, Seite 83). Die restlichen 90 % der Zellen in den Pools hatten nur das Neomycinresistenzgen integriert und besaßen möglicherweise auch andere Defekte.

In den generierten Einzelzellklonen mit stabil integriertem sense-Konstrukt, konnte das überexprimierte Kinase-inaktive HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.20, Seite 78). Die Abnahmen der endogenen Kinasemenge, verursacht durch die Überexpression der p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense-RNA, war schwieriger zu detektieren (Abb. 3.21, Seite 79). Ein Grund dafür sind die sehr geringen endogenen Kinasemengen der SAPK/JNK-Isoformen (Kracht *et al.*, 1994 a), so daß für eine Detektion im *Western-Blot* mindestens 100  $\mu$ g Gesamtprotein nötig war; für das antisense *Screening* wurden 200  $\mu$ g eingesetzt. Weitere Probleme stellten die Linearität der ECL-Reaktion und die Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers dar. Eine andere Möglichkeit zur Detektion der Proteinabnahme wäre die *in vivo* Markierung mit [<sup>35</sup>S]Methionin gewesen; zur Testung der generierten 199 antisense Zellklone konnte aus technischen Gründen diese Methode nicht eingesetzt werden.

Aufgrund der schwierigen Detektion einer Reduktion der endogenen SAPK/JNK-Proteinmenge im *Western-Blot*, wurden 19 antisense Zellklone ausgewählt und deren JNK-Aktivierung in quantitativen GSH-*Beads*-Kinase-Assays gemessen. Dadurch sollten Klone gefunden werden, die bei einer verminderten endogenen SAPK/JNK-Proteinmenge auch eine verminderte IL-1 abhängige JNK-Aktivierung aufweisen. Es wurden nur Klone näher charakterisiert, die beide Forderungen erfüllten, obwohl die Messung der JNK-Aktivierung zeigte (Abb. 3.22, Seite 81), daß nicht alle Klone den gewünschten funktionellen Effekt besitzen. Drei antisense Klone zeigten sogar eine verstärkte Aktivierbarkeit. Die gleichen Strategien wurden bei der Aufklärung der Signaltransduktionswege der MAPKK (Seger *et al.*, 1994) und der ERK's (Pages *et al.*, 1993) eingesetzt. Ob die Zellklone mit der verstärkten Aktivierbarkeit noch mögliche andere Defekte besitzen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.

Diese Klonierungsexperimente zeigten, wie auch schon die mit dem pcDNA3-Vektor, daß gezielte Selektion und Klonierung Zelllinien mit unterschiedlichen Defekten erzeugen kann.

#### 4.4 Charakterisierung ausgewählter Zellklone

Bei der stabilen konstitutiven Überexpression des Kinase-inaktiven HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Proteins in den KB-Zellklonen 2 sense und 11 sense konnte eine 50 %ige Verminderung der endogenen SAPK/JNK Aktivierung *in vivo* nach IL-1 Stimulation festgestellt werden (Abb. 3.26, Seite 86). Weiterhin konnte ein wichtiger Aspekt gezeigt werden. Das über-exprimierte Protein weist keine Restaktivität auf, wodurch die basale Kinaseaktivität nicht erhöht wird (Kapitel 3.5.1.2, Seite 85; Abb. 3.26, Seite 86). Das exprimierte Protein, welches mit einem HA-Epitop versehen ist, ist gleichermaßen im Zytosol und im Kern lokalisierbar, der Transport ist nicht durch das Epitop-*tag* behindert. Bei den analysierten stabilen antisense-Zellklonen 64, 165 und 240, die konstitutiv die p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense-RNA überexprimieren, ist die Inhibition der JNK-Aktivierung *in vivo* noch stärker als in den sense Mutanten-Zellklonen (Abb. 3.30, Seite 90).

Bei allen Einzelzellklonen kann davon ausgegangen werden, daß diese gemessene verminderte JNK-Aktivierung durch die Überexpression des stabil integrierten p54SAPK $\beta$ (K-R)-Fremdgenes (mit sense- bzw. antisense-Orientierung des *Inserts*) verursacht wird, da die verwendeten molekularbiologischen Ansätze auf völlig verschiedenen Ebenen eingreifen. Der eine auf Proteinebene durch Überexpression einer mutierten Kinase. Bei beiden stabil transfizierten sense Zellklonen konnte eine massive Überexpression des Kinase-inaktiven HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3.25, Seite 85). Im zweiten Ansatz wird durch Überexpression von p54SAPK $\beta$ (K-R) antisense-RNA auf RNA-Ebene eingegriffen, wobei daraus eine bis zu 70 %ige Verminderung der endogenen JNK-Proteinmenge resultiert (Abb. 3.29, Seite 89).

Weiterhin zeigen alle untersuchten stabil transfizierten Klone eine für KB-Zellen typische transiente IL-1 abhängige Zeitkinetik, die Aktivierung der SAPK/JNK's ist nach 15 minütiger Stimulation maximal und nimmt nach 60 min wieder den Basalwert an (Abb. 3.27, Seite 87 und Abb. 3.31, Seite 91). Demnach zeigen die stabilen Zellklone eine normale IL-1 Responsivität und ein zusätzlicher Defekt in dieser Kaskade, verursacht durch die klonale Selektion, ist auszuschließen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß die Expression der spezifischen MAPK Phosphatase MKP1 (siehe Kapitel 1.2), die für die Regulation der Inaktivierung von SAPK/JNK-Proteinen verantwortlich ist, in KB-Zellen und Klonen

gleich ist. Nach IL-1 Stimulation wird die Expression innerhalb von 15 min induziert und über mehrere Stunden aufrechterhalten (Krause *et al.*, 1998).

Ein von den MAP Kinasen unabhängiger IL-1 induzierter Signaltransduktionsweg ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (siehe Kapitel 1.1, Seite 1 und Abb. 1.1, Seite 5). In unserer Arbeitsgruppe konnte durch Gelretardationsanalysen (EMSA) gezeigt werden, daß sowohl in den stabilen Zellklonen, als auch in KB-Zellen, NF $\kappa$ B nach 15 bis 30 minütiger IL-1-Stimulation aktiviert wird, in den Kern transloziert und so an seine Zielsequenz binden kann (Krause *et al.*, 1998). Die IL-1 abhängige NF $\kappa$ B-Aktivierung wird somit nicht beeinflusst von der konstitutiven Überexpression des Kinase-inaktiven Proteins oder der antisense-RNA.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, kann die SAPK/JNK-Signalkaskade über verschiedene Stimuli aktiviert werden. Dabei sind oft auch noch weitere Kaskaden involviert. Welche Kinasen sehr stark oder nur sehr gering aktiviert werden und durch welche Stimuli, ist dabei sehr zellspezifisch. Bei der verwendeten KB-Zelllinie werden durch die rezeptorvermittelte Stimulation mit IL-1 und TNF $\alpha$  vor allem die SAP Kinasen stark aktiviert, aber auch die p38 MAP Kinase wird aktiviert (Freshney *et al.*, 1994; Kracht *et al.*, 1994). Des weiteren ist bekannt das IL-1 in KB-Zellen die ERK's nicht signifikant stimuliert (Kracht *et al.*, 1994). Dagegen können mittels eines hyperosmolaren Schocks, z.B. durch Sorbitol, in allen Zellen SAPK/JNK's und p38 MAP Kinase aktiviert werden. Proteinsynthesehemmer, wie z.B. Anisomycin und Cycloheximid, können ebenfalls SAPK/JNK's *in vivo* aktivieren (Kyriakis *et al.*, 1994). Dies wurde für KB-Zellen mit Anisomycin gezeigt (Zinck *et al.*, 1995). Die eingesetzte Konzentration spielt dabei wohl weniger eine Rolle, denn in murinen Zelllinien konnte gezeigt werden, daß Anisomycin sowohl bei einer Konzentration bei der auch die Proteinsynthese gehemmt werden kann (10  $\mu$ g/ml), als auch in einer subinhibitorischen Konzentration (25-50 ng/ml) SAPK/JNK's und p38 MAP Kinase aktiviert werden (Edwards und Mahadevan, 1992; Hazzalin *et al.*, 1998; Mahadevan und Edwards, 1991). Bei der Verwendung des Wachstumsfaktors EGF ist allgemein bekannt, daß über den EGF-Rezeptor Raf und dann die ERK's aktiviert werden (Robbins *et al.*, 1992; Review: Burgering und Bos, 1995). In bestimmten Zelllinien gibt es dagegen die Beobachtungen, daß EGF über den p38-Signalweg MAPKAPK-2 aktiviert wird (Cano *et al.*, 1994 und 1996); eine andere Arbeitsgruppe konnte die

Aktivierung der SAPK/JNK's mittels EGF nachweisen (Bost *et al.*, 1997). Aus der Literatur gibt es bisher keine Befunde für die Stimulation von KB-Zellen mit EGF.

In Anknüpfung an die aus der Literatur bekannten Stimuli und ihre Signalkaskaden wurden die KB-p54SAPK $\beta$ (K-R) sense Zellklone 2 und 11 mit verschiedenen Stimuli (IL-1, TNF, Anisomycin, Sorbitol, EGF) behandelt und die JNK-Aktivierung in einem GST-c-Jun Kinase-Assay gemessen (Abb. 3.28, Seite 88).

Bei den Zytokinen IL-1 und TNF $\alpha$  lag die Verminderung der JNK-Aktivierung über 50 %. Auch bei der Verwendung von Anisomycin in einer inhibitorisch wirkenden Konzentration, wurde die Kinaseaktivierung deutlich um 50 % gehemmt. Dies zeigt, daß die partielle Hemmung nicht vom Stimulus abhängt, folglich die Kinasekaskade aktivierbar ist, und die Überexpression des integrierten p54SAPK $\beta$ (K-R) (sense bzw. antisense) Fremdgenes direkt die SAPK/JNK-Proteine beeinflusst.

Bei der Verwendung von Sorbitol als Stimulus werden, wie schon erwähnt, SAPK/JNK's und die p38 Kinase aktiviert. Da im Kinase-Assay das für die SAPK/JNK's spezifische Substrat GST-c-Jun verwendet wurde, wird nur dessen aktivierter Anteil gemessen. Vergleicht man zuerst die nicht transfizierten KB-Zellen mit dem Leervektor-transfizierten Zellpool, so fällt auf, das Letzterer dreifach stärker aktiviert wird. Dies läßt den möglichen Schluß zu, daß der Anteil an aktivierter SAP Kinase höher ist als in normalen KB-Zellen. Da es sich bei dem Pool um eine gemischte Zellpopulation handelt, die unter ständigem G418 Selektionsdruck steht, können hier Zellen mit genetischen Defekten vorliegen. Erstaunlich ist, daß dieser Effekt nicht signifikant unter der Verwendung der anderen Stimuli auftritt. Daher ist eher davon auszugehen, daß diese Zellen eine normale SAPK/JNK-Regulation aufweisen. Eine andere mögliche Erklärung ist, daß die gemessenen Werte bei KB-Zellen trotz der Dreifachmessung insgesamt zu niedrig liegen, denn wie aus der Literatur bekannt ist, aktiviert Sorbitol die SAPK/JNK's maximal, es wäre also Faktoren wie bei Anisomycin- oder TNF $\alpha$ -Stimulation zu erwarten. Vergleicht man die stabilen Zellklone nun mit dem Leervektor-transfizierten Pool, so kann man eine partielle Hemmung um 40 % feststellen. Sicherlich sind weitere Experimente sinnvoll, um die Verminderung nach Sorbitol-Stimulation zu verifizieren.

