

# **Untersuchungen zur RNAi-vermittelten Suppression von Effektormolekülen im Entzündungsprozess**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Daniela Kettner-Buhrow  
geboren am 16.03.78 in Marburg/ Lahn

2006

Referent: Prof. Dr. Walter H. Müller

Korreferent: Prof. Dr. Michael Kracht

Tag der Promotion: 05.07.2006

## **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.

Hannover, 06.04.2006

---

*Daniela Kettner-Buhrow*

## Danksagung

Ich danke all denen, die mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die Überlassung des interessanten Themas, die motivierende Betreuung der Arbeit und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion. Herrn Prof. Dr. Klaus Resch danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pharmakologie anzufertigen und für die finanzielle Förderung. Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Walter H. Müller für die freundliche Übernahme des Referates.

Ganz ausdrücklich danke ich Heike Schneider und Dr. Oliver Dittrich-Breiholz für ihre große Hilfe und tatkräftige Unterstützung in fachlichen Fragen und bei der Durchführung der Microarray-Experimente. Außerdem bedanke ich mich bei allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kracht für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und den vielseitigen Rat, namentlich Dr. Sabine Wolter, Dr. Elke Hoffmann, Anneke Dörrie, Juliane von der Ohe, Alexander Wolf, Dr. Holger Buss, Solveig Kälble, Katharina Rzeczkowski, Axel Weber und ganz besonders bei Dr. Axel Thiefes und Dr. David Holzberg.

Ferner bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und den Kooperationspartnern aus anderen Instituten, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben, vor allem bei Prof. Dr. Helmut Holtmann.

Diese Arbeit wurde teilweise im Rahmen eines Graduiertenstipendiums des Landes Niedersachsen durchgeführt. Weiterhin wurden Teile dieser Arbeit von der Firma MWG Biotech gefördert. Für die Kooperation und Zustimmung zur Nutzung der Daten in dieser Arbeit sei Frau Dr. Huber und Herrn Dr. Becher stellvertretend für MWG Biotech gedankt.

Von Herzen bedanke ich mich bei Michael und meiner Familie für ihre Kraft, Liebe und das Verständnis sowie die vielen kleinen und großen Hilfeleistungen all die Jahre. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

*Daniela Kettner-Buhrow*

## Zusammenfassung

Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) oder Tumor Nekrose Faktor (TNF) stimulieren Proteinkinasesignalwege, die zur parallelen Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) JNK und p38 MAPK sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führen. Aktivierte MAPK regulieren ihrerseits den AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex. Bei der Kopplung der IL-1- oder TNF-Rezeptoren an diese drei zytokinstimulierten Signalwege spielt die MKKK TAK1 eine wichtige Rolle, deren Aktivität durch die Adapterproteine TAB1, TAB2 und TAB3 kontrolliert wird. Rezeptordistal kommt es als Resultat der Aktivierung dieser Signalsysteme zur komplexen Veränderung der Expression entzündungsrelevanter Gene. In vorliegender Arbeit wurden die Auswirkungen einer durch RNA Interferenz (RNAi) vermittelten Ausschaltung (*knock down*) von Schlüsselmolekülen aus diesen Signalwegen auf entzündliche Gene mittels DNA-Microarrays untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde im Rahmen eines Vergleichs von drei RNAi-Strategien (siRNA, shRNA und d-siRNA) eine signifikante Suppression des TAK1-Adapterproteins TAB1 in humanen Epithelzellen erreicht. Im Gegensatz zu TAK1 zeigten alle Ansätze, dass TAB1 für die IL-1- und TNF-vermittelte Signaltransduktion und Genexpression keine essentielle Funktion besitzt. Darüber hinaus bewirkten mit humanen rekombinantem Dicer generierte d-siRNA-Gemische eine sehr effektive Suppression von TAB1 und TAK1, aber gleichzeitig auch eine unspezifische Induktion von Entzündungsgenen.

Neben den biologischen Effekten der *knock down*-Ansätze war eine Bewertung der RNAi-Methoden von großem Interesse. Chemisch synthetisierte siRNAs zeigten gegenüber den anderen zwei Verfahren zur Herstellung von *knock down*-Zellen deutliche Vorteile hinsichtlich der Handhabbarkeit und der unspezifischen *off target*-Effekte und wurden daher für alle folgenden Untersuchungen verwendet.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mittels siRNA die Funktion von distal in der Signalkette gelegenen Zielstrukturen untersucht. Hierbei erfolgte zunächst eine systematische Erfassung der IL-1-regulierten Expression von Entzündungsproteinen auf mRNA-Ebene mittels humaner DNA-Oligonukleotid-Microarrays, welche Sonden für 136 Entzündungsgene bzw. 138 Transkriptionsfaktoren enthielten.

Da in diesen Experimenten die AP-1-Familienmitglieder von den Transkriptionsfaktoren am stärksten durch IL-1 induziert und zusätzlich MAPK-abhängig reguliert werden, wurde die Funktion von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 nachfolgend mittels RNAi untersucht. Der Effekt von einzelnen und kombinierten RNAi-vermittelten *knock down*-Ansätzen dieser Proteine wurde auf mRNA- und Proteinebene validiert und der Phänotyp dieser Zellen anschließend mit DNA-Microarrays und anhand der Expression von IL-8 und IL-6, zwei sehr stark und ubiquitär durch IL-1 regulierten Entzündungsgene, analysiert. Durch 20 Microarray-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Suppression von einzelnen AP-1-Komponenten nur feine Veränderungen des mRNA-Entzündungsprofils bewirkt. Dabei beeinflussen die AP-1-Proteine auch gegenseitig ihre eigene Expression. IL-8 und IL-6 wurden als AP-1-Zielgene, deren mRNA-Expression von mehreren der untersuchten AP-1-Untereinheiten abhängig ist, identifiziert. Dementsprechend zeigte ein kombinatorischer

*knock down*-Ansatz aller fünf AP-1-Untereinheiten den stärksten Hemmeffekt auf die IL-8- und IL-6-Genexpression, ohne allerdings die mRNA-Expression komplett zu inhibieren.

In weiteren Ansätzen wurden siRNA-Experimente zur direkten Hemmung der IL-8- und IL-6-Genexpression durchgeführt. Die Auswahl der sezernierten Proteine resultierte aus ihrer starken IL-1-Induzierbarkeit auf mRNA-Ebene. Es wurden auf mRNA- und Proteinebene starke Hemmeffekte erreicht. Die durchgeführten Genexpressionsstudien dieser *knock down*-Ansätze zeigten eine starke Repression von Entzündungsgenen, möglicherweise durch einen autokrinen Mechanismus.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Applikation von RNAi gegen rezeptorproximale (TAK1, TAB1) oder rezeptordistale (AP-1) Signalmoleküle sowie gegen sezernierte Entzündungsgene selbst (IL-8, IL-6) bei der Regulation von IL-1-induzierten Genen komplexe erwünschte und zum Teil unerwünschte oder unerwartete Auswirkungen auf die zelluläre Genexpression bewirken. Diese Arbeiten verdeutlichen daher die Möglichkeiten, aber auch die Limitationen des RNAi-Ansatzes und unterstreichen, wie wichtig eine unvoreingenommene und breite Erfassung des Phänotyps von Zellen ist, die mit einzelnen oder auch mit Kombinationen von siRNAs behandelt werden.

Schlagwörter: Entzündung, Signaltransduktion, siRNA

## Abstract

Proinflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1) or tumor necrosis factor (TNF) stimulate protein kinase pathways that in parallel activate the mitogen-activated protein kinases (MAPK) JNK and p38 MAPK as well as the transcription factor NF- $\kappa$ B. Activated MAPK in turn regulate the activity of the dimeric transcription factor AP-1. The MAPK kinase kinase (MKKK) TAK1 couples these three cytokine-induced signalling pathways to the IL-1 and TNF receptors. The activity of TAK1 is controlled by adaptor proteins TAB1, TAB2 and TAB3. Distal from the receptors activation of these pathways results in expression of a complex pattern of inflammatory genes. In this project the cellular phenotypes caused by RNA interference (RNAi)-mediated suppression (knock down) of key molecules of these pathways was analysed by means of DNA microarrays.

In the first part of the project a significant suppression of the TAK1 adaptor protein TAB1 in human epithelial cells was achieved by comparing three strategies of RNAi (siRNA, shRNA und d-siRNA). In contrast to the suppression of TAK1 none of the approaches revealed an essential function of TAB1 for IL-1- or TNF-dependent signalling and gene expression. Unexpectedly, d-siRNA mixes generated by human recombinant Dicer which were very effective in suppressing TAB1 or TAK1 unspecifically induced a broad spectrum of inflammatory genes.

In addition to the biological effects of the knock down approaches, assessment of their suitability for effective RNAi was also evaluated. On balance, chemically synthesized siRNAs were advantageous over the other two strategies in terms of handling and of their potential to induce off-target effects. Consequently, this approach was used for all further experiments.

In the second part of the project the function of target molecules located distal in the signalling chain was targeted by siRNA. Initially a systematic survey of the IL-1 $\alpha$ -regulated expression of inflammatory proteins was performed. This was achieved at the mRNA level using human DNA oligonucleotide microarrays carrying probes for 136 inflammatory genes or for 138 transcription factors, respectively.

AP-1 family members were identified as most strongly IL-1-induced transcription factors whose expression was also dependent on MAPK activation. Hence, function of c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 was subsequently analysed by RNAi. The effects of individual and combinatorial RNAi-dependent knock downs of these proteins were validated at the mRNA and protein level. Then the phenotype of the cells was analyzed by DNA microarrays and by analysis of IL-8 and IL-6 by real time PCR, as IL-8 and IL-6 were two of the most strongly and ubiquitously regulated inflammatory genes. By 20 independent DNA microarray experiments it was found that suppression of individual AP-1 components resulted in modest but specific alterations of the inflammatory gene expression profile. These experiments also revealed that AP-1 proteins mutually regulate their own expression. IL-8 and IL-6 were identified as AP-1 target genes whose mRNA expression requires several AP-1 subunits. Accordingly, a combinatorial knock down of all five AP-1 subunits resulted in

the strongest inhibition on IL-8 and IL-6 gene expression, but did not suppress mRNA levels completely.

In further studies siRNA directed at *il8* and *il6* were used to directly suppress these genes. These secreted proteins were selected because of their strong IL-1 response at the mRNA level. With this approach strong suppression of both proteins was achieved at mRNA and protein level. The gene expression studies performed, showed a strong repression of inflammatory genes, probably due to an autocrine mechanism.