Betrachtet man die JNK-Aktivierung nach EGF-Stimulation, so zeigen die Zellklone eine ähnlich geringe Aktivierung wie die Leervektor-transfizierten Zellpools und sie liegt insgesamt so niedrig wie die partielle Hemmung nach IL-1-Stimulation. In nicht transfizierten KB-Zellen kann eine stärkere Aktivierung festgestellt werden, so daß eine

etwa 40 %ige Verminderung in den Zellklonen und dem Leervektor-transfizierten Pool daraus resultieren. Anzumerken ist, daß die Daten der KB-Zellen und des sense Mutanten-Klones 11 aus drei unabhängigen Messungen erstellt sind, die des Leervektor-Pools und des sense Mutanten-Klones 2 nur aus einem Experiment. Da bei den Dreifachmessungen die Standardabweichungen schon groß sind, lassen die Experimente eher den Schluß zu, daß die SAPK/JNK's nur gering über EGF aktiviert werden und eine partielle Hemmung nicht deutlich detektierbar ist. Weiterführende Analysen können hier Klarheit schaffen. Dieser Punkt wird weiter im Kapitel 4.6 diskutiert.

Die Untersuchungen mit den verschiedenen Stimuli zeigte, daß die verwendeten Leervektor-transfizierten KB-Zellpools sich nicht vollständig wie nicht transfizierte KB-Zellen verhalten. Ein großes Problem ist sicherlich, daß es sich dabei um eine gemischte Zellpopulation handelt, die alle das Neomycinresistenzgen stabil in das Genom integriert haben. Im Gegensatz zu den Zellklonen, werden die Leervektor-transfizierten Zellpools dauerhaft in G418-haltigem Medium kultiviert, welche Auswirkungen dies hat ist bisher nicht bekannt.

Wie die Generierung der Einzelzellklone gezeigt hatte, kann ein Großteil der Leervektor-transfizierten Zellen möglicherweise genetische Defekte aufweisen, die sich auch auf die zu untersuchenden Signaltransduktionskaskaden auswirken können. Um dieses Problem zu klären, könnten Leervektor-transfizierte Einzelzellklone erzeugt und untersucht werden. Bei den antisense-Zellklonen, die untersucht wurden, konnte bei 2 % der generierten und untersuchten Zellklone ein funktionell hemmenden SAPK/JNK-Effekt gefunden werden (Tab. 3.2, Seite 83). Demzufolge müßten mindestens 100 Leervektor-transfizierte Einzelzellklone untersucht werden, um auszusagen, wie viele sich davon wie nicht transfizierte KB-Zellen verhalten. Diese aufwendigen Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Als Kontrollen wurden deshalb immer KB-Zellen und Leervektor-transfizierte Pools verwendet.

Die bisher gezeigten Experimente gaben Aufschluß über den *in vivo* Einfluß der verminderten SAPK/JNK-Aktivierung in den generierten stabil transfizierten sense Mutanten-Klonen 2 und 11 und den stabilen antisense-RNA exprimierenden Klonen 64, 165 und 240. Um zu beurteilen, inwieweit die p38 MAP Kinase-Signaltransduktionskaskade beeinflusst wird, wurden weiterführende Experimente in der Arbeitsgruppe Dr. M. Kracht

durchgeführt. Die Betrachtung der p38 MAP Kinase ist bedeutungsvoll, da sie über die gleichen Zytokine und Streßfaktoren aktiviert wird, wie SAPK/JNK's. Auch werden beide Kinasen über eine gemeinsame MAPK-Kinase (MKK4/SEK1/JNKK1) aktiviert (Derijard *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1994). Obwohl bisher MKK7/JNKK2 als spezifischer SAPK/JNK-Aktivator nachgewiesen wurde (Tournier *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997 (b)), konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, daß bei der Überexpression von MKK7 auch die p38 MAP Kinase aktiviert wird (Holland *et al.*, 1997). Bei physiologischen Ungleichgewichten könnten sich beide Signalwege wechselseitig ergänzen. Durch die große HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Proteinmenge in den sense Mutanten-Klonen, wäre es auch denkbar, daß diese die MAPKK-Aktivatoren bindet und inaktiviert. Der Aktivator könnte dadurch für andere Substrate und für die übergeordneten MAPKKK-Aktivatoren nicht mehr verfügbar sein. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist, daß die SAPK/JNK's und die p38 MAP Kinase gleiche Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF-2, Elk-1, SAP-1, phosphorylieren. Auch diese Substrate könnten durch die Überexpression der mutierten Kinase beeinflußt werden.

Die mutierte Proteinkinase p54SAPK $\beta$ (K-R) besitzt eine intakte regulatorische Domäne und kann durch partiell aufgereinigten Aktivator SAPKK *in vitro* phosphoryliert werden (Krause *et al.*, 1998). Um eine mögliche inhibitorische Wirkung des überexprimierten Kinase-inaktiven HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Proteins in den sense Zellklonen auf den Aktivator SAPKK festzustellen, wurde dessen Aktivierung untersucht. Bisher ist der SAPK/JNK-Aktivator SAPKK in KB-Zellen nicht identifiziert, wahrscheinlich handelt es sich um MKK7 (Finch *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 1997; Lawler *et al.*, 1997). Es zeigte sich, daß die Aktivierung der IL-1 induzierten SAPKK in den stabil transfizierten sense Mutanten-Zellklonen 2 und 11 unbeeinflußt und vergleichbar mit Leervektor-transfizierten Zellen und KB-Zellen war (Krause *et al.*, 1998).

Die Überprüfung der IL-1 abhängigen p38 MAP Kinase-Aktivierung erfolgte in einem Kinase-Assay mit MAPKAPK-2 als Substrat. KB-Zellen, Leervektor-transfizierte Zellen, die sense-Klone (2, 11) und antisense-Klone (64, 165, 240) zeigten hierbei alle eine gleichmäßig starke Substratphosphorylierung. Somit hat die Überexpression des Kinase-inaktiven mutierten Proteins keinen Einfluß auf Aktivatoren dieses Signalweges und es kann auch ausgeschlossen werden, daß die p38 MAP Kinase die partielle SAPK/JNK-Hemmung in den Zellklonen durch verstärkte Aktivität zu ersetzen versucht (Krause *et al.*, 1998).

#### 4.5 Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2

Der Transkriptionsfaktor ATF-2, ein Bestandteil des AP-1-Komplexes, wird durch Phosphorylierung aktiviert. Sowohl die SAPK/JNK's, als auch die p38 MAP Kinase können ATF-2 phosphorylieren (siehe dazu Kapitel 1.2). Um zu beurteilen, inwieweit die partielle Hemmung in den Klonen Einfluß auf die Phosphorylierungsstatus nimmt, wurden in Gesamtzelllysaten und Kernfraktionen nicht phosphorylierte und phosphorylierte ATF-2 Proteine in einer IL-1 abhängigen Zeitkinetik nachgewiesen (Abb. 3.32 und Abb. 3.33, Seite 92). Es zeigte sich, daß in den stabilen sense und antisense Zellklonen, wie auch in den Kontroll-Zellen, der Transkriptionsfaktor innerhalb von 15 min deutlich aktiviert wird. Daher kann man davon ausgehen, daß die verminderte SAPK/JNK-Aktivierung in den Klonen keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung von ATF-2 hat. Zum einen könnte demnach vor allem die p38 MAP Kinase an der Aktivierung beteiligt sein oder eine andere Kinase. Die erst kürzlich gefundene SAPK3 phosphoryliert ATF-2 *in vitro* und ist in KB-Zellen vorhanden (Cuenda *et al.*, 1997). Zum anderen ist die SAPK/JNK-Hemmung in den Klonen nicht vollständig, so daß für die ATF-2 Phosphorylierung vielleicht bereits die geringe Menge an aktivierter endogener SAPK/JNK ausreicht. Dies würde bedeuten, daß die Regulation des Transkriptionsfaktors nicht nachweislich über die aktivierte Menge der Kinase von statten geht, sondern ausschließlich über die Aktivierung. Um diese Frage zu beantworten, wären weiterführende Untersuchungen nötig. Dazu könnte z.B. der p38 MAP Kinase-Signalweg in den Klonen mit Hilfe des spezifischen Inhibitors SB 203580 ausgeschaltet werden (Cuenda *et al.*, 1995).

Ein zusätzliches interessantes Ergebnis liefert die Kinetik des nicht phosphorylierten ATF-2 Proteins. Bei dem sense Zellklon war nach 1h genauso viel Protein detektierbar wie zu Beginn der Aktivierung. Es wird vermutet, daß dies die Folge des Vorhandenseins des überexprimierten Kinase-inaktiven HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Proteins ist. Eine detaillierte kinetische Analyse des ATF-2 Proteins in den Klonen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen.

Wie schon in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.5, Seite 10) werden Transkriptionsfaktoren durch Bindung, Phosphorylierung und Degradation über deren Kinasen reguliert. Eine verlängerte Protein-Halbwertszeit kann allgemein auf dessen Proteinstabilisierung durch bestimmte Faktoren, einen verminderten proteolytischen Abbau, auf transkriptionelle und posttranskriptionelle Vorgänge zurückgeführt werden. Im

Fälle des Transkriptionsfaktors ATF-2 konnte bisher nachgewiesen werden, daß dessen Phosphorylierung durch die SAPK/JNK's den proteolytischen Abbau vermindert. Die Bindung des ATF-2 Proteins an eine nicht aktivierte Kinase fördert dessen Proteolyse (Fuchs *et al.*, 1997). Die in den Klonen überexprimierte inaktive HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) Kinase ist lediglich in der katalytischen Domäne mutiert (siehe Ergebniseinleitung), so daß dessen Aktivierung durch SAPKK nicht beeinflußt wird (Krause *et al.*, 1998). Nach IL-1 Stimulation könnte die Kinase-inaktive HA-p54SAPK $\beta$ (K-R) neben den endogenen Kinasen phosphoryliert werden und Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF-2, binden. Die aktiven endogenen SAP Kinasen/JNK's phosphorylieren den Transkriptionsfaktor und die Mutante verzögert dessen proteolytischen Abbau. Wenn das mutierte Protein im Konzentrationsüberschuß vorliegt, könnte man annehmen, daß das daran gebundene ATF-2 deshalb nicht phosphoryliert werden kann. Dies widerspricht jedoch den Ergebnisse, die zeigen daß ATF-2 in den Zellklonen phosphoryliert wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß nur das mutierte Protein, auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene, ATF-2 stabilisiert. Möglich ist dies auch dadurch, daß die SAPK/JNK's unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus konstitutiv im Nukleus vorkommen (Read *et al.*, 1997). Diese These müßte in weiterführenden Experimenten überprüft werden. Dabei wäre es zum einen sinnvoll zu überprüfen, ob auch andere Transkriptionsfaktoren, z.B. Jun, solch eine Regulation erfahren. Diese Messungen gestalten sich sicherlich als schwierig, da in eigenen Vorversuchen der Transkriptionsfaktor Jun in KB-Zellen nicht nachweisbar war und wahrscheinlich nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird. Zum anderen könnte eine Hemmung der p38 MAP Kinase zeigen, daß die SAPK/JNK's oder noch unbekannte Faktoren, die von den SAPK/JNK's aktiviert werden, eine Rolle spielen.