In summary the results show that application of RNAi directed against receptor-proximal (TAK1/ TAB1), or receptor-distal (AP-1) components of the IL-1 $\alpha$  signalling network or directly against IL-1-induced secreted inflammatory genes itself (IL-8/ IL-6) results in complex gene expression phenotypes displaying the desired but also unexpected effects on cellular gene expression. These experiments, therefore, reveal the potential but also the limitations of RNAi. This work underscores the importance of unbiased and systematic assessment of the phenotype of cells which are treated with individual siRNAs or combinations of siRNAs.

keywords: inflammation, signal transduction, siRNA



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Entzündung und Signaltransduktion.....	1
1.1.1 TAK1-/ TAB1-Signaltransduktionskomplex.....	1
1.1.1.1 Die MKKK TAK1.....	1
1.1.1.2 Das Adapterprotein TAB1.....	4
1.1.1.3 Regulation von TAK1 durch TAB1, TAB2 und TAB3.....	4
1.1.2 Transkriptionsfaktor AP-1.....	7
1.1.2.1 Zusammensetzung und Funktion der AP-1-Komplexe.....	7
1.1.2.2 Regulation der AP-1-Proteine.....	8
1.1.2.3 Zusammenfassung des Phänotyps von Gendeletionsexperimenten zu AP-1-Untereinheiten.....	12
1.1.2.4 AP-1-Faktoren in der Entzündung.....	12
1.1.2.5 <i>Crosstalk</i> zwischen NF- $\kappa$ B und AP-1-Faktoren.....	13
1.1.3 Die Rolle von Zytokinen und Chemokinen bei der Entzündungsreaktion am Beispiel von IL-8 und IL-6.....	14
1.1.3.1 Einleitung.....	14
1.1.3.2 Das Chemokin IL-8.....	14
1.1.3.3 Das Zytokin IL-6.....	17
1.2 RNA Interferenz.....	18
1.2.1 Allgemeines und Historie zur RNA Interferenz.....	18
1.2.2 Modell zum Mechanismus der RNA Interferenz.....	19
1.2.2.1 Initiationsschritt der RNA Interferenz.....	20
1.2.2.2 Effektorschritt der RNA Interferenz.....	22
1.2.3 Nebeneffekte und Schwierigkeiten bei Verwendung von siRNAs.....	25
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	29
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
2.1 Verbrauchsmaterial.....	30
2.2 Geräte.....	30
2.3 Chemikalien.....	31
2.4 Lösungen und Puffer.....	31
2.5 Medien.....	32
2.6 Enzyme und Enzympuffer.....	32
2.7 Antikörper und rekombinante Proteine.....	32
2.8 Vektoren.....	34
2.9 <i>TaqMan-Assays on Demand</i> , siRNAs, Primer und Oligonukleotide.....	34

---

2.10	Standards .....	36
2.11	Bakterienstämme .....	37
2.12	Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits .....	37
2.13	Verwendete Software.....	38
2.14	Molekularbiologische Methoden .....	38
2.14.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	38
2.14.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxipräparation) .....	38
2.14.1.2	Isolierung von RNA .....	38
2.14.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	39
2.14.2.1	Reinigung von DNA durch Affinitätschromatografie .....	39
2.14.2.2	Phenol/ Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation von DNA .....	39
2.14.2.3	DNA-Gelextraktion mit dem <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> .....	39
2.14.2.4	Lithiumchlorid-Präzipitation von RNA.....	39
2.14.3	Trennung von Nukleinsäuren.....	40
2.14.3.1	Agarosegelelektrophorese .....	40
2.14.3.2	Nichtdenaturierendes PAA-Gel .....	40
2.14.3.3	Kapillarelektrophorese.....	40
2.14.4	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	41
2.14.5	PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	41
2.14.6	Reverse Transkription PCR (RT-PCR) .....	42
2.14.7	Real Time RT-PCR.....	42
2.14.8	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	43
2.14.9	Herstellung eines eukaryotischen sh( <i>short hairpin</i> )RNA-Expressionsplasmids	44
2.14.9.1	Annealing der Oligonukleotide (shRNA-Matrizen).....	44
2.14.9.2	Klonierung von pSUPER-TAB1.....	45
2.14.10	Herstellung von d-siRNAs mit dem <i>Dicer siRNA Generation Kit</i> (Peqlab).....	45
2.14.10.1	Klonierung der DNA-Matrizen für TAK1 und Luziferase.....	46
2.14.10.2	Herstellung der DNA-Matrize für die Transkription.....	46
2.14.10.3	Herstellung und Aufreinigung von dsRNA.....	47
2.14.10.4	Herstellung und Aufreinigung von d-siRNA.....	47
2.14.11	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) .....	47
2.15	Bakterienkulturen.....	47
2.15.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	47
2.15.2	Dauerkulturen von Bakterien .....	48
2.16	Array-Techniken.....	48
2.16.1	Protokoll für DNA-Microarray-Einkanalexperimente .....	48
2.16.1.1	cDNA-Synthese mit dem Roche-System .....	48
2.16.1.2	cDNA-Synthese mit dem Ambion-System.....	49
2.16.1.3	Hybridisierung der Microarrays .....	50
2.16.1.4	Analyse und Auswertung der Microarray-Untersuchung.....	50
2.16.2	Protokoll für den <i>RayBio</i> <sup>®</sup> <i>Human Cytokine Antibody Array VI und VII</i> .....	51
2.17	Zellkultur-Techniken.....	52
2.17.1	Zelllinien.....	52

2.17.2	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung .....	52
2.17.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	53
2.17.4	Transfektion von Säugerzellen .....	53
2.17.4.1	Transiente Transfektion von Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode ...	53
2.17.4.2	Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA-Molekülen zur Herstellung genspezifischer <i>knock downs</i> .....	54
2.17.4.3	Herstellung eines stabilen Transfektanten-Zellpools.....	55
2.17.5	Stimulation und Ernten von Zellen.....	55
2.17.6	Chromatinfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 .....	56
2.18	Proteinbiochemische Methoden.....	56
2.18.1	Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen .....	56
2.18.1.1	Lysate zur Immunodetektion im Westernblot .....	56
2.18.1.2	Lysate zur Messung von Reporter-genaktivitäten .....	56
2.18.1.3	Direktlysate.....	56
2.18.2	Bestimmung der Aktivität von Enzymen durch Reporter-gen-Versuche .....	57
2.18.2.1	Luziferase-Messung .....	57
2.18.2.2	Beta-Galaktosidase-Messung .....	57
2.18.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976).....	57
2.18.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970).....	58
2.18.5	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot) und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion .....	58
2.18.6	ELISA für IL-8 und IL-6 .....	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
3.1	Teil I: Etablierung von siRNA-vermittelter Suppression vom TAB1-Protein und Genexpressionsstudien am TAK1-/ TAB1-Signalkomplex .....	60
3.1.1	Übersicht über die drei verwendeten siRNA-Strategien .....	60
3.1.2	Etablierung von Transfektionsbedingungen für RNAi-Experimente.....	61
3.1.3	Vergleich dreier siRNA-Methoden anhand der Suppression des Proteins TAB1.....	63
3.1.3.1	Suppression von TAB1 durch eine synthetische siRNA.....	63
3.1.3.2	Suppression von TAB1 durch eine endogen exprimierte shRNA.....	64
3.1.3.3	Suppression von TAB1 durch Dicer-generierte siRNAs.....	66
3.1.4	Analyse der Expression von Entzündungsgenen in TAB1 und TAK1 <i>knock down</i> -Zellen .....	69
3.2	Teil II: Untersuchungen zur RNAi-vermittelten Suppression von Transkriptions- faktoren und Entzündungsgenen während der IL-1 $\alpha$ -induzierten Entzündungs- antwort.....	76
3.2.1	Auswahl des Untersuchungssystems und der Zielstrukturen zur Modulation von Transkriptionsfaktoren und Entzündungsgenen mit siRNAs.....	76
3.2.1.1	Etablierung des Untersuchungssystems auf Zytokinebene: IL-1 $\alpha$ -induzierte Zytokinantwort von epithelialen KB-Zellen auf mRNA- und Proteinebene	76
3.2.1.2	Untersuchung auf Ebene der Transkriptionsfaktoren und Entzündungs- gene.....	83

3.2.1.3	Identifizierung von vier ERK-sensitiven, drei ERK-insensitiven und einem ERK-, p38 MAPK- und JNK-insensitiven IL-1 $\alpha$ -Transkriptionsfaktor(en) .	89
3.2.2	RNAi-vermittelte Suppression auf Ebene der AP-1-Transkriptionsfaktoren .....	92
3.2.2.1	Etablierung und Validierung der siRNA-vermittelten Hemmung von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf Proteinebene .....	92
3.2.2.2	Etablierung und Validierung der siRNA-vermittelten Hemmung von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf mRNA-Ebene .....	94
3.2.2.3	Einfluss von siRNAs gegen c-JUN, JUNB, JUND, cFOS oder FRA-1 auf das Entzündungsprofil von humanen KB-Zellen.....	98
3.2.2.4	Validierung der Effekte der c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 <i>knock down</i> -Ansätze auf die Entzündungsgene IL-8 und IL-6.....	103
3.2.2.5	Gegenseitige Regulation der AP-1-Faktoren c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 .....	108
3.2.3	RNAi-vermittelte Suppression auf Ebene der Entzündungsgene .....	111
3.2.3.1	Etablierung und Validierung der direkten siRNA-vermittelten Suppression der Entzündungsgene IL-8 und IL-6 .....	111
3.2.3.2	Untersuchungen der Genexpressionsprofile von IL-8 und IL-6 <i>knock down</i> -Zellen .....	112
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>117</b>
4.1	RNAi-vermittelte Suppression von Proteinen des rezeptorproximalen TAK1-/ TAB1-Signalkomplexes .....	117
4.2	siRNA-abhängige Inhibition auf Ebene des AP-1-Transkriptionsfaktors.....	121
4.2.1	Identifizierung von IL-8 und IL-6 als AP-1-Zielgene.....	125
4.2.2	Regulation der AP-1-Faktoren untereinander .....	128
4.3	Hemmung durch RNAi auf der Ebene der sezernierten Entzündungsproteine IL-8 und IL-6 .....	128
4.4	Ausblick .....	131
<b>5</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>150</b>
6.1	Sonden des Transkriptionsfaktorarrays TFhum.....	150
6.2	Antikörper des <i>RayBio</i> <sup>®</sup> <i>Human Cytokine Antibody Arrays</i> .....	152
6.2.1	Array VI .....	152
6.2.2	Array VII .....	152
<b>7</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>Liste wissenschaftlicher Publikationen .....</b>	<b>154</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der wichtigsten MAPK-Signalwege .....	2
Abbildung 2: Modell zur IL-1-abhängigen Aktivierung von TAK1 .....	5
Abbildung 3: Regulation der Transkription von cFOS und c-JUN .....	9
Abbildung 4: Mechanismus der RNA Interferenz .....	20
Abbildung 5: Struktur des RNase III-Enzyms Dicer .....	21
Abbildung 6: Drei RNAi-Strategien in Säugerzellen .....	60
Abbildung 7: Etablierte Transfektionsbedingungen für siRNA-vermittelte Suppression von exogenen Genen in KB-Zellen .....	62
Abbildung 8: Transiente Suppression von TAB1 durch siRNAs zeigt keine Inhibition der IL- 1 $\alpha$ -induzierten Aktivierung von MAPK- und NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsproteinen .....	64
Abbildung 9: Strategie zur Herstellung von shRNAs/ siRNAs am Beispiel von TAB1 .....	65
Abbildung 10: Stabile Suppression von TAB1 durch einen shRNA-Expressionsvektor hat keinen Einfluss auf die IL-1 $\alpha$ -vermittelte Aktivität von MAPK- und NF $\kappa$ B-Signaltrans- duktionsproteinen .....	66
Abbildung 11: Herstellung von d-siRNA-Gemischen am Beispiel von TAK1 d-siRNA .....	67
Abbildung 12: Einfluss der durch transiente Transfektion eines d-siRNA-Gemisches gegen TAB1 (A) bzw. TAK1 (B) supprimierten Expression auf die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege .....	68
Abbildung 13: Suppressionen in den <i>knock down</i> -Experimenten der Genexpressionsstudie	70
Abbildung 14: Partielle Degradation der RNAs der TAB1, TAK1 und Luziferase <i>knock down</i> - Experimente .....	71
Abbildung 15: Entzündungsprofile der TAB1, TAK1 und Luziferase d-siRNA-Experimente .....	72
Abbildung 16: Induktion ausgewählter Entzündungsgene in Abhängigkeit von der Zellbehandlung (Zytokin, d-siRNA oder Zytokin und d-siRNA) .....	74
Abbildung 17: IL-1 $\alpha$ -Induktion und Hemmeffekte durch MAPK-Inhibitoren auf ausgewählte Entzündungsgene auf mRNA-Ebene .....	78
Abbildung 18: Detektion von sezernierten Proteinen mittels Zytokinarray .....	79
Abbildung 19: Normalisierte Signalintensitäten von sezernierten und partiell IL-1 $\alpha$ -regulierten Proteinen .....	80
Abbildung 20: Validierung der Zytokinarray-Ergebnisse für IL-8 und IL-6 durch spezifische ELISAs .....	81
Abbildung 21: Hemmbarkeit der fünf IL-1 $\alpha$ -regulierten Proteine .....	82
Abbildung 22: Kinetik der IL-1 $\alpha$ -abhängigen Genexpression ausgewählter Entzündungsgene des Entzündungsarrays von humanen KB-Zellen .....	84
Abbildung 23: IL-1 $\alpha$ -Kinetik der Genexpression von Transkriptionsfaktoren aus humanen KB- Zellen .....	86
Abbildung 24: Kinetik von IL-1 $\alpha$ -induzierten Transkriptionsfaktoren und den Mitgliedern der JUN/ FOS-Familie JUND, FOSB und FRA-2 zu den Zeitpunkten 0,25-4h aus Experiment der Abbildung 23 .....	88