#### **4.6 Messung der IL-1 induzierten IL-8 Sekretion**

Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8) wirkt chemotaktisch und stimulierend auf Leukozyten und wird in einer Vielzahl von Zellen nach Stimulation durch inflammatorisch wirkende Zytokine produziert (Mukaida *et al.*, 1990 und 1994). In Keratinozyten, zu denen auch die KB-Zellen gehören, wird IL-8 nach IL-1 oder TNF $\alpha$  Behandlung massiv induziert (Fujisawa *et al.*, 1997). Da die Genexpression dieses Chemokins über IL-1 abhängige

Signaltransduktionskaskaden reguliert wird, sollte mit Hilfe der generierten Klone die Rolle der SAPK/JNK's bei der Regulation des IL-8 Genes bestimmt werden.

In allen zuvor charakterisierten Klonen (sense Mutanten-Klon 2 und 11, antisense-RNA überexprimierende Klone 64, 165 und 240) kann eine verminderte IL-8 Sekretion gemessen werden (Abb. 3.34, Seite 93).

Vergleicht man in beiden stabilen sense Zellklonen die verminderte JNK-Aktivierung (Abb. 3.26, Seite 86) und die Abnahme der IL-8 Sekretion mit der Überexpressionsmenge an Kinase-inaktivem HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein (Abb. 3.25, Seite 85), so nehmen beide Werte im gleichen Maße ab, wie das Fremdprotein zunimmt. Die gleichen Wechselwirkung findet man auch bei der Verminderung endogener JNK-Proteinmengen durch antisense-RNA Überexpression (Abb. 3.29, Seite 89), der Inhibition der JNK-Aktivierung (Abb. 3.30, Seite 90) und die Abnahme der IL-8 Sekretion bei den verschiedenen antisense-Zellklonen. In allen Klonen ist die IL-8 Genexpression deutlich beeinflusst durch die partielle Hemmung der endogenen SAPK/JNK-Proteine und korreliert mit der Inhibition. Das IL-8-Gen besitzt in der 5' flankierenden Region die regulatorischen Sequenzelemente AP-1, NF-IL6 und NF $\kappa$ B. Bisher gilt IL-8 als ein im wesentlichen über NF $\kappa$ B reguliertes Gen, so daß die gefundene Beeinflussung des IL-8 Genes über die SAPK/JNK-Aktivierung überraschend ist.

Anknüpfend an die IL-8-Sekretionsdaten wurden in unserer Arbeitsgruppe weitere Experimente durchgeführt. Ein anderes Zytokin, daß auch in Keratinozyten IL-1 abhängig reguliert wird, ist Interleukin-6 (IL-6) (Fujisawa *et al.*, 1997). Dies ist ein pleiotropes Zytokin, welches Wachstum und Differenzierung von B-Zellen fördert, sowie in der Leber die Synthese von Akute-Phase-Proteinen induziert (Hirano *et al.*, 1990; Review: Akira und Kishimoto, 1992). Bei der Messung der IL-1 abhängigen Sekretion von IL-6 zeigen alle stabil transfizierten Zellklone die gleiche Verminderung, die auch bei IL-8 zu beobachten ist (Krause *et al.*, 1998). Bei der Untersuchung der mRNA Expression von IL-6 und IL-8 in IL-1 Zeitkinetik konnten diese Befunde bestätigt werden. KB- und Leervektor-transfizierte Zellen zeigten unstimuliert eine kaum detektierbare basale mRNA-Menge. Innerhalb einer Stunde war ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge festzustellen, wobei diese Menge über 30 h konstant blieb. Die Zellklone zeigten dagegen ein völlig anderes Verhalten. Bei den sense Mutanten-Klonen war nach einer Stunde ein transients

mRNA-Anstieg zu verzeichnen, der jedoch nach wenigen Stunden wieder den basalen Wert annahm. Bei den antisense-Zellklonen zeigte sich ein deutlicherer Effekt, da keine initiale Zunahme in der Menge der Transkripte zu beobachten war; zu jedem Zeitpunkt lag die Transkriptmenge nur wenig über dem basalen Niveau (Krause *et al.*, 1998).

Diese Daten zeigen, daß die SAPK/JNK's einen Einfluß auf die Induktion der mRNA-Expression ausüben, wie auch auf die Aufrechterhaltung der mRNA-Menge. Bei den antisense-Zellklonen ist die Aktivierung durch die stark verminderte endogene Kinase-menge, soweit gehemmt, daß zu keinem Zeitpunkt die mRNA-Menge und damit auch die Proteinmenge zunimmt. Bei den sense Zellklonen ist die partielle Verminderung geringer als in den antisense-Klonen, diese reicht aber zur Aktivierung der Genexpression aus. Für die fortführende Transkription des Genes oder für die Stabilisierung der mRNA wird scheinbar eine maximale SAPK/JNK-Aktivierung benötigt, so daß bei den sense Klonen die mRNA-Menge nicht konstant bleibt, sondern rapide abnimmt. Diese unterschiedlichen zeitkinetischen Verläufe bei den sense und antisense Zellklonen könnten folgende Ursache haben. Durch die Überexpression der antisense-RNA in den Klonen werden wahrscheinlich alle SAPK/JNK-Isoformen vermindert, wie es auch im *Western-Blot* zu sehen ist (Abb. 3.29, Seite 89). Bei der Überexpression von Kinase-inaktivem HA-p54SAPK $\beta$ (K-R)-Protein wird vermutlich bevorzugt nur die homologe humane JNK3-Isoform gehemmt. Dies ließe den Schluß zu, daß die JNK3-Isoform die mRNA-Menge über einen längeren Zeitraum konstant hält.

Die Aufrechterhaltung einer konstanten mRNA-Menge kann herbeigeführt werden durch eine verlängerte Halbwertszeit der mRNA mit Hilfe posttranskriptioneller Prozesse und durch fortlaufende Transkriptionsvorgänge, wobei beides gleichzeitig verlaufen kann (Review: Ross, 1995). In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Holtmann konnte in KB-Zellen mittels Aktinomycin-D-Experimenten gezeigt werden, daß die Halbwertszeit der IL-8 mRNA ca. eine halbe Stunde beträgt. Die Stabilisierung von mRNA wird über bestimmte Sequenzen in der RNA bestimmt. Dabei sind die untranslatierende 5' Region (5'UTR) sowie Adenin- und Uridin-reiche Sequenzen (AU-reiches Element, ARE) in der untranslatierenden 3'-Region (3'UTR) der mRNA bedeutungsvoll (Reviews: Sachs, 1993; Sachs *et al.*, 1997). Auch in der 3'UTR der IL-8 mRNA konnten AU-reiche-Elemente gefunden werden, so daß postuliert wird, daß über diese Elemente die mRNA-Stabilität reguliert wird. Demnach könnte es möglich sein, daß die JNK3-Isoform in KB-Zellen die mRNA der Zytokine IL-6 und IL-8 nach der Aktivierung der Transkription über einen

noch unbekanntem Faktor stabilisiert. Hierzu konnte eine Arbeitsgruppe erst kürzlich zeigen, daß in T-Zellen SAPK/JNK's sowohl die Transkription aktivieren, als auch die IL-2 mRNA über ihre *cis*-Elemente stabilisieren (Chen *et al.*, 1998). Als stabilisierender Faktor wird auch hier ein noch unbekanntes Protein postuliert.

#### **4.7 Charakterisierung der Regulation des IL-8 Genes auf transkriptioneller Ebene durch Transfektion von Reportergenkonstrukten**

Durch transiente Transfektionen mit speziellen Reportergenkonstrukten (Reportergen: Luziferase) wurde die transkriptionelle Regulation des IL-8 Genes in den stabil transfizierten sense und antisense Zellklonen untersucht.

Bei Reportergen-Experimenten spielen viele Faktoren eine Rolle, so daß sich die Auswertung dieser Daten als schwierig gestaltet. Entscheidend ist zum einen die reproduzierbare Transfektionseffizienz. Bei KB-Zellen liegt die transiente Effizienz bei ca. 1-5 %, wobei dies sehr schwanken kann. Versuche in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß die Normierung der Transfektionseffizienz durch Kotransfektion eines zweiten Reportergenes kein geeignetes Mittel darstellt, da die Promotoren (v.a. CMV) der Reportergenplasmide auch über die verwendeten Stimuli (z.B. IL-1) aktiviert werden. In dieser Arbeit wurden die gemessenen relativen Lichteinheiten auf die Gesamtproteinmenge normiert. Um Schwankungen in der Transfektionseffizienz auszugleichen, wurden die Experimente bis zu 20fach wiederholt.

Im Gegensatz zu den generierten Einzelzellklonen, standen die Leervektor-transfizierten Zellpools unter dauerhaftem G418-Selektionsdruck. Um sicherzustellen, daß das Antibiotikum die Experimente nicht beeinflußt, wurden die Versuche in An- und Abwesenheit des Antibiotikums durchgeführt. Die gemessenen Lichteinheiten zeigten aber, daß die Transfektionseffizienz unabhängig ist von der G418-Zugabe.

Als Verstärker-Element vor dem Promotor hatte das Reportergenkonstrukt (pNF $\kappa$ B<sub>luc</sub>) eine fünffach wiederholte NF $\kappa$ B-Bindungssequenz. Das zweite bestand aus der minimalen IL-8-Promotorsequenz (p<sub>hcl33IL8</sub>promotor<sub>luc</sub>), bestehend aus AP-1, NF-IL6 und NF $\kappa$ B Bindungssequenzen.

Da beide Reportergene in verschiedenen Plasmiden vorliegen, sind bei beiden Experimenten die maximal gemessenen Aktivierungsfaktoren unterschiedlich, wobei eine Reihe von Faktoren eine Rolle spielen (Transfektionseffizienz, Plasmidgröße, usw.; siehe dazu Kapitel 3.1, Seite 54). Bei der IL-8-Promotortransfektion (Abb. 3.36, Seite 97) liegt der Faktor vierfach höher als bei der NF $\kappa$ B-Promotor-Transfektion (Abb. 3.35, Seite 96). Zur Überprüfung der maximalen Aktivierbarkeit der Reportergene, wurden auch noch folgende Experimente durchgeführt:

In KB-Zellen erfolgte eine Koftransfektion mit einem Plasmid, das einen Aktivator, MEKK1, exprimiert. Die Überexpression dieser MAPKKK ermöglichte die konstitutive, IL-1 unabhängige, Aktivierung der Transfektanten, bei der beide Signalwege, p38 MAPK und SAPK/JNK's, aktiviert werden (siehe Abb. 1.1, Seite 5). Der Faktor der Aktivierbarkeit lag bei dem NF $\kappa$ B-Konstrukt bei 9,2 und bei dem IL-8-Konstrukt bei 84 in nicht transfizierten KB-Zellen.