---

Abbildung 25: Einfluss der MAPK-Hemmstoffe PD98059, SP600125 und SB203580 auf IL-1 $\alpha$ -Zieltranskriptionsfaktoren, die an der initialen Entzündungsgenexpression beteiligt sind .....	90
Abbildung 26: Supprimierte Proteinexpression von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 nach Applikation der entsprechenden siRNAs.....	93
Abbildung 27: Real Time PCR-Untersuchungen mit <i>TaqMan-Assays on Demand</i> zur Überprüfung der <i>knock down</i> -Zellen von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 .....	95
Abbildung 28: Herkömmliche RT-PCR detektiert JUNB siRNA-bedingte Suppression in JUNB <i>knock down</i> -Zellen .....	96
Abbildung 29: Lokalisation der TaqMan-Sonden und siRNAs auf den mRNAs JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 .....	97
Abbildung 30: Hemmeffekte der JUND mRNA durch drei unterschiedliche siRNAs und deren Kombination.....	98
Abbildung 31: Expressionsprofile von Entzündungsgenen der c-JUN, JUNB, JUND (Exp.1), cFOS und FRA-1 <i>knock down</i> -Experimente.....	100
Abbildung 32: Effekte von AP-1-Komponenten in Einzel- und kombinatorischen <i>knock down</i> -Ansätzen auf IL-8 und IL-6 und IL-1 $\alpha$ -induzierte Rekrutierung von JUNB und JUND an den IL-8-Promotor.....	105
Abbildung 33: Induktion des IL-8-Luziferasereporters in FRA-1 <i>knock down</i> -Zellen .....	107
Abbildung 34: Beeinflussung der mRNA-Expression von AP-1-Untereinheiten in den c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 <i>knock downs</i> .....	108
Abbildung 35: Regulation der AP-1-Untereinheiten c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 untereinander.....	111
Abbildung 36: Hemmung der mRNA- (A, B) und Proteinexpression (C, D) von IL-8 und IL-6 in IL-8 und IL-6 <i>knock down</i> -Zellen.....	112
Abbildung 37: Effekte der IL-8 und IL-6 <i>knock downs</i> auf die Expression von Entzündungsgenen.....	113
Abbildung 38: Regulierte Entzündungsgene in IL-6 <i>knock down</i> - und IL-6-stimulierten Zellen .....	116
Abbildung 39: Zusammenfassende schematische Darstellung durchgeführter RNAi-vermittelter Modulationen auf drei Ebenen des Entzündungsprozesses.....	131

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phänotypen und Auswirkungen von <i>knock out</i> - und <i>knock in</i> -Strategien der JUN- und FOS-Familienmitglieder während der pränatalen und postnatalen Entwicklung .....	12
Tabelle 2: Komponenten und Funktionen von diversen RISC-Komplexen .....	25
Tabelle 3: Unterschiedlich starke Induktion von Interferonzielgenen durch d-siRNAs und siRNAs .....	73
Tabelle 4: 26 Genprodukte sind sowohl auf dem Zytokinarray ( <i>RayBio</i> <sup>®</sup> <i>Human Cytokine Antibody Array VI und VII</i> ) als auch auf dem Entzündungsarray (HA286) vorhanden ...	77
Tabelle 5: Einfluss der MAPK-Hemmstoffe PD98059, SP600125 und SB203580 auf ausgewählte Entzündungsgene auf mRNA-Ebene.....	78
Tabelle 6: IL-1 $\alpha$ -Induktion und Hemmeffekte durch MAPK-Inhibitoren auf sieben sekretorische Proteine, gemessen mit dem Zytokinarray aus Abbildung 18 und den ELISA-Versuchen aus Abbildung 20.....	81
Tabelle 7: Vergleich der Hemmeffekte von IL-8, IL-6 und RANTES auf mRNA- und Proteinebene durch MAPK-Inhibitoren .....	82
Tabelle 8: Proteinfamilien des humanen Transkriptionsfaktorarrays TFhum.....	85
Tabelle 9: IL-1 $\alpha$ -induzierte Transkriptionsfaktor-mRNAs des Experimentes aus Abbildung 23 .....	87
Tabelle 10: Vergleich der Hemmungen der Transkriptionsfaktoren durch PD98059, SP600125 und SB203580 im basalen und Entzündungszustand .....	91
Tabelle 11: siRNA-Effekte auf Entzündungsgene in unstimulierten und stimulierten (4h IL-1 $\alpha$ ) c-JUN, JUNB, JUND Exp.1 (8h IL-1 $\alpha$ ), cFOS und FRA-1 <i>knock down</i> -Zellen .....	101
Tabelle 12: Induktion von Interferon-, dsRNA- und viralen Infektion-induzierbaren Genen durch siRNAs gegen AP-1-Untereinheiten .....	102
Tabelle 13: Gegenseitige Effekte der AP-1-Komponenten c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf die mRNA-Expression dieser Transkriptionsfaktoren.....	109
Tabelle 14: Hemmung von Interferon-, dsRNA- und virale Infektion-induzierbaren Genen durch IL-8 und IL-6 siRNAs.....	114
Tabelle 15: Vergleich der Phänotypen von <i>tab1</i> -, <i>tak1</i> - und <i>tab2</i> -mutierten Embryos.....	119
Tabelle 16: Vergleich der Vor- und Nachteile der drei verwendeten siRNA-Methoden .....	121

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	n	nano ( $10^{-9}$ )
A	Ampere	NTP	Nukleosidtriphosphat
ad	<i>additional</i>	OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei xnm
AMP	Adenosinmonophosphat	p	pico ( $10^{-12}$ )
AP-1	<i>activating protein 1</i>	PAA	Polyacrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
as	<i>antisense</i>	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
ATP	Adenosintriphosphat	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
b/ bp	Basen/ Basenpaar	pH	$-\log c[H^+]$
bzw.	beziehungsweise	PKR	<i>protein kinase RNA activated</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratmeter	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
cDNA	komplementäre DNA	PVDF	Polyvinylidenfluorid
cRNA	komplementäre RNA	R	Rezeptor
CTP	Cytosintriphosphat	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
Cy	Cyanin-Farbstoff	RNA	Ribonukleinsäure
d/ dd	vor Nukleotiden: desoxy/ dideoxy	RNAi	RNA Interferenz
Da	Dalton	rpm	Umdrehungen pro Minute
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser	RT	<i>reverse transcriptase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	s	Sekunde(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid	S	Siemens
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
ds	<i>double strand</i>	se	<i>sense</i>
DTT	Dithiothreitol	siRNA	<i>short interfering RNA</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	ss	<i>single strand</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SV40	Siamin Virus 40
ELISA	<i>enzyme-linked Immunosorbent assay</i>	TAB1	<i>TAK1 binding protein</i>
FKS	fötales Kälberserum	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
g	Gramm	TAK1	<i>TGFβ activated kinase</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	TBS	Trisgepufferte Salzlösung
GTP	Guanosintriphosphat	TEMED	N, N', N'-Tetramethylendiamin
h	human bzw. Stunde(n)	TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung	TLR3	<i>toll-like receptor 3</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfon-säure	TNF	Tumor Nekrose Faktor
IFN	Interferon	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IL	Interleukin	TTP	Thymintriphosphat
JNK	<i>c-JUN N-terminal kinase</i>	U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>units</i> )
k	kilo ( $10^3$ )	UTP	Uridintriphosphat
l	Liter	UTR	<i>untranslated region</i>
LB	Lauria Bertoni	UV	Ultraviolett
log	dekadischer Logarithmus	vgl.	vergleiche
m	milli ( $10^{-3}$ )	V	Volt
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	v/v	Volumen pro Volumen
min	Minute(n)	w/v	Gewicht pro Volumen
MKK	MAPK Kinase	wt	Wildtyp
MKKK	MAPK Kinase Kinase	μ	mikro ( $10^{-6}$ )
mol	Mol	z.B.	zum Beispiel
mRNA	<i>messenger RNA</i>		



# 1 Einleitung

## 1.1 Entzündung und Signaltransduktion

Organismen sind pathogenen Mikroorganismen aus der Umwelt ausgesetzt. Zur Abwehr der Pathogene und zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus haben diese einen Schutzmechanismus, das Immunsystem, entwickelt. Eine der wichtigsten Reaktionen der unspezifischen Immunantwort ist das Auslösen einer Entzündung am Ort der Infektion. Sie dient dazu, die Infektion lokal zu bekämpfen, ihre Ausbreitung einzudämmen und beschädigtes Gewebe zu entfernen. Dabei treten die charakteristischen fünf Symptome der Entzündung - Rubor, Tumor, Dolor, Calor und Functio Laesa - auf. Die Wirkung durch die zwei wichtigsten proinflammatorischen Stimuli IL-1 (Interleukin-1) und TNF $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ ) wird über Signaltransduktionsprozesse vermittelt. Signaltransduktion ist die Entstehung, Weiterleitung und Wirkung von Informationen in lebenden Systemen. Dadurch wird die Fähigkeit einer Zelle, sich einer verändernden physiologischen Umgebung anzupassen und die Homöostase von Geweben und Organen aufrechtzuerhalten, gewährleistet. Die bei einer Entzündung aktivierte Signaltransduktion umfasst die MAPK (*mitogen-activated protein kinases*)-Signalkaskaden und den NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*)-Signalweg.

In allen an der Entzündungsreaktion beteiligten Signalwegen sind auf den unterschiedlichsten Signaltransduktionsebenen Proteine entscheidend an der Expression entzündungsrelevanter Gene beteiligt. Derartige Schlüsselpositionen während einer Entzündung sind auf Ebene des TAK1-/TAB1-Signaltransduktionskomplexes, der Transkriptionsfaktoren und der sezernierten Zytokine zu finden.