Die Transfektion der Promotorkonstrukte in die Leervektor-transfizierten Zellen zeigen ein unerwartetes Ergebnis. Beim NF $\kappa$ B-Plasmid tritt eine 70 % verminderte IL-1 abhängige Aktivierbarkeit auf und beim IL8-Promotor-Konstrukt etwa 45 % im Vergleich zu KB-Zellen. Dies steht im Widerspruch mit den über IL-8 gewonnenen Daten dieses Zellpools. Denn dort zeigen die Leervektor-transfizierten Zellen weder eine verminderte IL-8 Sekretion (Abb. 3.34, Seite 93), noch eine geringere mRNA-Menge im Vergleich zu nicht transfizierten KB-Zellen (siehe Kapitel 4.6, Seite 109). Diese Zellen zeigen keine Unterschiede in der IL-1 abhängigen SAPK/JNK-Aktivierung, so daß diese Signalkaskade eindeutig nicht defekt ist. Somit ist zu vermuten, daß die Ursache in der Genexpression der Reportergene liegt. Möglich ist, daß die Luziferase-Transkripte entweder posttranskriptionell destabilisiert und degradiert werden, oder nicht translatiert werden. Ein Gendefekt der Zellen ist eher auszuschließen, da es sich um eine gemischte Population handelt. Denkbar wäre jedoch ein Einfluß über das Antibiotikum, in dem die Zellen dauerhaft kultiviert werden. Der gesamte Zellpool hat das Neomycinresistenzgen in ihr Genom integriert. Das Genprodukt müßte eine spezifische Wirkung auf das Reportergenprodukt ausüben. Da nicht bekannt ist, ob dieser Effekt in dem Zellpool auch bei der Transfektion anderer Reportergenplasmide auftritt, ist diese Diskrepanz kaum zu erklären. In der Literatur sind keine Einflüsse des Antibiotikums G418 auf Luziferase erwähnt.

Betrachtet man die erhaltenen Daten bei der NFκB-Promotor-Transfektion (Abb. 3.35, Seite 96), so zeigt der stabile sense Mutanten-Zellklon 2 eine etwa 50 %ige Verminderung der Transkription, der stabile antisense-Zellklon 240 sogar eine 85 %ige Hemmung im Vergleich zu KB-Zellen. Dies könnte bedeuten, daß in den Klonen die transkriptionelle Aktivierung durch NFκB gehemmt würde. Auch hier könnte die JNK3-Isoform eine Rolle spielen, entweder durch direkte Transaktivierung oder in dem sie andere Faktoren aktiviert, die wiederum die Transkription regulieren. Die Regulation des Transkriptionsfaktors NFκB auf einer anderen als der transkriptionellen Ebene kann ausgeschlossen werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde die IL-1 induzierte Aktivierung von NFκB in Gel-retardationsanalysen (EMSA) untersucht. Sowohl in den Zellklonen, als auch in KB-Zellen wird NFκB nach 15 bis 30 minütiger IL-1-Stimulation in den Zellen aktiviert und transloziert in den Kern. In der *in vitro* Analyse kann der Faktor an seine Zielsequenz binden (Krause *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse bei der Transfektion des minimalen IL-8 Promotors sind wesentlich komplexer. Beide verwendeten stabilen Zellklone zeigen im Vergleich zu KB-Zellen nur eine etwa 40 %ige Hemmung, wobei keine ausgeprägten Unterschiede zwischen dem sense- und antisense-Klon sichtbar sind. Vergleicht man diese geringe Hemmung der Promotor-Aktivierung mit den stark verminderten IL-8-Sekretionsdaten der Zellklone (Kapitel 4.6), so deutet dies eher auf eine posttranskriptionelle Regulation durch SAPK/JNK's, wahrscheinlich mittels der JNK3-Isoform. Denkbar wäre auch eine Regulation der Translationsinitiation von IL-8 mRNA.

Zum einen konnte durch diese Reporterstudien gezeigt werden, daß SAPK/JNK's im IL-8 Gen eine regulatorische Funktion bei der NFκB-Transaktivierung ausüben. Möglich ist, daß die JNK3-Isoform eine wesentliche Rolle spielt; ob sie direkt involviert ist oder noch unbekannte Transkriptionsfaktoren, die über sie reguliert werden, ist nicht bekannt. Eine denkbare Regulation besteht in der Phosphorylierung von NFκB. Es gibt Berichte, daß dieser zusätzliche Schritt für die vollständige Aktivierung des Faktors als notwendig erachtet wird (Bird *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1994; Naumann *et al.*, 1994). Welcher Bestandteil des Komplexes, p50 oder p65, phosphoryliert vorliegen muß, ist nicht eindeutig bekannt. Auch der Ort der Aktivierung, Zytosol oder Kern, ist noch nicht festgelegt.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, daß JNK1 den Faktor c-Rel *in vivo* binden kann, sie konnten jedoch keine Phosphorylierung von c-Rel, NFκB und IκB *in vitro* durch JNK1 nachweisen (Meyer *et al.*, 1996). Weitere Studien, vor allem unter Berücksichtigung der verschiedenen SAPK/JNK-Isoformen sind nötig, um die regulatorische Wirkung der SAPK/JNK's auf NFκB bei der IL-8 Genexpression aufzuklären.

Bei der transkriptionellen Aktivierung eines minimalen IL-8-Promotorkonstruktes sind insgesamt drei DNA-Bindungselemente beteiligt. Hierbei haben nicht alle drei die gleiche Bedeutung. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß in Abhängigkeit von dem Zelltyp, zur Transkription jeweils das NFκB- und AP1-Element oder das NFκB- und NF-IL6-Element gemeinsam aktiviert werden müssen (Mahe *et al.*, 1991; Mukaida *et al.*, 1990 und 1994; Yasumoto *et al.*, 1992). Diese Arbeitsgruppen, sowie Kunsch *et al.* (1994) zeigten in transienten Transfektionsstudien, daß das vollständige NFκB-Sequenzelement notwendig ist für die IL-8-Genexpression. Bisher gibt es aber noch konträre Meinungen, welche NFκB-Mitglieder an die Sequenz im IL-8 Promotor binden. In Frage kommen p65/RelA, c-Rel und p50/NFκB1 (Bird *et al.*, 1998; Kunsch *et al.*, 1993 und 1994; Matsusaka *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1993).

Trotz dieser Befunde geht man bisher davon aus, daß die transkriptionelle IL-8-Genregulation durch die aktivierenden Faktoren NFκB, NF-IL6 und AP-1 und dem Transkriptionsfaktor Oct-1 (Wu *et al.*, 1997 a) als Repressor, bestimmt wird. Die erhaltenen Daten mit den partiell gehemmten SAPK/JNK-Klonen deuten aber darauf hin, daß entweder eine SAP Kinase direkt beteiligt ist, oder ein bisher unbekannter Transkriptionsfaktor. Die Regulation könnte über den Faktor NFκB laufen, der essentiell für die IL-8 Transkription ist. Inwieweit dies zutrifft, könnte mit Reportergenkonstrukten, die Mutationen in den drei Bindungselementen aufweisen, sicherlich aufgeklärt werden. Falls aber ein neuer Faktor beteiligt ist, der eine eigene Bindungssequenz im IL-8-Promotor hat, müßten Sequenzdeletionen erfolgen.

Die Diskrepanz in den stabilen Zellklonen zwischen der deutlichen Hemmung der IL-8 Sekretion und der relativ geringen Hemmung transfizierter IL-8 Promotor-Reportergenkonstrukte, könnte neben der diskutierten posttranskriptionellen Regulation auch darauf beruhen, daß die Regulation der Translation, insbesondere die der Initiation, durch

SAPK/JNK beeinflusst wird. Bei Eukaryonten sind bei der Initiation neben dem Ribosom Protein-Initiationsfaktoren beteiligt (eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F, eIF4G, eIF3). Besondere Bedeutung hat dabei eIF4E, der spezifisch die *Cap*-Struktur der mRNA erkennt (Lamphear *et al.*, 1995). Er liegt nicht phosphoryliert und phosphoryliert vor und in verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, daß der Anteil an phosphoryliertem Faktor direkt mit der Translationszunahme korreliert (Morley, 1996); wie sich die Aktivierung auf den Faktor auswirkt ist bisher noch unklar. Bisher konnten drei weitere Proteine (4E-BP1, 4E-BP2, 4E-BP3) gefunden werden, die durch Bindung an eIF4E die Translation verhindern (Pause *et al.*, 1994; Poulin *et al.*, 1998; Von Manteuffel *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von eIF4E über die Aktivierung der SAPK/JNK- und p38 MAP Kinasekaskade reguliert wird. *In vitro* Studien zeigten, daß MAPKAPK-3 direkt eIF4E phosphoryliert (Morley und McKendrick, 1997). Eine andere Arbeitsgruppe konnte eine murine Serin/Threonin-Kinasefamilie identifizieren, die MAP Kinase interagierende Kinasen (MNK) 1 und 2. Sie konnten zeigen, daß MNK-1 *in vitro* eIF4E phosphoryliert. Außerdem konnten sie die Bindung und Phosphorylierung durch p38 MAP Kinase nachweisen (Wang *et al.*, 1998; Waskiewicz *et al.*, 1997). Anhand dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß auch die SAK/JNK's entweder direkt eIF4E aktivieren, oder über eine noch unbekannte Kinase, evt. aus der Familie der MNK, Protein-Initiationsfaktor(en) reguliert.

Mit den generierten stabilen Zellklonen, die eine partielle Hemmung der SAPK/JNK-Aktivierung aufweisen, wurde über Reporterstudien versucht die Regulation der IL-1 induzierte IL-8 Genexpression zu untersuchen. Bei solchen Transfektionen wird ein artifizieller Promotor in großer Menge transfiziert, so daß, im Vergleich zu normalen Zellen, die Regulation des Promotors verändert sein kann. Die gemessenen Effekte können mögliche Hinweise auf die Regulationsmechanismen liefern, bisher gibt es aber keine anderen Methoden für *in vivo* Promotoraktivitäts-Messungen, sowie keine Daten von anderen Arbeitsgruppen.

## 5 Zusammenfassung

Das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) spielt als proinflammatorischer Faktor eine zentrale Rolle im Immunsystem. Die durch IL-1 induzierten Signaltransduktionsmechanismen beinhalten die Aktivierung von vier verschiedenen Protein-Kinase-Kaskaden, der NIK-I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B-Kaskade und den MAP Kinase Kaskaden: SAPK/JNK, p38 MAP Kinase und ERK.

Die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK), auch als Jun-N-terminale Kinase (JNK) bezeichnet, wird in jeder Zelle durch IL-1 massiv aktiviert. Um ihre funktionelle Rolle bei der IL-1 Signaltransduktion zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit methodische Strategien entwickelt, um SAPK/JNK's in intakten Zellen zu inhibieren. Dazu wurde zum einen eine Kinase-inaktive Mutante, p54SAPK $\beta$ (K-R), und zum anderen p54SAPK $\beta$  antisense RNA in der humanen Keratinozytenzelllinie KB stabil konstitutiv überexprimiert. Die durch zelluläre Klonierung etablierten Linien wurden charakterisiert.

Mit beiden Ansätzen kann in den verschiedenen generierten Zelllinien eine Hemmung der IL-1 induzierten SAPK/JNK-Aktivierung nachgewiesen werden. Die TNF, Anisomycin und Sorbitol induzierte SAPK/JNK-Aktivierung ist supprimiert.

IL-1 reguliert in KB-Zellen u.a. die Genexpression des Chemokins IL-8. In den generierten Zellklonen, in denen die SAPK/JNK-Aktivierung gehemmt ist, ist die IL-1 induzierte IL-8 Sekretion vermindert, während die Aktivierung eines transient transfizierten minimalen IL-8-Promotor- oder NF $\kappa$ B-Promotor-Reportergenkonstruktes nur partiell gehemmt wird. Diese Daten zeigen, daß SAPK/JNK's eine zentrale Rolle bei der Regulation eines wichtigen IL-1 induzierten Genes spielen, möglicherweise über neue transkriptionelle, posttranskriptionelle Mechanismen und Prozesse, die die Initiation der Translation betreffen.

Die Überexpression der Kinase-inaktiven Mutante oder der antisense RNA, die zur Inhibition der SAP Kinasen/JNK's führt, ist ein geeignetes Modell für die Aufklärung der IL-1 abhängigen Signaltransduktionswege.



CTG TAC CAG ATG CTG TCG GCG ATC AAA CAC CTC CAC TCC GCT GGG ATC ATC CAC  
L Y Q M L S A I K H L H S A G I I H

AGG GAC TTA AAA CCC AGT AAC ATC GTA GTC AAG TCT GAT TGC ACA CTG AAA ATC  
R D L K P S N I V V K S D C T L K I

CTG GAC TTT GGA CTG GCC AGG ACA GCG GGC ACA AGC TTC ATG ATG ACT CCG TAT  
L D F G L A R T A G T S F M M T P Y

GTG GTG ACG AGA TAT TAC AGA GCC CCC GAG GTC ATC CTG GGC ATG GGC TAC AAG  
V V T R Y Y R A P E V I L G M G Y K

**Primer 4 (as)**

GAG AAC GTG GAC ATA TGG TCT GTG GGC TGC ATC ATG GGA GAA ATG GTT CGT CAC  
E N V D I W S V G C I M G E M V R H

AAA ATC CTC TTT CCC GGA AGG GAC TAT ATT GAC CAG TGG AAC AAA GTC ATA GAG  
K I L F P G R D Y I D Q W N K V I E

CAG CTA GGA ACT CCG TGT CCA GAA TTC ATG AAG AAA TTG CAG CCC ACC GTC AGA  
Q L G T P C P E F M K K L Q P T V R

AAC TAC GTG GAG AAC CGG CCC AAG TAT GCA GGC CTC ACC TTC CCC AAG CTC TTT  
N Y V E N R P K Y A G L T F P K L F

CCA GAT TCC CTC TTC CCA GCG GAT TCC GAG CAC AAT AAA CTT AAA GCC AGC CAA  
P D S L F P A D S E H N K L K A S Q

GCC AGG GAC TTG TTG TCA AAG ATG TTA GTG ATT GAC CCA GCG AAG AGG ATA TCG  
A R D L L S K M L V I D P A K R I S

GTG GAT GAC GCA TTG CAG CAT CCG TAC ATC AAC GTT TGG TAC GAC CCT GCT GAA  
V D D A L Q H P Y I N V W Y D P A E

GTG GAG GCG CCT CCG CCT CAG ATA TAT GAC AAG CAA TTG GAT GAA AGG GAG CAC  
V E A P P P Q I Y D K Q L D E R E H

ACC ATC GAA GAA TGG AAA GAA CTC ATC TAC AAG GAA GTA ATG AAC TCA GAA GAG  
T I E E W K E L I Y K E V M N S E E

AAG ACT AAG AAC GGC GTA GTC AAA GGC CAG CCC TCA CCT TCA GGT GCA GCA GTG  
K T K N G V V K G Q P S P S G A A V

AAC AGC AGT GAG AGT CTC CCT CCA TCC TCA TCT GTC AAC GAC ATC TCC TCC ATG  
 N S S E S L P P S S S V N D I S S M

TCC ACC GAC CAG ACC CTC GCA TCC GAC ACT GAC AGC AGC CTG GAA GCC TCG GCG  
 S T D Q T L A S D T D S S L E A S A

### Stopkodon der kodierenden Region

### Primer SAPKBA1661

GGA CCG CTG GGT TGT TGC AGG **TGA** CTA GCC GCC TGC CTG CGA AAC CCA GCG TTC  
 G P L G C C R \*

TTC AGG AGA TGA CGC CAT GAT AGA ACA CAG CGC ACA TGC ACA CAC ACA GAG CTT  
 GTA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA CGC ACG CAC GCA CGC ACG CAA GCA CGC  
 ACG CAC GCA CAA ATG CAC TCA CGC AAT GTC AAG AAA AAA AAA AGT AGC GAG AGA  
 GAG CGA GAG AGC CAA CGT AAA ACT AAG TTA AAT CTT TCT GCG TGC TTC TCC AGA  
 GTT CTG TAT CGC AGC TGA GCT GAA ATG TAT ACT TAA CTT CTA GTC GCG CTC GCT  
 CGA CTT TGG TCT CCC TCC GGC AGT GCT TAC TGA ATT TCC GGT GGT GGT GGT GTT

### XhoI

TTT TCT CCA TGG GTC GAC TCG AGC ATG CAT CTA GAG GGC CCT ATT CTA TAG TGT  
 CAC CTA AAT GCT AGA GCT CGC TGA . . . .

## 6.2 peVRF0HA-p54SAPKβ Wildtyp und Mutanten-Sequenz

Die kodierende Region der p54SAPKβ ist ausführlich im Kapitel 6.3.1 beschrieben.

Startinitiationssequenz  
der HSV Thymidin Kinase

(4 AS) *Bam*H1 → p54 SAPKβ kodierenden Region

hCMV-Promotor - **ATG** GCT TCG TGG GGA TCC AGC AAA AGC AAG ...  
M A S W G S S K S K ...

Ende der p54SAPKβ Sequenz *Bam*H1 HA-Epitop

... GGA CCG CTG GGT TGT TGC AGG GGA TCC TAC CCT TAT GAC GTC CCC GAT TAC  
... G P L G C C R G S Y P Y D V P D Y

Stopkodon

GCC AGC CTG AGA TCC GGT ACC CGG GGA GCT CTC **TAG** ...  
A S L R S G T R G A L \*

## 6.3 Proteinsequenz-Alignments

### 6.3.1 Humane JNK-Isoformen

Entnommen aus Gupta *et al.*, 1996

```

JNK1-α                               MSRSKRDNNFYSVEIGDSTFTVLKRYQN
JNK1-β                               .....
JNK2-α                               ..D..C..SQ....QVA.....Q
JNK2-β                               ..D..C..SQ....QVA.....Q
JNK3-α   MSLHFLYYCSEPTLDVKIAFCQGFQVQVDSYIAKHYN..K..V..Q....V.....

          I             II             III             IV
JNK1-α   LKPIGSSGAQGIVCAAYDAILERNVAIKKLSRPFQNTAKRAYRELVLMKCVNHKNIIIGLLNVFTF
JNK1-β   .....
JNK2-α   .....F.TV.GIS..V.....L.....S.....
JNK2-β   .....F.TV.GIS..V.....L.....S.....
JNK3-α   .....V.D.....S.....

          V             VIA             VIB
JNK1-α   QKSLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIQMELDHERMSYLLYQMLCGIKHLHSAGIIHRDLKPSNIVVK
JNK1-β   .....
JNK2-α   ..T.....L.....H.....
JNK2-β   ..T.....L.....H.....
JNK3-α   ..T.....L.....

          VII             * *             VIII             IX
JNK1-α   SDCTLKILDFGLARTAGTSFMTPYVVTTRYRAPEVILGMYKENVDLWSVGCIMGEMVCHKILFP
JNK1-β   .....I.....IKGGV...
JNK2-α   .....C.N.....I.....L.KGCVI.Q
JNK2-β   .....C.N.....I.....A..L..V..
JNK3-α   .....I.....R.....

          X
JNK1-α   GRDYIDQWNKVIIEQLGTPCFEPMKKLQPTVTRTYVENRPKYAGYSFEKLFDPVLFPPADSEHNKLGAS
JNK1-β   ..T.H.....
JNK2-α   ..T.H.....SA.....N.....P.IK..E...WI..SE..RD.I.T.
JNK2-β   .....SA.....N.....P.IK..E...WI..SE..RD.I.T.
JNK3-α   .....N.....LT.P...S.....

          XI
JNK1-α   QARDLLSKMLVIDASKRISVDEALQHPYINVWYDPSEAEAPPKIPDKQLDEREHTIEENKELIYK
JNK1-β   .....
JNK2-α   .....PD.....R...T...A.....Q.Y.A..E...A.....
JNK2-β   .....PD.....R...T...A.....Q.Y.A..E...A.....
JNK3-α   .....PA.....DA.....A.V...Q.Y.....

JNK1-α1   EVM DLEERTKNGVIRGQPSPLAQVQQ
JNK1-α2   .....GAAVINGSQHPSSSSSVNDVSSMSTDP T LASDTDS SLEAAAGPLGCCR
JNK1-β1   .....GAAVI.....
JNK1-β2   .....W...S...VKD...--M...
JNK2-α1   .....W...S...VKD...DAG--VSSNATPSQ...-I..I...EQ.....DAST...EG..
JNK2-α2   .....W...S...VKD...--M...
JNK2-β1   .....W...S...VKD...DAG--VSSNATPSQ...-I..I...EQ.....DAST...EG..
JNK2-β2   .....W...S...VKD...DAG--VSSNATPSQ...-I..I...EQ.....DAST...EG..
JNK3-α1   ..NS..K...VK...SA...
JNK3-α2   ..NS..K...VK...SGAAVNSSESL.P...-I...Q.....S.....