### 1.1.1 TAK1-/TAB1-Signaltransduktionskomplex

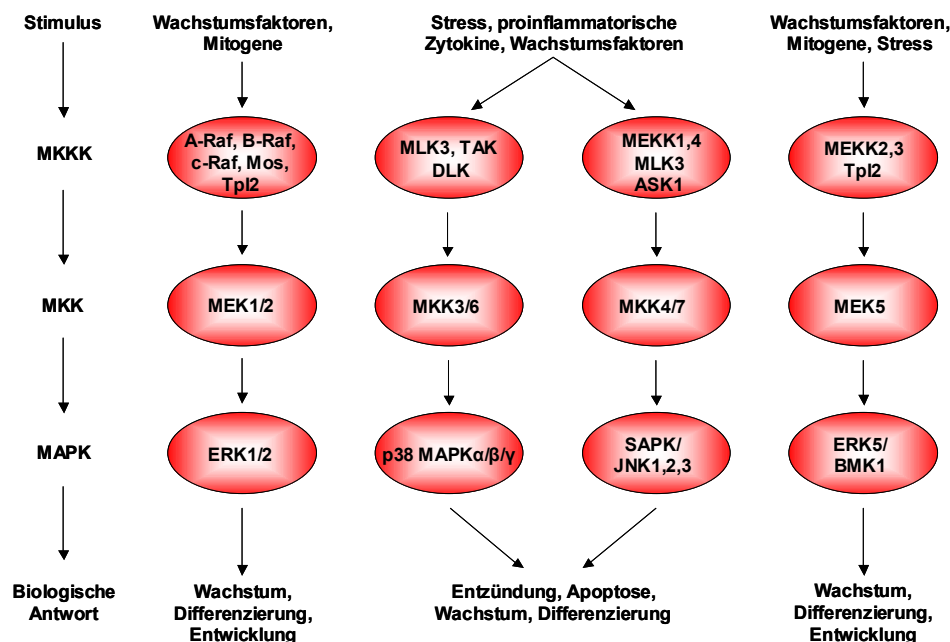
#### 1.1.1.1 Die MKKK TAK1

Der TAK1-/TAB1-Signaltransduktionskomplex besteht aus der MKKK (MAPK Kinase Kinase) TAK1 (*TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) activated kinase*) und dessen Adapterprotein TAB1 (*TAK1 binding protein*). TAK1 ist eine breitflächig exprimierte Kinase, die als ein TGF $\beta$ -aktivierbares Enzym identifiziert wurde (Yamaguchi et al., 1995). Das Protein besteht aus 579 Aminosäuren mit einer N-terminalen Kinasedomäne, die die konservierten Subdomänen I–XI umfasst, und einer 300 Aminosäuren langen C-terminalen Domäne ohne Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen. An Position 63 in der Domäne II befindet sich ein Lysinrest, der bei den meisten Proteinkinase konserviert ist. Eine Mutation dieses Lysinrestes führt zu einem katalytisch inaktiven TAK1-Protein, was auf die wichtige Funktion dieser Aminosäure in der ATP-Bindungstasche der Kinase hinweist (Shibuya et al., 1996).

#### TAK1 aktiviert MAPK-Signalwege

Das Protein TAK1 ist ein Verzweigungspunkt für mehrere Signalwege. Als MKKK stellt TAK1 die erste Kinase in dem dreiteiligen modularen Aufbau von MAPK-Signalwegen in Säugern dar. Entsprechend der hohen Zahl an Stimuli, durch die die Kaskade aktiviert werden kann, ist die MAPK-Signaltransduktion an vielen physiologischen Prozessen wie Wachstum,

Entwicklung, Entzündung und apoptotischen Prozessen beteiligt (Abbildung 1). Die einzelnen MAPK-Signalwege sind entsprechend der von ihnen aktivierten MAPK benannt. Unterschieden werden dabei die vier Haupt-MAPK-Signalwege: p38 MAPK, ERK (*extra-cellular regulating kinase*) 1/ 2, JNK (*c-JUN N-terminal kinase*) und ERK5 (Yang et al., 2003).



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der wichtigsten MAPK-Signalwege**

Modifiziert nach ([http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK\\_Cascade.asp](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK_Cascade.asp), 26.03.06)

MKKK sind Serin-/ Threonin-Kinasen, die nach Aktivierung MKK (MAPK Kinasen) in einem konservierten Motiv innerhalb der Subdomäne VIII phosphorylieren. Die MKK sind für eine duale Phosphorylierung am Tyrosin und Threonin zur Aktivierung von MAPK zuständig. Dabei erkennen sie neben dem Thr-X-Tyr-Motiv (Payne et al., 1991) in der Aktivierungsschleife der MAPK auch ihre spezifische dreidimensionale Struktur. Die Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung der Aktivierungsschleife und der angrenzenden Sequenzen, wie durch Strukturaufklärung der phosphorylierten und der unphosphorylierten Form gezeigt werden konnte (Canagarajah et al., 1997). So kann TAK1 z.B. nach Stimulation durch IL-1 mittels Phosphorylierung von MKK3 und MKK6 die Aktivierung von p38 MAPK sowie durch Phosphorylierung von MKK4 die Aktivierung von JNK vermitteln (Wang et al., 1997; Shirakabe et al., 1997; Moriguchi et al., 1996). Um selbst aktiviert zu werden, müssen die MAPK an je zwei Aminosäureresten gleichzeitig eine Phosphatgruppe tragen. Inaktiviert werden sie durch MAPK-Phosphatasen. Phosphorylierte MAPK bewirken schließlich eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1, die die Transkription der Zielgene auslösen (Whitmarsh and Davis, 1996). Sie phosphorylieren ihre Substrate an Serin- und Threonin-Resten in der Sequenz Pro-X-Ser/ Thr-Pro und gehören daher zur Klasse der Serin-/ Threonin-Kinasen (Alvarez et al., 1991). Die MAPK können nicht nur Bindung und Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren, sondern indirekt auch epigenetische Modifikationen wie Histon H3- und Histon H4-Acetylierung sowie Phosphorylierung und damit die Chromatinstruktur beeinflussen (Saccani et al., 2002; Saccani et al., 2001). Obgleich Transkriptionsfaktoren für die MAPK die wichtigsten Zielmoleküle sind,

gelangt nur ein bestimmter Teil der aktivierten MAPK in den Kern. Der Rest verbleibt im Zytoplasma oder in anderen subzellulären Kompartimenten und greift über posttranskriptionelle Mechanismen in die Genexpression ein (Chang and Karin, 2001). Es werden neben Transkriptionsfaktoren auch andere Proteinkinasen, Phospholipasen und Zytoskelettproteine von MAPK phosphoryliert. Ein Beispiel sind die von p38 MAPK regulierten MAPKAPK (*MAPK-activated protein kinases*).

### **TAK1 aktiviert den NF- $\kappa$ B-Signalweg**

Neben den MAPK-Signalwegen stimuliert exprimiertes und aktiviertes TAK1 in Säugerzellen durch Aktivierung des IKK (I $\kappa$ B-Kinasen)-Komplexes den NF- $\kappa$ B-Signalweg (Sakurai et al., 1999; Sakurai et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert eine Vielzahl von Zielgenen, die unter anderem für zelluläre Prozesse wie Entzündung, Immunantwort, Proliferation, Tumorentstehung und Apoptose wichtig sind (Ghosh and Karin, 2002). Informationen zu der Rolle von NF- $\kappa$ B wurden unter anderem durch verschiedene Mausmodelle erhalten (Alcamo et al., 2001; Senftleben et al., 2001; Sha et al., 1995).

Unter dem Begriff NF- $\kappa$ B sind dimere Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die zur REL-Familie gehören (Schmitz et al., 2004). Säugerzellen exprimieren fünf REL-Proteine, von denen c-REL, REL A und REL B als reife Proteine exprimiert werden. Die anderen Proteine werden durch die Gene *nfk1* und *nfk2* in Form von Vorläufern kodiert und müssen proteolytisch gespalten werden. Aus den 105 und 100kDa großen Proteine (p105, p100) entstehen die reifen 50 bzw. 52kDa großen NF- $\kappa$ B-Proteine p50 und p52.

In unstimulierten Zellen ist NF- $\kappa$ B an den Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  (*inhibitor of NF- $\kappa$ B $\alpha$* ) gekoppelt, der im Zytosol der Zelle lokalisiert ist (Li and Verma, 2002). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt stimulusabhängig durch Phosphorylierung des Inhibitorproteins durch IKK, das in der Folge degradiert wird und so NF- $\kappa$ B freigibt (Li and Verma, 2002). Der IKK-Komplex besteht aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , die I $\kappa$ B $\alpha$  direkt phosphorylieren können. Außerdem liegt im Komplex die regulatorische Untereinheit IKK $\gamma$  (NEMO) vor, die für die Aktivierung des Signalweges notwendig ist (Karin and Lin, 2002).

Als Transkriptionsfaktor transloziert NF- $\kappa$ B mit Hilfe seiner Kernlokalisierungssequenz in den Zellkern und aktiviert über die Bindung an entsprechende Elemente in den Promotoren der Zielgene deren Gentranskription. Im transkriptionell aktiven NF- $\kappa$ B-Komplex kommt es im Zellkern auf einer zweiten Ebene zu einer Regulation. Die Aktivität der REL-Proteine wird über verschiedene Mechanismen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Acetylierung verändert (Schmitz et al., 2004), mit dem Ziel eine vollständige Induktion der NF- $\kappa$ B-regulierten Zielgene zu ermöglichen (Sizemore et al., 1999; Zhong et al., 1997).

### 1.1.1.2 Das Adapterprotein TAB1

TAK1 ist die einzige bisher bekannte MKKK, die alleine keine Aktivität zeigt. Für die Aktivierung der Kinaseaktivität benötigt TAK1 das Adapterprotein TAB1, welches über einen *2-hybrid-screen* in Hefen gemeinsam mit einem zweiten Adapterprotein (TAB2) gefunden wurde (Shibuya et al., 1996).

Humanes TAB1 besteht aus 504 Aminosäuren, wobei die 68 C-terminalen Aminosäuren (Aminosäuren 437-504) die Interaktion und Aktivierung von TAK1 vermitteln und dabei an die N-terminale Hälfte (Aminosäuren 1-303) von TAK1 binden (Sakurai et al., 2000). Der molekulare Mechanismus der TAB1-vermittelten Aktivierung von TAK1 wurde hauptsächlich in transienten Transfektionsexperimenten untersucht. Die Assoziation zwischen der Kinasedomäne von TAK1 und TAB1 bewirkt eine TAK1-Autophosphorylierung an einem Serin- und einem Threoninrest in der Aktivierungsschleife. Die 68 C-terminalen Aminosäuren von TAB1 wurden als minimale TAK1-Aktivierungsdomäne bezeichnet. Sie besteht aus zwei Subdomänen, wobei die eine für die Assoziation mit der Kinase und die andere für die Aktivierung von TAK1 verantwortlich ist (Sakurai et al., 2000).

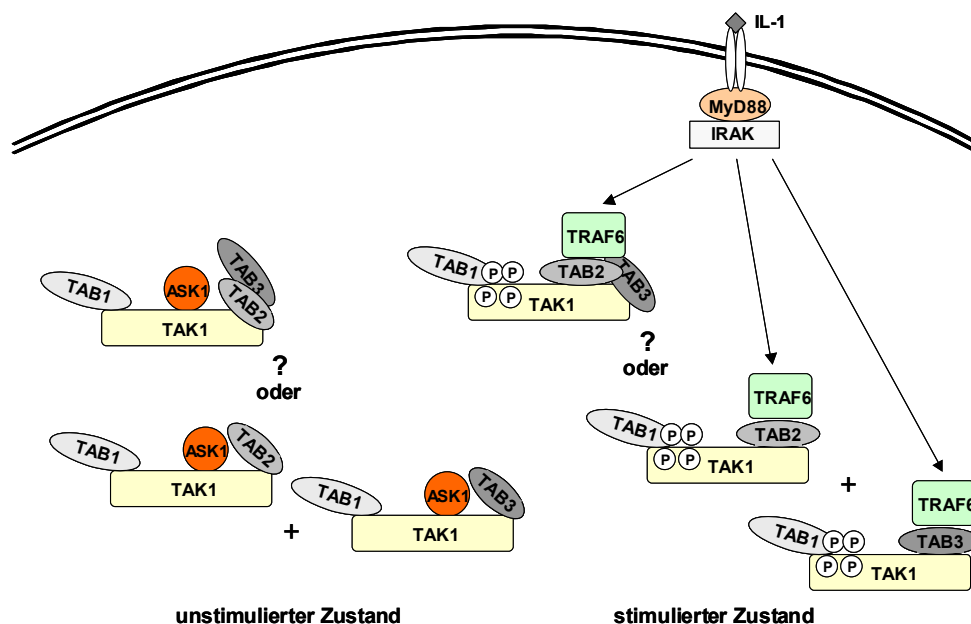
Eine genauere Charakterisierung der Interaktion von TAB1 mit TAK1 wurde durch NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Studien möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die letzten 30 Aminosäuren von TAB1 eine  $\alpha$ -helikale Struktur einnehmen und TAB1 als *docking site* dienen, welche zwischen Säugern, *Xenopus* und *Caenorhabditis elegans* konserviert ist (Ono et al., 2001). Durch zielgerichtete Mutagenese konnte für die Aminosäure an Position 484 (bei Säugern Phenylalanin) bei der Interaktion mit TAK1 eine entscheidende Rolle identifiziert werden, die jedoch durch eigene Arbeiten nicht bestätigt werden konnte (Kracht et al., unveröffentlichte Arbeiten).