```

### 6.3.2 SAPK-Isoformen der Ratte

Entnommen aus Kyriakis *et al.*, 1994

```

MSDSKSDGQFYSVQVADSTFTVLKRYQQLKPIGSGAQGIVCAAFDTVLGINVAVKKLSRP p54α
.: : : : :
MSKSKVDNQFYSVEVGDSTFTVLKRYQNLKPIGSGAQGIVCAAYDAVLDNRVAIKKLSRP p54β
.: : : : :
MSRSKRDNFYSVEIADSTFTVLKRYQNLKPIGSGAQGIVCAAYDAILERNVAIKKLSRP p54γ

FQNQTHAKRAYRELVLLKCVNHKNIISLLNVFTPQKTLEEFQDVYLVMEMLDANLCQVIH p54α
.: : : : :
FQNQTHAKRAYRELVLMKCVNHKNIISLLNVFTPQKTLEEFQDVYLVMEMLDANLCQVIQ p54β
.: : : : :
FQNQTHAKRAYRELVLMKCVNHKNIIGLLNVFTPQKSLEEFQDVYIVMEMLDANLCQVIQ p54γ

MELDHERMSYLLYQMLCGIKHLHSAGIIHRDLKPSNIVVKS DCTLKILDFGLARTACTNF p54α
.: : : : :
MELDHERMSYLLYQMLCGIKHLHSAGIIHRDLKPSNIVVKS DCTLKILDFGLARTAGTSF p54β
.: : : : :
MELDHERMSYLLYQMLCGIKHLHSAGIIHRDLKPSNIVVKS DCTLKILDFGLARTAGTSF p54γ

GELVKGCVIFQGDH p54α2
.: : : : :

MMTPYVVTRYRAPEVILGMGYKENVDIWSVGCIMAEMVLHKVLFPPGRDYIDQWNKVIEQ p54α
.: : : : :
MMTPYVVTRYRAPEVILGMGYKENVDIWSVGCIMGEMVRHKILFPGRDYIDQWNKVIEQ p54β
.: : : : :
MMTPYVVTRYRAPEVILGMGYKENVDLWSVGCIMGEMVCLKILFPGRDYIDQWNKVIEQ p54γ

LGTPSAEFMKKLOPTVRNYVENRPKYPGIKFEELFPDWIFPSESERDKIKTSQARDLLSK p54α
.: : : : :
LGTPCPEFMKKLOPTVRNYVENRPKYAGLTFPKLFPDSLFPADSEHNKLGASQARDLLSK p54β
.: : : : :
LGTPCPEFMKKLOPTVRNYVENRPKYAGYSFEKLFPDVLFPADSEHNKLGASQARDLLSK p54γ

MLVIDPKRISVDEALRHPYITVWYDPAEAEAPPQIYDAQLEEREHAIEEWKELIYKEV p54α
.: : : : :
MLVIDPAKRISVDDALQHPYINVWYDPAEVEAPPQIYDKQLDEREHTIEEWKELIYKEV p54β
.: : : : :
MLVIDASKRISVDEALQHPYINVWYDPSEAEAPPKIPDKQLDEREHTIEEWKELIYKEV p54γ

MDWEERSKNGV-KDQPSD--AAV-SSKATPSQSSSINDISSMSTEHTLASDTDSSLDAST p54α
.: : : : :
MNSEKTKNGVVKQPSPSGAAVNSSESLP-PSSSVNDISSMSTDQTLASDTDSSLEASA p54β
.: : : : :
MDLEERTKNGVIRGQPSPLGAAVINGSQHPVSSPSVNDSSMSTDPTLASD..... p54γ

GPLEGCR p54α
.: : :
GPLGCCR p54β

```

## 7 Literatur

**Akira, S.**, Kishimoto, T. „IL-6 and NF-IL6 in acute phase response and viral infection”, *Immunol. Rev.* 127: 25-50, **1992**.

**Alvarez, E.**, Northwood, I. C., Gonzalez, F. A., Latour, D. A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., Davis, R. J. „Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation”, *J. Biol. Chem.* 266: 15277-15285, **1991**.

**Andreason, G. L.**, Evans, G. A. „Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation“, *Biotechniques* 6: 650-660, **1988**.

**Angel, P.**, Karin, M. „The role of jun, fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation”, *Biochem. Biophys. Acta* 1072: 129-157, **1991**. (Review)

**Ausubel, F. M.**, Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. „Current protocols in molecular biology”, *John Wiley & Sons, Inc.*: 1-3, **1996**.

**Bankers-Fulbright, J. L.**, Kalli, R. K., McKean, D. J. „Interleukin-1 signal transduction“, *Life Science* 59: 61-83, **1996**. (Review)

**Bejarano, E. R.**, Lichtenstein, C. P. „Prospects for engineering virus resistance in plants with antisense RNA”, *Trends Biotechnol.* 10: 383-388, **1992**.

**Bird, T. A.**, Schooley, K., Dower, S. K., Hagen, H., Virca, G. D. „Activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B by Interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit”, *J. Biol. Chem.* 272: 32606-32612, **1997**.

**Birnboim, H. C.**, Doly, J. „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA“, *Nucl. Acid. Res.* 7: 1513-1523, **1979**.

**Bost, F.**, McKay, R., Dean, N., Mercola, D. „The jun kinase/stress-activated protein kinase pathway is required for epidermal growth factor stimulation of growth of human A549 lung carcinoma cells”, *J. Biol. Chem.* 272: 33422-33429, **1997**.

**Bradford, M. M.** „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding“, *Anal. Biochem.* 72: 248-254, **1976**.

**Brooks, J. W.**, Mizel, S. B. „Interleukin-1 signal transduction“, *Eur. Cytokine Netw.* 5: 547-562, **1994**. (Review)

**Burgering, B. M.**, Bos, J. L. „Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat”, *Trends Biochem. Sci.* 20: 18-22, **1995**. (Review)

**Burns, K.**, Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J. L., Di Marco, F., French, L., Tschopp, J. „MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling”, *J. Biol. Chem.* 273: 12203-12209, **1998**.

- Camps, M.**, Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., Arkinstall, S. „Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase“, *Science* 280: 1262-1265, **1998**.
- Cano, E.**, Hazzalin, A., 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**.
- Cano, E.**, Mahadevan, L. G. „Parallel signal processing among MAPKs“, *TIBS* 20: 117-121, **1995**.
- Cano, E.**, Doza, Y. N., Ben-Levy, R., Cohen, P., Mahadevan, L. C. „Identification of anisomycin-activated kinases p45 and p55 in murine cells as MAPKAP kinase-2“, *Oncogene* 12: 805-812, **1996**.
- Cao, Z.**, Henzel, W. J., Gao, X. “IRAK: A kinase associated with the interleukin-1 receptor”, *Science* 271: 1128-1131, **1996 (a)**.
- Cao, Z.**, Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., Goeddel, D. V. „TRAF6 is signal transducer for interleukin-1“, *Nature* 383: 443-446, **1996(b)**.
- Chen, C.-Y.**, Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z., Karin, M. „Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway“, *Science* 280: 1945-1949, **1998**.
- Chen, Z.**, Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Maniatis, T. „Signal-induced site-specific phosphorylation targets IκB to the ubiquitin-proteasome pathway“, *Genes Dev.* 9: 1588-1597, **1995**.
- Chow, C.-W.**, Rincon, M., Cavanagh, J., Dickens, M., Davis, R. J. „Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway“, *Science* 278: 1638-1641, **1997**.
- Chu, Y.**, Solski, P. A., Khosravi-Far, Der C. J., Kelly, K. „The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1 and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity *in vivo* toward the ERK2 sevenmaker mutation“, *J. Biol. Chem.* 271: 6497-6501, **1996**.
- Chung, C. T.**, Niemela, S. and Miller, R. H. „One-step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2172-2175, **1992**.
- Colotta, F.**, Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarrutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, F. E., Mantovani, A. „Interleukin-1 Type II receptor: A decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4“, *Science* 261: 472-475, **1993**.
- Crooke, S. T.**, Bennett, C. F. „Progress in antisense oligonucleotide therapeutics“, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 107-129, **1996**.

**Cuenda, A.**, Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., 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**.

**Cuenda, A.**, Cohen, P., Buee-Scherrer, V., 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**.

**Curcio, L. D.**, Bouffard, D. Y., Scanlon, K. J. „Oligonucleotides as modulators of cancer gene expression”, *Pharmacol. Ther.* 74: 317-332, **1997**.

**Davis, R. J.** „The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway”, *J. Biol. Chem.* 268: 14553-14556, **1993**. (Review)

**Dayer, J.-M.**, Burger, D. „Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors“, *Eur. Cytokine Netw.* 5: 563-571, **1994**. (Review)

**Deng, T.**, Karin, M. „c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK“, *Nature* 371: 171-175, **1994**.

**Derijard, B.**, Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., Davis, R. J. „JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain“, *Cell* 76: 1025-1037, **1994**.

**Dickens, M.**, Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L., Davis, R. J. „A cytoplasmic inhibitor of JNK signal transduction pathway”, *Science* 277: 693-696, **1997**.

**DiDonato, J. A.**, Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. „A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B”, *Nature* 388: 548-554, **1997**. (Review)

**Di Giovine, F. S.**, Duff, G. „Interleukin 1: the first interleukin”, *Immunol. Today* 11: 13-19, **1990**.

**Dignam, J. D.** „Preparation of extracts from higher eukaryotes“, *Methods Enzymol.* 182: 194-203, **1990**.

**Dinarello, C. A.**, Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G., Libby, P. „Interleukin-1 induces interleukin-1“, *J. Immunol.* 139: 1902, **1987**.

**Dinarello, C. A.** „The biological properties of interleukin-1“, *Eur. Cytokine Netw.* 5: 517-531, **1994**. (Review)

**Dinarello, C. A.** „Biological basis for interleukin-1 in disease“, *Blood* 87: 2095-2147, **1996**. (Review)

**Dower, S. K.**, Kronheim, S. R., March, C. J., Conlon, P. J., Hopp, T. P., Gillis, S., Urdal, D. L. „Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin-1“, *J. Exp. Med.* 162: 501-515, **1985**.

**Edwards, D. R.**, Mahadevan, L. C. „Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanism: lack of evidence for labile repressors“, *EMBO J.* 11: 2415-2424, **1992**.

**Felgner, P. L.**, Gadek, T., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. „Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7414, **1987**.

**Finch, A.**, Holland, P., Cooper, J. Saklatvala, J., Kracht, M. „Selective activation of JNK/SAPK by interleukin-1 in rabbit liver is mediated by MKK7“, *FEBS Lett.* 418: 144-148, **1997**.

**Force, T.**, Pombo, C. M., Avruch, J. A., Bonventre, J. V., Kyriakis, J. M. „Stress-activated protein kinases in cardiovascular diseases“, *Circ. Res.* 78: 947-952, **1996**. (Review)

**Franklin, C. C.**, Kraft, A. S. „Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells“, *J. Biol. Chem.* 272: 16917-16923, **1997**.

**Freshney, N. W.**, Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. J., Saklatvala, J. „Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of hsp27“, *Cell* 78: 1039-1049, **1994**.

**Fuchs, S. Y.**, Dolan, L., Davis, R. J., Ronai, Z. „Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase“, *Oncogene* 13: 1531-1535, **1996**.

**Fuchs, S. Y.**, Xie, B., Adler, V., Fried, V. A., Davis, R. J., Ronai, Z. „Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors“, *J. Biol. Chem.* 272: 32163-32168, **1997**.

**Fujisawa, H.**, Wang, B., Sauder, D. N., Kondo, S. „Effects of interferons on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human keratinocytes“, *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 347-353, **1997**.

**Gille, H.**, Strahl, T., Shaw, P. E. „Activation of ternary complex factor elk-1 by stress-activated protein kinases“, *Curr. Biol.* 5: 1191-1200, **1995**.

**Gould, G. W.**, Cuenda, A., Thomson, F. J., Cohen, P. „The activation of distinct mitogen activated protein kinase cascades is required for the stimulation of 2-deoxyglucose uptake by interleukin 1 and insulin like growth factor in KB cells“, *Biochem. J.* 311: 735-738, **1996**.

**Graham, F. L.**, van der Eb, A. J. „A new technique for assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA“, *Virology* 52: 456-467, **1973**.

**Grewe, M.**, Trefzer, U., Ballhor, A., Gyufko, K., Henninger, H. P., Krutmann, J. „Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation induced prostaglandin E2 synthesis by human epidermoid carcinoma cells“, *J. Invest. Dermatol.* 101: 528-531, **1993**.

**Groom, L. A.**, Sneddon, A. A., Alessi, D. R., Dowd, S., Keyse, S. M. „Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatases“, *EMBO J.* 15: 3621-3632, **1996**.

**Guesdon, F.**, Freshney, N., Waller, R. J., Rawlinson, L., Saklatvala, J. „Specific activation of  $\beta$ -casein kinase by the inflammatory cytokines interleukin 1 and tumor necroses factor“, *J. Biol. Chem.* 268: 14343-14353, **1993**.

**Gupta, S.**, Campbell, D., Derijard, B., Davis, R. J. „Transcription factor ATF-2 regulation by the JNK signal transduction pathway“, *Science* 267: 389-393, **1995**.

**Gupta, S.**, Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Derijard, B., Davis, R. J. „Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors“, *EMBO J.* 15: 2760-2770, **1996**.

**Hagiwara, T.**, Suzuki, H., Kono, I., Kashiwagi, H., Akiyama, Y., Onozaki, K. „Regulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 and interleukin-6 in rat hepatocytes“, *Am. J. Path.* 136: 39, **1990**.

**Hai, T.**, Curran, T. „Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3720-3724, **1991**.

**Hanks, S. K.**, Quinn, A. M., Hunter, T. „The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains“, *Science* 241: 42-52, **1988**.

**Hazzalin, C. A.**, Le Panse, R., Cano, E., Mahadevan, L. C. „Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction“, *Mol. Cell. Biol.* 18: 1844-1854, **1998**.

**Hibi, M.**, Lin, A., Smeal, T., Minden, A., 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**.

**Hirano, T.**, Akira, S., Taga, T., Kishimoto, T. „Biological and clinical aspects of interleukin 6“, *Immunol. Today* 11 (12): 443-449, **1990**.

**Hirsch, D. D.**, Stork, P. J. S. „Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress-activated protein kinase pathways *in vivo*“, *J. Biol. Chem.* 272 : 4568-4575, **1997**.

**Holland, P. M.**, Suzanne, M., Campbell, J. S., Noselli, S., Cooper, J. A. „MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase functionally related to *hemipterous*“, *J. Biol. Chem.* 272: 24991-24998, **1997**.

**Ibelgaufts H.** „Dictionary of Cytokines“, VCH **1994**

- Ip, Y. T.**, Davis, R. J. „Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development”, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 205-219, **1998**. (Review)
- Izant, J. G.**, Weintraub, H. „Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis”, *Cell* 36: 1007-1015, **1984**.
- Izant, J. G.**, Weintraub, H. „Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA”, *Science* 229: 345-352, **1985**.
- Janknecht, R.**, Hunter, T. „Activation of the Sap1a transcription factor by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase“, *J. Biol. Chem.* 272: 4219-4224, **1997**.
- Johnson, A. C.** „Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2“, *J. Biol. Chem.* 271: 3033-3038, **1996**.
- Kallunki, T.**, Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H. K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R., Karin, M. „JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-jun binding and phosphorylation”, *Genes&Dev.* 8:2996-3007, **1994**.
- Kallunki, T.**, Deng, T., Hibi, M., Karin, M. „c-jun can recruit JNK to phosphorylate dimerisation partners via specific docking interactions”, *Cell* 87: 929-939, **1996**.
- Kamps, M. P.**, Sefton, B. M. „Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60src“, *Mol. Cell. Biol.* 6: 751-757, **1986**.
- Karin, M.**, Liu, Z., Zandi, E. „AP-1 function and regulation”, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 240-246, **1997**. (Review)
- Kirkham B.** „Interleukin 1, immune activation pathways, and different mechanism in osteoarthritis and rheumatoid arthritis”, *Ann. Rheum. Dis.* 50 (6): 395-400, **1991**.
- Kirnbauer, R.**, Köck, A., Schwarz, T., Urbanski, A., Krutmann, J., Borth, W., Damm, D., Shipley, G., Ansel, J. C., Luger, T. A. „IFN- $\beta$ 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and carcinoma cell lines“, *J. Immunol.* 142: 1922-1928, **1989**.
- Kirnbauer, R.**, Köck, A., Neuner, P., Förster, E., Krutmann, J., Urbanski, A., Schauer, E., Ansel, J. C., Schwarz, T., Luger, T. A. „Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids“, *J. Invest. Dermatol.* 96: 484-489, **1991**.
- Korherr, C.**, Hofmeister, R., Wesche, H., Falk, W. „A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling”, *Eur. J. Immunol.* 27: 262-267, **1997**.
- Kotani, K.**, Hara, K., Kotani, K., Yonezawa, K., Kasuga, M. „Phosphoinositide 3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-Binding protein Rac in the insulin-signaling of membrane ruffling“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 985-990, **1995**.

**Kracht, M.**, Shiroo, M., Marshall, C. J., Hsuan, J. J., Saklatvala, J. „Interleukin-1 activates a novel protein kinase that phosphorylates the epidermal-growth-factor-receptor peptide T669”, *Biochem. J.* 302: 897-905, **1994 (a)**.

**Kracht, M.**, Truong, O., Totty, N. F., Shiroo, M., Saklatvala, J. „Interleukin 1 activates two forms of p54 alpha mitogen activated protein kinase in rabbit liver“, *J. Exp. Med.* 180: 2017-2025, **1994 (b)**.

**Krause, A.**, Holtmann, H., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., Kracht, M. „Stress-activated protein Kinase/Jun N-terminal Kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB“, *J. Biol. Chem.* 273 (37): 23681-23689, **1998**.

**Krutmann, J.**, Köck, A., Schauer, E., Parlow, F., Möller, A., Kapp, A., Förster, E., Schöpf, E., Luger, T. A. „Tumor necrosis factor  $\beta$  and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocyte ICAM-1 expression“, *J. Invest. Dermatol.* 95: 127-131, **1990**.

**Kunsch, C.**, Lang, R. K., Rosen, C. A., Shannon, M. F. „Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF- $\kappa$ B p65 (RelA) and NF-IL-6“, *J. Immunol.* 153: 153-164, **1994**.

**Kyriakis, J. M.**, Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., Woodgett, J. R. „The stress-activated protein-kinase subfamily of c-Jun kinases”, *Nature* 369: 156-160, **1994**.

**Lamphear, B. J.**, Kirchweger, R., Skern, T., Rhoads, R. E. „Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation”, *J. Biol. Chem.* 270: 21975-21983, **1995**.

**Laemmli, U. K.** „Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4“, *Nature* 227: 680-685, **1970**.

**Lawler, S.**, Cuenda, A., Goedert, M., Cohen, P. „SKK4, a novel activator of stress-activated protein kinase-1 (SAPK1/JNK), *FEBS Lett.* 414: 153-158, **1997**.

**Li, C. C.**, Dai, R. M., Chen, E., Longo, D. L. „Phosphorylation of NF- $\kappa$ B1-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding”, *J. Biol. Chem.* 269: 30089-30092, **1994**.

**Lin, A.**, Minden, A., Martinetto, H., Claret, F. X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G. L., Karin, M. „Identification of a dual specificity kinase that activates the jun kinases and p38-Mpk2”, *Science* 268: 286-290, **1995**.

**Livingstone, C.**, Patel, G., Jones, N. „ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain”, *EMBO J.* 14: 1785-1797, **1995**.

- Lu, X.**, Nemoto, S., Lin, A. „Identification of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase (JNK)-activating kinase 2 as an activator of JNK but not p38“, *J. Biol. Chem.* 272: 24751-24754, **1997**.
- Luhrs, C. A.**, Raskin, C. A., Durbin, R., Wu, B., Sadasivan, E., McAllister, W., Rothenberg, S. P. „Transfection of a glycosylated phosphatidylinositol-anchored folate-binding protein complementary DNA provides cells with the ability to survive in low folate medium“, *J. Clin. Invest.* 90: 840-847, **1992**.
- Mahadevan, L. C.**, Edwards, D. R. „Signalling and superinduction“, *Nature* 349: 747-748, **1991**.
- Mahe, Y.**, Mukaida, N., Kuno, K., Akiyama, M., Ikeda, N., Matsushima, K., Murakami, S. „Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor  $\kappa$ B and CCAAT/enhancer-binding protein like cis-elements“, *J. Biol. Chem.* 266: 13759-13763, **1991**.
- Malinin, N. I.**, Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., Wallach, D. „MAP3K-related kinase involved in NF $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1“, *Nature* 385: 540-544, **1997**.
- Martin, J. H.**, Mohit, A. A., Miller, C. A. „Developmental expression in the mouse nervous system of the p49F12 SAP kinase“, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 35: 45-57, **1996**.
- Martin, M. U.**, Falk, W. „The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction“, *Eur. Cytokine Netw.* 8: 5-17, **1997**. (Review)
- Matsusaka, T.**, Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., Akira, S. „Transcription factors NF-IL6 and NF- $\kappa$ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10193-10197, **1993**.
- Mathias, S.**, Younes, A., Kann, C. C., Orlow, I., Joseph, C., Kolesnick, R. N. „Activation of the sphingomyelin signalling pathway in intact EL-4 cells and in cell-free system by IL-1 beta“, *Science* 259: 519-522, **1993**.
- Matthias, P.**, Müller, M. M., Schreiber, E., Rusconi, S., Schaffner, W. „Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins“, *Nucleic. Acids. Res.* 17: 6481, **1989**.
- McLaughlin, M. M.**, Kumar, S., McDonnell, P. C., Van Horn, S., Lee, J. C., Livi, G. P., Young, P. R. „Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase –activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase“, *J. Biol. Chem.* 271: 8488-8492, **1996**.
- Meyer, C. F.**, Wang, X., Chang, C., Templeton, D., Tan, T.-H. „Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 signaling cascade in mediating  $\kappa$ B enhancer activation“, *J. Biol. Chem.* 271: 8971-8976, **1996**.
- Moriguchi, T.**, Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y., Nishida, E. „A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF $\alpha$  and cellular stresses“, *EMBO J.* 16: 7045-7053, **1997**.

**Morley, S. J.** „Protein phosphorylation in cell growth regulation”, Clemens, M. J. ed., *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam: 197-224, **1996**.

**Morley, S. J.**, McKendrick, L. „Involvement of stress-activated protein kinase and p38/RK mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the enhanced phosphorylation of initiation factor 4E in NIH 3T3 cells”, *J. Biol. Chem.* 272: 17887-17893, **1997**.

**Muda, M.**, Boschert, U., Dickinson, R., Martinou, J. C., Martinou, I., Camps, M., Schlegel, W., Arkininstall, S. „MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that amplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase“, *J. Biol. Chem.* 271: 4319-4326, **1996 (a)**.

**Muda, M.**, Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A., Arkininstall, S. „The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases“, *J. Biol. Chem.* 271: 27205-27208, **1996 (b)**.

**Muda, M.**, Boschert, U., Smith, A., Antonsson, B., Gillieron, C., Chabert, C., Camps, M., Martinou, I., Ashworth, A., Arkininstall, S. „Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4“, *J. Biol. Chem.* 272: 5141-5151, **1997**.

**Muda, M.**, Theodosios, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., Rodrigues, N., Davies, K., Ashworth, A., Arkininstall, S. „The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity“, *J. Biol. Chem.* 273: 9323-9329, **1998**.

**Mukaida, N.**, Mahe, Y., Matsushima, K. „Cooperative interaction of nuclear factor- $\kappa$ B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by proinflammatory cytokines”, *J. Biol. Chem.* 265: 21128-21133, **1990**.