### 1.1.1.3 Regulation von TAK1 durch TAB1, TAB2 und TAB3

In den letzten Jahren wurde besonders der IL-1-abhängige Aktivierungsmechanismus von TAK1 untersucht. Der derzeitige Stand der Forschung zur IL-1-vermittelten Regulation von TAK1 ist in Abbildung 2 auf der nächsten Seite dargestellt. Biochemische Analysen haben gezeigt, dass das Adaptermolekül TAB2 eine wichtige Rolle in der initialen TAK1-Aktivierung spielt. Im unstimulierten Zustand der Zelle ist TAB2 in membranösen Strukturen wie der Zellmembran lokalisiert und transloziert IL-1-abhängig ins Zytosol. Dort ermöglicht es dem konstitutiven, aber katalytisch inaktiven TAK1-/TAB1-Komplex eine Interaktion mit TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) und IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*). Dies bewirkt in der Folge die Aktivierung von TAK1 und somit des p38 MAPK-, JNK- und NF- $\kappa$ B-Signalweges (Jiang et al., 2002; Takaesu et al., 2001). TAB2 bindet mit dem C-Terminus (Aminosäuren 401-693) an die C-terminale Region von TAK1 (Aminosäuren 403-579) (Takaesu et al., 2000). Wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, bilden TAK1 und TAB1 im Basalzustand der Zelle mit TAB2 und/ oder TAB3 konstitutive Proteinkomplexe (Cheung et al., 2004; Ishitani et al., 2003). Nach einer IL-1-Stimulation kommt es zur TAK1-Autophosphorylierung an den Aminosäuren Serin 192 und Threonin 187. Auch eine parallele Überexpression von TAK1 und TAB1 bewirkt in Abhängigkeit von der TAK1-Aktivität eine

konstitutive Phosphorylierung beider Proteine (Singhirunnusorn et al., 2005; Kishimoto et al., 2000; Sakurai et al., 2000). Im Gegensatz dazu besitzt weder TAK1 noch TAB1 aktivierendes Potential, wenn eines der Proteine alleine exprimiert wird. TAK1 phosphoryliert TAB1 an Phospho-Akzeptoraminosäuren, die in der TAK1-Interaktions- und Aktivierungsdomäne von TAB1 liegen. Die Divergenz zwischen dem in Zellen vorliegenden inaktiven TAK1-/ TAB1-Komplex und dem katalytisch aktiven ektopisch exprimierten Komplex beider Proteine kann durch einen Inhibitor erklärt werden. Für ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) wurde eine hemmende Wirkung auf die TAK1-abhängige Signaltransduktion beschrieben (Mochida et al., 2000). Möglich ist, dass dieses Protein, an den endogenen TAK1-/ TAB1-Komplex gebunden, dessen Interaktion mit den TRAF6-Molekülen und damit auch dessen Aktivierung verhindert.

Alternativ kann die Überexpression von TAK1 und TAB1 zu einer Oligomerisierung führen, die möglicherweise unter Rekrutierung von TAB2 und TRAF6 eine Autoaktivierung bewirkt.



**Abbildung 2: Modell zur IL-1-abhängigen Aktivierung von TAK1 (auf *in vitro*-Daten basierend)**

In der unstimulierten Zelle ist TAK1 katalytisch nicht aktiv, da ein inhibitorisches Protein (ASK1) die Interaktion von TAB2 und/ oder TAB3 mit TRAF6 verhindert. Nach einer Stimulation mit IL-1 kommt es zur Interaktion von TAB2 und/ oder TAB3 mit TRAF6 und zur Bildung eines rezeptornahen Komplexes, der für die Aktivierung von TAK1 essentiell ist. Die Aktivierung von TAK1 bewirkt eine Konformationsänderung und Autophosphorylierung und in der Folge eine TAK1-vermittelte Phosphorylierung von TAB1. Es ist noch unklar, ob TAB3 mit TAB2 zusammen im TAK1-/ TAB1-Komplex vorliegt oder ob zwei distinkte Komplexe mit TAB2 und TAB3 existieren.

Folgender zusätzlicher Befund unterstreicht die Komplexität der Regulation der TAK1-Aktivität durch TAB1: Es konnte gezeigt werden, dass TAB1, welches selbst keine katalytische Aktivität aufweist, die MAPK p38 $\alpha$  bindet und damit zu deren Autophosphorylierung sowie Aktivierung führt (Ge et al., 2003). Im Gegensatz zu der „klassischen“, über MKK3/ 6-vermittelten Aktivierung von p38 MAPK induziert die TAB1-vermittelte p38 Kinaseaktivierung in neonatalen Herzmyozyten keine Genexpression proinflammatorischer Faktoren und Herzmarkern sowie keine Änderungen der Zellmorphologie. Vielmehr verhindert TAB1 durch die Bindung an die MAPK ihre nukleäre Lokalisation, so dass p38 MAPK im Zytosol verbleibt (Lu et al., 2005).

Zusätzlich wurden Ergebnisse publiziert, wonach p38 $\alpha$  das TAB1-Protein *in vitro* an drei Aminosäuren (Serin 423, Serin 438 und Threonin 431) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Inhibition von TAK1 und beschreibt damit einen neuartigen negativen Rückkopplungsmechanismus, über den die Dauer der TAK1-Aktivierung in Zellen limitiert wird. Entsprechend kommt es durch eine Inhibition von p38 $\alpha$  mit dem SB203580-Hemmstoff zur Aktivierung von TAK1 sowie zur Erhöhung der katalytischen Aktivität TAK1 in p38  $\alpha$ -defizienten Zellen (Cheung et al., 2003).

Die Funktionen der Adapterproteine TAB1 und TAB2 wurden in Mausmodellen *in vivo* untersucht. Die Zerstörung des *tab1*-Gens ist embryonal letal, was den Einfluss von TAB1 bei der TGF $\beta$ -Signaltransduktion verdeutlicht. In primären embryonalen Fibroblasten konnte zudem gezeigt werden, dass die basale Aktivität von TAK1 tatsächlich von der Anwesenheit von TAB1 abhängig ist (Komatsu et al., 2002). Die IL-1-abhängige Signaltransduktion wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Auch die genetische Deletion von TAB2 ist aufgrund einer gestörten Entwicklung der Leber letal. Im Gegensatz zu biochemischen Analysen zeigten Experimente mit Zellen aus diesen Embryos, dass TAB2 in der IL-1-abhängigen Signaltransduktion nicht essentiell ist (Sanjo et al., 2003). Möglich ist, dass die TAB2-Funktionen *in vivo* durch ein weiteres TAK1-bindendes Protein, TAB3 (Cheung et al., 2004; Ishitani et al., 2003; Munoz-Sanjuan et al., 2002), kompensiert wird. Cheung et al. und Ishitani et al. zeigten, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF TAK1-Komplexe aktivieren, bei denen TAB3 an TAK1 gebunden ist. TAB3 kann TRAF6 binden. Darüber hinaus übernimmt TAB3 zusätzlich eine Rolle im TNF-Signalweg durch Interaktion mit TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*). Kontrovers ist, ob TAB3 im Komplex mit TAK1, TAB1 und TAB2 vorliegt oder ob es zwei distinkte TAK1-/TAB1-Komplexe gibt, die entweder TAB2 oder TAB3 gebunden haben (Cheung et al., 2004; Ishitani et al., 2003).

Bis zur Publikation von *in vivo*-Untersuchungen mit TAK1-defizienten Mäusen blieb unklar, ob die Proteine der TAB-Familie für die TAK1-Aktivierung essentiell sind oder ob der TAK1-Komplex selber verzichtbar für die Aktivierung der NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signalwege ist. Im Jahr 2005 wurden zwei Untersuchungen mit TAK1-defizienten Mäusen publiziert (Sato et al., 2005; Shim et al., 2005). Die Ergebnisse bestätigten frühere Befunde aus Zellen mit siRNA-vermittelter TAK1-Suppression. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von TAK1 die IL-1-, TNF- und TLR-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung aufhebt (Sato et al., 2005; Shim et al., 2005; Takaesu et al., 2003). Die Defizienz von TAK1 führt zur frühen embryonalen Letalität. Zusätzlich zum Einfluss im NF- $\kappa$ B-Signalweg machten die *in vivo*-Experimente deutlich, dass im Gegensatz zu TAB1 und TAB2, TAK1 bei der IL-1-Rezeptor-, TNF-Rezeptor- und TLR3 (*toll-like receptor 3*)-vermittelten Aktivierung des JNK-Signalweges essentiell ist (Sato et al., 2005; Shim et al., 2005).

## 1.1.2 Transkriptionsfaktor AP-1

### 1.1.2.1 Zusammensetzung und Funktion der AP-1-Komplexe

Der Transkriptionsfaktor *activating protein 1* (AP-1) bezeichnet eine Familie DNA-bindender Proteine, die ihre Funktion als Dimere ausübt und eine zentrale Rolle in der Regulation der eukaryotischen Genexpression hat (Angel and Karin, 1991). AP-1 wurde als ein TPA-induzierbarer Transkriptionsfaktor identifiziert, der an den Enhancer-Regionen des SV40-Virus und des Metallothioningens bindet (Angel et al., 1987). Der Dimer-Komplex besteht aus den Mitgliedern der JUN- (c-JUN, JUNB und JUND), der FOS- (cFOS, FOSB, FRA-1 und FRA-2) sowie der ATF (*activating transcription factor*)-Familie (Karin et al., 1997). Die AP-1-Untereinheiten gehören zu den bZIP-Proteinen, die sich durch eine basische DNA-Bindungsdomäne und eine Siebener-Wiederholung von Leucinresten (*leucine zipper domain*) auszeichnen. Die bZIP-Region vermittelt dabei die Interaktion der zwei Faktoren des AP-1-Komplexes (Landschulz et al., 1988). Durch die Dimerisierung werden die basischen DNA-Bindungsdomänen der zwei Proteine in Nachbarschaft gebracht, so dass jedes Monomer in der großen Grube der DNA mit einer Sequenzhälfte des AP-1-Bindemotivs interagieren kann (Schumacher et al., 2000; Ellenberger et al., 1992). Der Komplex kann als Homo- oder Heterodimer existieren, wobei JUN-Untereinheiten stabile Heterodimere mit FOS- und ATF-Familienmitgliedern sowie Homodimere mit Proteinen der eigenen Familie bilden (Dorsey et al., 1995; Hai and Curran, 1991; Ziff, 1990; Zerial et al., 1989; Smeal et al., 1989). Die FOS-Proteine sind als Homodimere instabil (Ziff, 1990). Chinenov und Kerppola veröffentlichten, dass JUN- und FOS-Familienmitglieder Interaktionen mit mehr als 50 verschiedenen Proteinen eingehen (Chinenov and Kerppola, 2001). Darunter sind weitere bZIP-Proteine, unter anderem der MAF (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*)-, der CNC (*cap-n-collar*)- und der C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*)-Familie. Aber auch Proteine, die keine bZIP-Regionen aufweisen (z.B. aus der NFAT (*nuclear factor of activated T cells*)- oder der ETS (*E-twenty-six specific*)-Familie), transkriptionelle Aktivatoren sowie strukturelle Komponenten gehen Wechselwirkungen mit AP-1-Faktoren ein (Chinenov and Kerppola, 2001). Die Zusammensetzung des transkriptionellen Regulators AP-1 ist unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen unterschiedlich (Kaminska et al., 2000). Sie variiert je nach Zelltyp und Stimulus und ist zudem zeitabhängig (Chinenov and Kerppola, 2001; Kovary and Bravo, 1991).