**Mukaida, N.**, Okamoto, S.-I., Ishikawa, Y., Matsushima, K. „Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression”, *J. Leukoc. Biol.* 56: 554-558, **1994**.

**Musti, A. M.**, Treier, M., Bohmann, D. „Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases“, *Science* 275: 400-402, **1997**.

**Naumann, M.**, Scheidereit, C. „Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations”, *EMBO J.* 13: 4597-4607, **1994**.

**Neel, B. G.**, Tonks, N. K. „Protein tyrosine phosphatases in signal transduction“, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 193-204, **1997**.

**Neumann, E.**, Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P. H. „Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high fields“, *EMBO J.* 1: 841-845, **1982**.

**Nguyen, M.**, Branton, P. E., Walton, P. A., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J., Shore, G. C. „Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus“, *J. Biol. Chem.* 269: 16521-16524, **1994**.

- Ohga, T.**, Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M., Kohno, K. „Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C and ultraviolet light“, *Cancer Res.* 56: 4224-4228, **1996**.
- Ohmori, H.**, Toyama, S., Toyama, S. „Direct proof that the primary site of cytochalasin on cell motility processes is actin“, *J. Cell. Biol.* 116: 933-941, **1992**.
- Okusawa, S.**, Gelfand, J. A., Ikejima, T., Connolly, R. J., Dinarello, C. A. „Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits“, *J. Clin. Invest.* 81: 1162-1172, **1988**.
- O'Neill, L. A.**, Greene, C. „Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants“, *J. Leukoc. Biol.* 63: 650-657, **1998**. (Review)
- Pages, G.**, Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., Pouyssegur, J. „Mitogen-activated protein kinases p42 MAPK and p44 MAPK are required for fibroblast proliferation“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8319-8323, **1993**.
- Pause, A.**, Belsham, G. J., Gingras, A.-C., Donze, O., Lin, T.-A., Lawrence, J. C., Sonenberg, N. „Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of regulator of 5'-cap function“, *Nature* 371: 762-767, **1994**.
- Ponnazhagan, S.**, Woody, M. J., Wang, X. S., Zhou, S. Z., Srivastava, A. „Transcriptional transactivation of parvovirus B19 promoters in nonpermissive human cells by adenovirus type 2“, *J. Virol.* 69: 8096-8101, **1995**.
- Ponnazhagan, S.**, Wang, X. S., Woody, M. J., Luo, F., Kang, L. Y., Nallari, M. L., Munshi, N. C., Zhou, S. Z., Srivastava, A. „Differential expression in human cells from the p6 promoter of human parvovirus B19 following plasmid transfection and recombinant adeno-associated virus 2 (AAV) infection: human megakaryocytic leukaemia cells are non-permissive for AAV infection“, *J. Gen. Virol.* 77: 1111-1122, **1996**.
- Poulin, F.**, Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S., Sonenberg, N. „4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family“, *J. Biol. Chem.* 273: 14002-14007, **1998**.
- Price, M. A.**, Cruzalegui, F. H., 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**.
- Pulverer, B. J.**, Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J. R. „Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases“, *Nature* 353: 670-674, **1991**.
- Raingeaud, J.**, Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., 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**.

**Read, M. A.**, Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J. „Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways”, *J. Biol. Chem.* 272: 2753-2761, **1997**.

**Regnier, C. H.**, Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., Rothe, M. „Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase”, *Cell* 90: 373-383, **1997**.

**Robbins, D. J.**, Chen, M., Vanderbilt, C. A., Feig, L. A., Cobb, M. H. „Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6924-6928, **1992**.

**Robinson-Benion, C.**, Holt, J. T. „Antisense techniques”, *Meth. Enzymol.* 254: 363-375, **1995**.

**Ross, J.** „mRNA stability in mammalian cells”, *Microbiol. Rev.* 59: 423-450, **1995**. (Review)

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

**Sachs, A. B.** „Messenger RNA degradation in eukaryotes”, *Cell* 74: 413-421, **1993**. (Review)

**Sachs, A. B.**, Sarnow, P., Hentze, M. W. „Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes”” *Cell* 89: 831-838, **1997**.(Review)

**Saklatvala, J.**, Rawlinson, L. M., Marshall, C. J., Kracht, M. „Interleukin 1 and tumor necrosis factor activate the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase in cultured cells”, *FEBS Lett.* 334: 189-192, **1993**.

**Sanchez, I.**, Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M., Zon, L. I. „Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-jun”, *Nature* 372: 794-800, **1994**.

**Sanger, F.**, Nicklen, S., Coulson, A. R. „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467, **1977**.

**Seger, R.**, Seger, D., Reszka, A. A., Munar, E. S., Eldar-Finkelmann, H., Dobrowolska, G., Jensen, A. M., Campbell, J. S., Fischer, E. H., Krebs, E. G. „Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells”, *J. Biol. Chem.* 269: 25699-25709, **1994**.

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

**Shapiro, P. S.**, Ahn, N. G. „Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinase 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1)“, *J. Biol. Chem.* 273: 1788-1793, **1998**.

**Sironi, M.**, Brevario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E., Mantovani, A. „IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells“, *J. Immunol.* 142: 549, **1989**.

**Slack, J.**, McMahan, C. J., Waugh, S., Schooley, K., Spriggs, M. K., Sims, J. E., Dower, S. K. „Independent binding of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  to type I and type II interleukin-1 receptor“, *J. Biol. Chem.* 268: 2513, **1993**.

**Sluss, H. K.**, Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D. C. I., Wilson, C., Davis, R. J., Ip, Y. T. „A JNK signal transduction pathway mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*“, 10: 2745-2758, **1996**.

**Stein, B.**, Baldwin, A. S. „Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF- $\kappa$ B“, *Mol. Cell. Biol.* 13: 7191-7198, **1993**.

**Stokoe, D.**, Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., Gaestel, M. „Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins“, *FEBS Lett.* 313: 307-313, **1992**.

**Tournier, C.**, Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Barrett, T., 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**.

**Van Dam, H.**, Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., 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**.

**Von Manteuffel, S. R.**, Gingras, A.-C., Ming, X.-F., Sonenberg, N., Thomas, G. „4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4076-4048, **1996**.

**Walder, R. W.**, Walder, J. A. „Role of RNase H in hybrid arrested translation by antisense oligonucleotides“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5011-5015, **1988**.

**Wang, X.**, Flynn, A., Waskiewicz, A. J., Webb, B. L., Vries, R. G., Baines, I. A., Cooper, J. A., Proud, C. G. „The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways“, *J. Biol. Chem.* 273: 9373-9377, **1998**.

**Waskiewicz, A. J.**, Flynn, A., Proud, C. G., Cooper, J. A. „Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases MNK1 and MNK2”, *EMBO J.* 16: 1909-1920, **1997**.

**Wesche, H.**, Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., Cao, Z. „MyD88: an adapter that recruits to the IL-1 receptor complex”, *Immunity* 7: 837-847, **1997**.

**Whitmarsh, A. J.**, Shore, P., Sharrocks, A. D., Davis, R. J. „Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element”, *Science* 269: 403-407, **1995**.

**Whitmarsh, A. J.**, Davis, R. J. „Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways”, *J. Mol. Med.* 74: 589-607, **1996**. (Review)

**Whitmarsh, A. J.**, Yang, S., Su, M., Sharrocks, A. D., 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**.

**Whitmarsh, A. J.**, Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., Davis, R. J. „A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation”, *Science* 281: 1671-1674, **1998**.

**Wu, G. D.**, Lai, E. J., Huang, N., Wen, X. „Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter”, *J. Biol. Chem.* 272: 2396-2403, **1997 (a)**.

**Wu, Z.**, Wu, J., Jacinto, F., Karin, M. „Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-specific kinase”, *Mol. Cell. Biol.* 17: 7407-7416, **1997 (b)**.

**Yang, D. D.**, Kuan, C.-Y., Whitmarsh, A. J., Rincón, M., Zheng, T. S., Davis, R. J., Rakic, P., Flavell, R. A. „Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the JNK3 gene”, *Nature* 389: 865-870, **1997**.

**Yang, S.-H.**, Yates, P. R., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., Sharrocks, A. D. „The Elk-1 ets-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif”, *Mol. Cell. Biol.* 18: 710-720, **1998 (a)**.

**Yang, S.-H.**, Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., Sharrocks, A. D. „Differential targeting of MAP kinases to the ets-domain transcription factor Elk-1”, *EMBO J.* 17: 1740-1749, **1998 (b)**.

**Yasumoto, K.**, Okamoto, S.-i., Mukaida, N., Mursakama, S., Mai, M., Matsushima, K. „Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\gamma$  synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF- $\kappa$ B-like binding sites of the interleukin 8 gene”, *J. Biol. Chem.* 267: 22506-22511, **1992**.

**Zhang, Y.**, Lin, J. X., Vilcek, J. „Enhancement of cAMP levels and protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: Role in the induction of interleukin-6”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6802, **1988**.

**Zinck, R.**, Cahill, M A., Kracht, M., Sachsenmaier, C., Hipskind, R. A., Nordheim, A. „Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on elk-1”, *Mol. Cell. Biol.* 15: 4930-4938, **1995**.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. K. Resch danke ich für das Interesse an dem Thema und die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut zu bearbeiten.

Bei Herrn Dr. Michael Kracht bedanke ich mich für die gute Betreuung in seiner Arbeitsgruppe.

Frau Prof. Dr. Marta Szamel danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und für die Betreuung im Graduiertenkolleg.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Müller bedanke ich mich für die Übernahme des Referats.

Herrn Priv.-Doz. Dr. M. U. Martin danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und für die Übernahme des Korreferats.

Bei meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Solveig Eickemeier für ihre kompetente technische Assistenz.

Der Arbeitsgruppe Holtmann danke ich für die Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe.

Bei der Arbeitsgruppe Martin und ihren „Ehemaligen“ möchte ich mich für den Spaß bei der gemeinsamen Nutzung von Labor und Mensa bedanken.

Allen Mitgliedern und auch den „Ehemaligen“ der „Molpha“ danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima im Institut.

Bei meinen Freundinnen Anja Erhardt und Birgit Pfennig möchte ich mich für die Diskussionsbereitschaft bei Labor- und Alltagsfragen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

## LEBENS LAUF

Name: Andrea Erika Krause

Geburtsdatum: 13.12.1966

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1973-1977 Sickinger Grundschule, Mannheim  
1977-1986 Liselotte-Gymnasium, Mannheim  
10.06.1986 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung: 1987-1989 Ausbildung zur Staatlich geprüften Chemisch-technischen Assistentin in der Berufsbildenden Schule Naturwissenschaften, Ludwigshafen

Studium: 1989 Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität Hannover  
07.02.1992 Erwerb des Vordiploms in Biochemie  
12.06.1995 Verleihung des Hochschulgrades Dipl. Biochem.  
Prüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie und Technische Chemie  
Thema der Diplomarbeit:  
„Der eukaryontische Transkriptionsterminationsfaktor mTTF I: Expression und Charakterisierung“  
seit 01.08.1995 Anfertigung der Dissertation in der Abteilung Klinische Molekularpharmakologie (Prof. Dr. med. K. Resch), Medizinische Hochschule Hannover – Arbeitsgruppe Dr. med. M. Kracht  
01.08.1995-1998 Stipendiatin im Graduiertenkolleg „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Andrea Erika Krause