Die Kombinationsmöglichkeiten im AP-1-Dimer sind aufgrund der vielen möglichen Interaktionspartner hoch. Werden nur die JUN- und FOS-Proteine betrachtet, können 18 verschiedene Homo- und Heterodimere gebildet werden. Die Funktionalität dieser AP-1-Komplexe ist unterschiedlich. Als Folge sind die JUN-, FOS- und ATF-Proteine in den einzelnen AP-1-Komplexen funktionell nicht austauschbar. So zeigt z.B. JUND als einziges JUN-Protein keine essentielle Beteiligung bei der embryonalen Entwicklung (Jochum et al., 2001; Eferl et al., 1999). In einer *knock in*-Strategie (Tabelle 1, Kapitel 1.1.2.3) konnten Passegue et al. zeigen, dass JUNB einige bedeutende, jedoch nicht alle Funktionen von c-JUN kompensieren kann (Passegue et al., 2002).

Die Transkriptionsfaktoren der JUN- und FOS-Familie gehören zu den *immediate early genes* (Herdegen and Leah, 1998). Diese Genklasse wird transient und sehr schnell als Antwort auf die intrazelluläre Signalkaskade aktiviert (Soloaga et al., 2003). Dabei wird die Transkription dieser Gene unabhängig von der *de novo*-Proteinsynthese induziert. Sie können deshalb auch nicht durch Inhibition der Proteinsynthese gehemmt werden (Platenik et al., 2000).

Die AP-1-Komplexe spielen eine Rolle in Prozessen wie Zellproliferation, neuronaler Aktivierung, Tumorbildung und Apoptoseinduktion (Kasibhatla et al., 1998; Curran and Morgan, 1995; Angel and Karin, 1991). Neben diesen zum Teil protoonkogenen Effekten können AP-1-Komponenten auch als potentielle Tumorsuppressoren wirken (Passegue et al., 2001). Entsprechend den verschiedenen AP-1-abhängigen Prozessen, wird der Transkriptionsfaktor auch von einer großen Anzahl an unterschiedlichsten Stimuli aktiviert. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Mitogene, Zytokine, Stress, pharmakologische Komponenten sowie bakterielle und virale Infektionen (De Bosscher et al., 2003).

### 1.1.2.2 Regulation der AP-1-Proteine

Da die Konsequenzen einer Dysregulation der AP-1-Aktivität weitreichend sind und bedeutende Krankheiten wie z.B. Psoriasis oder Rheumatoide Arthritis induzieren können, ist es nicht überraschend, dass AP-1-Faktoren auf transkriptioneller, posttranskriptioneller und posttranslationaler Ebene stark kontrolliert werden (Cuevas et al., 2005; Karin et al., 1997). Zusätzlich interagieren AP-1-Proteine mit Koaktivatoren/ Korepressoren, die ebenfalls die genregulatorische Aktivität des Komplexes beeinflussen können (Eferl and Wagner, 2003). Zu diesen Proteinen können z.B. nukleäre Rezeptoren für Retinoide oder Glukokortikoide (Eferl and Wagner, 2003) sowie Histondeacetylasen gehören, welche durch eine Wechselwirkung mit AP-1 dessen Bindung an die DNA verhindern oder mittels Transrepression die Transaktivierungsaktivität des gebundenen Transkriptionsfaktors inhibieren (Weiss et al., 2003; Nagpal et al., 1995).

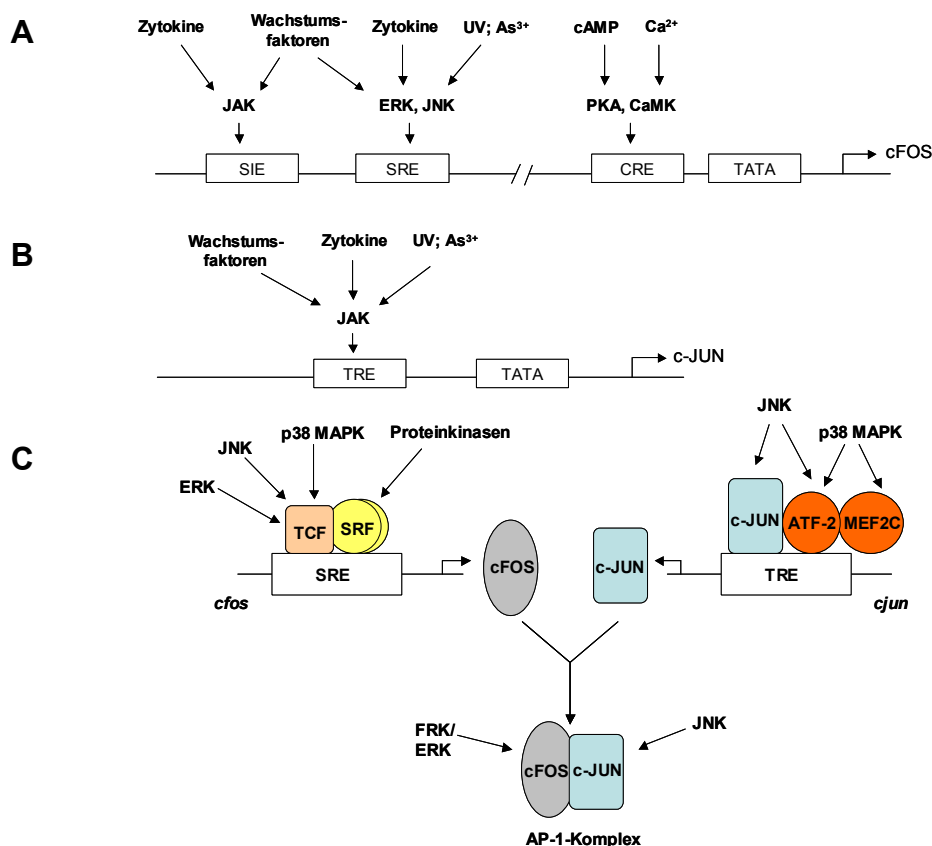
Im Unterschied zu anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B, welcher basal im Zytoplasma lokalisiert ist, sind basal exprimierte AP-1-Komplexe im Zellkern lokalisiert und oft konstitutiv an die DNA gebunden (Brivanlou and Darnell, Jr., 2002). In einer großen Anzahl an Genen, die bei der Entzündung eine Rolle spielen, finden sich putative oder funktionell verifizierte Bindungsstellen für AP-1-Faktoren (Eferl and Wagner, 2003; Kracht and Saklatvala, 2002; Chinenov and Kerppola, 2001). Um die Genexpression dieser und vieler anderer Zielgene zu regulieren, binden AP-1-Dimere an regulatorische DNA-Sequenzen, die als TRE (*TPA* (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) *response element*) bezeichnet werden (Shaulian and Karin, 2001; Angel et al., 1987). Es gibt jedoch auch AP-1-Dimere, die die oktamerere Konsensussequenz (*cyclic AMP response element* (*CRE*)) der oben genannten heptameren Sequenz (TRE) vorziehen (Bakiri et al., 2002).

Die AP-1-DNA-Bindungsstellen können von vielen unterschiedlich zusammengesetzten AP-1-Komplexen gebunden werden, wobei Differenzen in der DNA-Bindungsaffinität, -Spezifität und -Stabilität (Bakiri et al., 2002; Abate et al., 1991) eine Rolle spielen. In Promotoren und Enhancern weichen die Sequenzen der regulatorischen Elemente häufig



von der publizierten Konsensussequenz ab, so dass diese Variationen mit großer Wahrscheinlichkeit einen Beitrag zu den unterschiedlichen Funktionen der AP-1-Dimere leisten können (McBride and Nemer, 1998).

Zusätzlich werden je nach Stimulus die einzelnen Faktoren der JUN- und FOS-Familien unterschiedlich stark induziert und können dementsprechend in unterschiedlichem Ausmaß an der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1 mitwirken. Die drei klassischen MAPK-Signalwege sind für die Aktivierung der AP-1-Komplexe besonders wichtig. Sie beeinflussen jedoch nicht nur die Synthese der JUN- und FOS-Familienmitglieder, sondern auch ihr transkriptionelles Potential über posttranslationale Modifikationen (Karin et al., 1997; Karin, 1995). In dieser Hinsicht ist die Regulation von cFOS und c-JUN am besten untersucht und wird daher im Folgenden beispielhaft beschrieben.



**Abbildung 3: Regulation der Transkription von cFOS und c-JUN**

Regulation der wichtigsten cis Elemente der Promotoren von cFOS (A) und c-JUN (B) in Abhängigkeit verschiedener Stimuli. MAPK sind entscheidend an der Bildung bzw. Aktivierung von AP-1-Komplexen und anderen Transkriptionsfaktoren wie MEF2C beteiligt (C). So kontrollieren sie durch Transkription und posttranslationale Veränderungen die Aktivität des Transkriptionsfaktors. In diesem Fall ist der klassische AP-1-Komplex aus c-JUN und cFOS dargestellt. Abkürzungen: PKA *protein kinase A*, CaMK *calcium/ calmodulin-dependent kinase*, cAMP *cyclisches AMP*, JAK *janus kinases*. Die übrigen Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert nach (Karin, 1995) mit Informationen aus (Murphy et al., 2002; Coso et al., 1997; Han et al., 1997)

Verschiedene cis Elemente vermitteln, wie in Abbildung 3 dargestellt, eine cFOS-Induktion als Antwort auf viele extrazelluläre Stimuli (Treisman, 1992). Die cFOS-Induktion verläuft hauptsächlich über drei transkriptionelle Kontrollelemente: CRE (Sheng et al., 1991), SRE (*serum response element*) (Treisman, 1992) und SIE (*sis-inducible element*) (Darnell, Jr. et al., 1994). Dabei ist SRE das wichtigste MAPK-responsive Element. Es ist konstitutiv

besetzt. Das Kontrollelement SRE wird vom dimeren *serum response factor* (SRF) erkannt, dessen Bindung die Rekrutierung von einem *ternary complex factor* (TCF) zur Bildung eines ternären Komplexes nach sich zieht (Treisman, 1992). Zu den TCF-Proteinen gehören ELK-1, SAP1 und weitere Familienmitglieder mit ETS-Domänen (Whitmarsh and Davis, 1996 und die darin angegebenen Literaturhinweise). Nach einer Induktion durch einen extrazellulären Stimulus wird z.B. ELK-1 durch die MAPK ERK, JNK und p38 MAPK an mehreren Stellen im C-Terminus phosphoryliert. Dies führt zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität und daher zu einer SRE-abhängigen Genexpression (Whitmarsh and Davis, 1996 und die darin angegebenen Literaturhinweise). Durch die Induktion der cFOS-Transkription und dem erhöhten cFOS-Proteinspiegel ist es cFOS möglich, mit dem in der Zelle konstitutiv vorliegenden oder ebenfalls neusynthetisierten c-JUN ein Heterodimer zu bilden. Diese Komplexe sind stabiler als die c-JUN-Homodimere, so dass cFOS ein c-JUN-Molekül aus dem Komplex verdrängen kann (Smeal et al., 1989). Eine erhöhte Stabilität der AP-1-Komplexe resultiert in einer größeren DNA-Bindungsaktivität. Das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren wird auf die Seite der Dimerbildung geschoben, die essentiell für die DNA-Bindung ist (Karin, 1995). Die Stabilität der Komplexbindung ist jedoch nicht zwangsläufig ein Maß für das transaktivierende Potential dieses Dimers.

Die transkriptionelle Aktivität des c-JUN-Promotors wird hauptsächlich durch zwei TREs vermittelt (Angel et al., 1988). Dabei weicht diese Bindungssequenz in einer Base von der Konsensussequenz ab, was zur Folge hat, dass überwiegend Heterodimere aus c-JUN und ATF2 binden (van Dam et al., 1993). Das Protein ATF2 wird konstitutiv exprimiert (Karin, 1995) und die Aktivität posttranslational durch Phosphorylierung vermittelt (Gupta et al., 1995). Im Gegensatz dazu muss die c-JUN-Expression erst induziert werden, wobei die meisten Zelltypen auch eine basale c-JUN-Expression und -Aktivität aufweisen (Rozek and Pfeifer, 1993). Wie SRE im cFOS-Promotor ist das regulatorische Element TRE auch im c-JUN-Promotor konstitutiv besetzt (Rozek and Pfeifer, 1993). Wurde z.B. JNK durch einen Stimulus aktiviert, so kommt es während der (konstitutiven) Bindung am c-JUN-Promotor (Karin, 1995) zu einer Phosphorylierung von c-JUN an den Aminosäuren Ser-73 und Ser-63 und von ATF2 an Thr-63 und Thr-71 (Gupta et al., 1995; Devary et al., 1992). Im Gegensatz zum c-JUN-Protein, dass nur von JNK phosphoryliert wird, scheint ATF2 auch ein Substrat von p38 MAPK zu sein (Raingeaud et al., 1996; Raingeaud et al., 1995). Phosphoryliertes c-JUN interagiert mit CBP (*CREB binding protein*), einem Koaktivator, der vermutlich eine Brückenfunktion zwischen c-JUN und der basalen Transkriptionsmaschinerie übernimmt (Arias et al., 1994). In der Folge kommt es zur Transkription von c-JUN (Karin, 1995). Untersuchungen aus dem Labor von Gutkind konnten zeigen, dass die maximale c-JUN-Promotorexpression zusätzlich zum AP-1-Komplex nur in Anwesenheit von MEF2C (*myocyte enhancer factor 2C*) erreicht werden kann. Das Protein MEF2C vermittelt die Aktivierung unabhängig vom JNK-Signalweg über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (Coso et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor MEF2C selber wird durch eine p38 MAPK-katalysierte Phosphorylierung aktiviert (Han et al., 1997).

Am Beispiel von c-JUN lässt sich erkennen, dass die JNK-abhängige AP-1-Aktivierung zum Teil an der gesteigerten c-JUN-Synthese (und möglicherweise cFOS-Synthese) und zum Teil

an der Phosphorylierung von schon vorhandenem und neusynthetisiertem c-JUN liegt (Karin, 1995). Aber nicht nur c-JUN und ATF2 werden posttranslational verändert. Auch cFOS wird nach der Expression phosphoryliert, von FRK (*FOS-regulated kinase*) (Deng and Karin, 1994). Nach neueren Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe von Blenis handelt es sich bei FRK wahrscheinlich um eine MAPK, nämlich um ERK (Murphy et al., 2002).

Die zeitlichen und subzellulären Mechanismen der Dimerisierung von c-JUN- und cFOS-Heterodimeren sind ebenfalls komplex (Chinenov and Kerppola, 2001). Offenbar akkumuliert c-JUN im Kern, da in der basischen Region von c-JUN eine NLS (*nuclear localization signal*) zu finden ist (Chida and Vogt, 1992). Chida et al. zeigten, dass cFOS hauptsächlich durch die Interaktion mit c-JUN und unter Verwendung dessen NLS in den Kern transloziert (Chida et al., 1999). Es gibt jedoch auch Daten, die auf andere Translokationswege von cFOS hindeuten (Vriz et al., 1992; Tratner and Verma, 1991; Roux et al., 1990). Durch die kristallographische Struktur eines Heterodimers zwischen c-JUN und cFOS konnte gezeigt werden, dass ihre *leucine zipper*-Regionen in Form einer asymmetrischen *coiled-coil* Struktur interagieren (Glover and Harrison, 1995). Die Tatsache, dass diese Struktur auch in Abwesenheit von DNA auftritt, deutet stark darauf hin, dass die Dimerisierung im Zytoplasma vor Eintritt in den Kern stattfindet (Chida et al., 1999).

Die verschiedenen Kombinationen von JUN- und FOS-Proteinen als Dimere haben auch unterschiedliche Fähigkeiten, AP-1-abhängige Gene zu transaktivieren. JUNB- und JUND-Homodimere haben z.B. ein schwaches transaktivierendes Potential, während die Bildung von Heterodimeren von cFOS mit einem beliebigen JUN-Protein einen potenten Transaktivator ergibt.

Die Stabilität und Degradation von JUN- und wahrscheinlich auch von FOS-Proteinen wird durch das Ubiquitin/ Proteasom-System reguliert. Eine Ubiquitinierung und die folgende Degradation des AP-1-Komplexes stoppt die AP-1-abhängige Transkription, wie für die JUN-Proteine gezeigt werden konnte (Acquaviva et al., 2002; Acquaviva et al., 2001; Fuchs et al., 1997; Fuchs et al., 1996).

Im Fall von c-JUN reduziert die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen an seiner N-terminalen Aktivierungsdomäne durch MAPK die Ubiquitinierung und vermindert somit seinen Abbau (Musti et al., 1997). Die oben erwähnte Phosphorylierung von c-JUN durch JNK an den Serinen 63 und 73 hat ebenfalls einen stabilisierenden Effekt (Smeal et al., 1994).

Wie bereits dargestellt, ist die Transkription einiger AP-1-Faktoren nur in Anwesenheit einer AP-1-Aktivität möglich. Cuevas et al. ziehen daher den Schluss, dass Signalwege, die AP-1-Komplexe aktivieren, die Expression von spezifischen Genen durch die Kontrolle der AP-1-Dimer-Zusammensetzung regulieren (Cuevas et al., 2005). Allgemeiner formuliert bedeutet dies, dass Signalwege AP-1-Zielgene direkt durch Modulation des AP-1-Komplexes am Genpromotor des Zielgens oder indirekt durch Induktion der AP-1-Genexpression regulieren können (Cuevas et al., 2005). Die Tatsache, dass AP-1-Komponenten selbst durch AP-1-Komplexe kontrolliert werden, erhöht die Komplexität dieser Regulation. Daher konnte bisher nur wenigen Zielgenen ein bestimmter AP-1-Komplex mit funktioneller Bedeutung zuge-

ordnet werden. Dieses gilt auch für die genaue Funktion von einzelnen AP-1-Untereinheiten bei der Regulation der Entzündungsreaktion (Hoffmann et al., 2005; Holzberg et al., 2003; Kracht and Saklatvala, 2002).

### 1.1.2.3 Zusammenfassung des Phänotyps von Gendelektionsexperimenten zu AP-1-Untereinheiten

Eine effiziente Strategie, um die Funktion eines spezifischen Proteins zu untersuchen, ist die Analyse des Phänotyps unter der entsprechenden Gendelektion in Mäusen. Da für jedes Mitglied der JUN- und FOS-Familie eine murine Form existiert, wurden *knock out*-Experimente durchgeführt. Wie die *knock out*- und *knock in*-Studien für die JUN-/ FOS-Familie in Tabelle 1 zeigen, haben die Proteine sowohl überschneidende als auch eigenständige Funktionen. Dabei können übergreifende Aufgaben von anderen Komponenten übernommen werden, während die letztgenannten nicht durch die übrigen Familienmitglieder kompensierbar sind. Bemerkenswert ist, dass einige Gendelektionen (*c-jun*, *junB*, *fra-1*, *fra-2*) letal sind und dadurch die Wichtigkeit der AP-1-Faktoren unterstreichen.

	AP-1-Protein	Phänotyp	Defekte in Organen/ Zelltypen	Referenz
knock out	c-JUN	Embryonal letal E12,5	Leber, Herz, Hepatoblasten, Neuralleiste	(Eferl et al., 1999; Hilberg et al., 1993)
	JUNB	Embryonal letal E10	Extraembryonales Gewebe, Plazenta	(Schorpp-Kistner et al., 1999)
	JUND	Männliche Sterilität	Hoden, Spermatozoen	(Thepot et al., 2000)
	cFOS	Osteopetrose	Knochen, Osteoklasten	(Wang et al., 1992)
	FOSB	Mangelnde Fürsorge der Nachkommen durch die Mütter	Gehirn, Hypothalamus	(Brown et al., 1996)
	FRA-1	Embryonal letal E9,5	Extraembryonales Gewebe, Plazenta	(Schreiber et al., 2000)
	FRA-2*	Letal bei Geburt	Osteopenie	–
knock in	JUNAA→c-JUN	Rettung der embryonalen Letalität des c-JUN <i>knock out</i>	Keinen ersichtlichen Phänotyp	(Behrens et al., 1999)
	JUNB→c-JUN	Rettung der embryonalen Letalität des c-JUN <i>knock out</i> bis zur Geburt	Defekt der anterioren Augenstruktur, Herz	(Passegue et al., 2002)
	JUND→c-JUN*	Rettung der embryonalen Letalität des c-JUN <i>knock out</i> bis zur Geburt	Defekt der anterioren Augenstruktur, Herz	–
	FRA-1→cFOS	Rettung der Osteopetrose des cFOS <i>knock out</i>	Keine	(Fleischmann et al., 2000)

**Tabelle 1: Phänotypen und Auswirkungen von *knock out*- und *knock in*-Strategien der JUN- und FOS-Familienmitglieder während der pränatalen und postnatalen Entwicklung**

\*Unpublizierte Daten des Labors von Erwin F. Wagner. Veränderte Tabelle aus (Wagner and Eferl, 2005)

### 1.1.2.4 AP-1-Faktoren in der Entzündung

Verschiedenste Zytokine regulieren die Aktivität von Immunzellen und werden selber durch die Transkriptionsfaktor-Familien von AP-1, NF-κB, NFAT und STAT (*signal transducer and activator of transcription*) aktiviert (Wagner and Eferl, 2005). Das Ausmaß einer Entzündung

kann vom AP-1-Komplex über mehrere Mechanismen beeinflusst werden (Wagner and Eferl, 2005). Dazu gehört die Aktivierung der Zytokinproduktion in Kooperation mit Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie in verschiedenen Zelltypen (Wagner and Eferl, 2005). Eines der ersten Ereignisse in der Entzündung ist ein autoregulatorischer *loop* zur Zytokinproduktion: Nach der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- $\kappa$ B und NFAT durch proinflammatorische Zytokine kommt es, bedingt durch diese Proteine, zu einer Induktion weiterer Zytokine (Wagner and Eferl, 2005). Ein ternärer Komplex aus NFAT und AP-1 reguliert die meisten dieser Zytokine, indem er an die entsprechenden regulatorischen Elemente in ihren Genpromotoren bindet (Wagner and Eferl, 2005).

Auch bei der Regulation von T-Zelldifferenzierung zu Th1- oder Th2-Zellen (Wagner and Eferl, 2005) spielt AP-1 eine wichtige Rolle. Dieser Prozess ist ein Schlüsselprozess in der T-Zell-abhängigen Immunantwort (Paul and Seder, 1994). Während JUND die Differenzierung und die Expression der Th2-Zytokine supprimiert, regulieren c-JUN und JUNB die Expression der Th2-Zytokine positiv (Meixner et al., 2004; Gao et al., 2004). Auch cFOS scheint einen Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Effektorzellen und somit auf die T-Zell-vermittelten Erkrankungen (Wagner and Eferl, 2005) zu haben.

Drittes Beispiel ist die Interaktion und Transrepression zwischen AP-1 und dem Glukokortikoidrezeptor (GR) (Wagner and Eferl, 2005). Das Modell zur Transrepression beinhaltet, dass die AP-1-vermittelte Induktion der proinflammatorischen Zytokine durch GR gehemmt wird. Dabei verhindert GR die Interaktion zwischen DNA-gebundenen AP-1-Komplexen und transkriptionellen Koaktivatoren (Saatcioglu et al., 1994).

Die aufgeführten Mechanismen zeigen, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 im Entzündungsprozess involviert ist. Um seine Rolle vollständig zu verstehen, bedarf es noch vieler Studien und Experimente. Mit einem besseren Verständnis der AP-1-abhängigen entzündlichen Genregulation könnte auf Ebene der AP-1-Faktoren therapeutisch spezifisch eingegriffen und individuelle Faktoren manipuliert werden, mit dem Ziel, die zugehörigen Störungen oder Erkrankungen zu mindern.

#### **1.1.2.5 Crosstalk zwischen NF- $\kappa$ B und AP-1-Faktoren**

Die meisten Entzündungsgene besitzen sowohl Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B als auch für Proteine der AP-1-Familie, so dass die Kontrolle der Genexpression vermutlich nicht alleine durch die DNA-Sequenz erreicht wird. Ein übergeordnetes Koordinationsmuster liegt möglicherweise in einer Wechselwirkung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1.

Ein charakteristisches Kennzeichen bei der IL-1-abhängigen Genexpression ist die parallele Kontrolle von Transkriptionsfaktoren aus der NF- $\kappa$ B- und AP-1-Familie. Durch die simultane Aktivierung können sich die NF- $\kappa$ B- und die AP-1-Kaskaden untereinander beeinflussen (*crosstalk*), so dass die IL-1-induzierte Signaltransduktion nicht linear verläuft. Für ein solches Zusammenwirken von NF- $\kappa$ B und AP-1 gibt es diverse Beispiele. So konnte in Fibroblasten von IRAK *knock out*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verminderte IL-1-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, p38 MAPK und JNK gemessen werden (Kanakaraj et al., 1998). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die zwei Transkriptionsfaktoren

am Promotor von z.B. TNF (Udalova and Kwiatkowski, 2001) oder GM-CSF (Thomas et al., 1997) interagieren können. Dabei kommt es am TNF-Promotor zu einer Konkurrenz um Bindungsstellen und im Fall von GM-CSF zu einer synergistisch transaktivierenden Wechselwirkung. Hoffmann et al. zeigten, dass cFOS synergistisch mit NF- $\kappa$ B die IL-8-Transkription aktiviert, während FRA-1, das zeitlich verzögert an den IL-8-Promotor rekrutiert wird, die Transkription hemmt (Hoffmann et al., 2005).

### **1.1.3 Die Rolle von Zytokinen und Chemokinen bei der Entzündungsreaktion am Beispiel von IL-8 und IL-6**

#### **1.1.3.1 Einleitung**

Damit das Immunsystem funktionstüchtig ist, müssen verschiedene Systeme des mehrzelligen Organismus koordiniert Informationen austauschen. Ein für die Entzündungsreaktion wichtiger extrazellulärer Signalmechanismus zur Kommunikation wird durch die Gruppe der Zytokine ausgeführt. Sie vermitteln durch das Bereitstellen neuer Funktionen wesentliche Veränderungen für die Reaktionsfähigkeit der Zelle.

Zentrale Zytokine bei der Regulation von Entzündungen sind IL-1 und TNF (Kracht and Saklatvala, 2002). Sie regulieren in den Zielzellen die Expression einer Vielzahl von Genen, die für eine Entzündungsantwort wichtig sind. Zu den entzündungsrelevanten Zielgenen gehören z.B. weitere Zytokine, Chemokine, Metalloproteinasen, Akute Phase-Proteine und Adhäsionsmoleküle (Kracht and Saklatvala, 2002). Diese rufen in der Folge die biologische Antwort der Entzündung hervor, die sich z.B. durch vermehrte Infiltration von Leukozyten in das infizierte Gewebe, verstärkten lokalen Blutfluss, Bekämpfung der Infektion, Stimulation der adaptiven Immunantwort und Gewebeerneuerung äußert. Zu Beginn der lokalen Abwehrreaktion werden vorwiegend Granulozyten aus dem Blut an den Ort der Entzündung rekrutiert. Dieser elementare Prozess wird durch Chemokine gesteuert, wobei Interleukin (IL)-8 einer der pathophysiologisch bedeutsamsten Vertreter der fast 50 bekannten humanen Chemokine ist (Baggiolini, 2001). Die chemotaktischen Zytokine (Chemokine) bilden eine der drei strukturell unterschiedlichen Zytokin-Hauptfamilien. Daneben existiert noch die Hämatoprotetin-Familie mit dem wichtigen Zytokin IL-6 und die TNF-Familie.

#### **1.1.3.2 Das Chemokin IL-8**

IL-8 wird in einer Vielzahl von Zelltypen als Antwort auf einen Entzündungsreiz als ein ungefähr 70-130 Aminosäuren langes Vorläufermolekül generiert und nach der Abspaltung einer Signalsequenz sezerniert (Baggiolini, 2001). IL-1, TNF, bakterielle und virale Produkte und zellulärer Stress sind typische Stimuli für IL-8 (Mastrorade et al., 1998; Aihara et al., 1997; Lee et al., 1997; Kasahara et al., 1991). Es wirkt chemotaktisch präferentiell auf Neutrophile (Baggiolini et al., 1995) in parakriner und autokriner Weise (Baggiolini, 2001). Seine Tertiärstruktur wird von zwei Disulfidbrücken stabilisiert, die sich zwischen den vier kondensierten Cystinresten ausbilden und essentiell für Rezeptorerkennung und biologische Aktivität sind (Baggiolini, 2001; Baggiolini and Clark-Lewis, 1992). Neben der dreidimensionalen Struktur von IL-8 sind zwei Rezeptoren und zusätzliche biologische Funktionen bei der Angiogenese, Tumprogression, Mitose und Geweberegeneration

bekannt (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992). Wie die anderen Chemokinrezeptoren gehören auch die IL-8-Rezeptoren zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen (Baggiolini, 2001).

Wie in Hoffmann et al. dargelegt wird, ist IL-8 im unstimulierten Zustand der Zelle oft nur schwach detektierbar, wird aber z.B. durch IL-1 schnell und stark induziert (Hoffmann et al., 2002). Diese Variabilität im IL-8-Expressionslevel erfordert das Zusammenwirken von wenigstens drei Signalmechanismen (Hoffmann et al., 2002), wobei die MKKK TAK1 dabei eine essentielle Funktion übernimmt (Holtmann et al., 1999; Winzen et al., 1999).

Transkriptionell wird IL-8 nach einer IL-1-Stimulation durch den NF- $\kappa$ B- und JNK-Signalweg reguliert (Hoffmann et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B und JNK im Gegensatz zu den Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie essentiell für die IL-8-Genexpression sind (Krause et al., 1998). Um jedoch die maximale Genexpression zu erreichen, müssen AP-1-Komplexe aktiviert werden (Hoffmann et al., 2002). Die Annahme lag nahe, dass der Transkriptionsfaktor c-JUN als Substrat von JNK eine Rolle in diesem Kontext spielt. Eindeutige Ergebnisse konnten jedoch mit einer dominant-negativen c-JUN-Mutante nicht erzielt werden. Eine Studie bestätigte die Vermutung (Natarajan et al., 2001), eine andere nicht (Georganas et al., 2000). In Holzberg et al. wurde gezeigt, dass ein zellpermeables Peptid, welches die Bindung von JNK an c-JUN inhibiert, keinen Einfluss auf die IL-1-induzierbare Expression von IL-8 hat (Holzberg et al., 2003). Es konnte bis heute nicht geklärt werden, welche Transkriptionsfaktoren an die AP-1-Bindungsstelle des endogenen IL-8-Promotors binden. Der für die Genregulation wichtigste Bereich des Genpromotors liegt zwischen -1 und -133 5' vom Transkriptionsstart (Harant et al., 1996; Mukaida et al., 1994). Neben den cis Elementen für NF- $\kappa$ B und AP-1 konnten auch Bindungsstellen für die Proteine C/EBP, OCT-1 (Octamer-1) und NRF (*NF- $\kappa$ B repressing factor*) in diesem Bereich identifiziert werden (Nourbakhsh et al., 2001; Mukaida et al., 1994; Matsusaka et al., 1993).

In Hoffmann et al. wird folgendes Modell zur Regulation der IL-8-Transkription entworfen (Hoffmann et al., 2002): Die basale Repression des IL-8-Promotors wird zum einen durch eine Bindung des NRF an das negativ regulatorische Element (NRE) erreicht. Dabei überlappt NRE mit der NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle (Nourbakhsh et al., 2001). Zum anderen ist eine Octamer-Bindungsstelle, die auf dem Komplementärstrang zu einer C/EBP-Bindungsstelle lokalisiert ist, von OCT-1 besetzt (Wu et al., 1997). Außerdem wird in diesem Modell berücksichtigt, dass die Histondeacetylase 1 (HDAC-1) die IL-8-Promotoraktivität negativ durch Deacetylierung von Histonproteinen beeinflusst (Ashburner et al., 2001).

Kommt es zu einer Stimulation durch IL-1 und TNF, so wird die Repression des IL-8-Promotors aufgehoben. TAK1 oder MEKK1 (*MAPK/ERK kinase kinase 1*) aktivieren den JNK- und NF- $\kappa$ B-Signalweg. So bindet das phosphorylierte und in den Kern translozierte NF- $\kappa$ B nah bei NRF, wodurch das dualfunktionelle Protein NRF nun als Koaktivator auf die IL-8-Expression wirkt (Nourbakhsh et al., 2001; Chen et al., 1998; Stein and Baldwin, Jr., 1993). Die konstitutiv gebundenen AP-1-Komplexe werden ebenfalls phosphoryliert. In

einem kompetitiven Mechanismus wird OCT-1 durch C/EBP  $\beta$  ersetzt (Wu et al., 1997; Stein and Baldwin, Jr., 1993).

Auffallend ist, dass die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren nahe beieinander liegen, was die Bildung eines transkriptionellen Multiproteinkomplexes, eines sogenannten Enhanceosoms vermuten lässt. Posttranslationale Modifikationen, Chromatinremodeling durch Histonacetylierung oder -Phosphorylierung (Cheung et al., 2000) sowie große Koaktivatorproteine wie CBP/ p300 (Janknecht and Hunter, 1996) sind Möglichkeiten, Proteine in Kontakt zu bringen.

Tatsächlich wurde beschrieben, dass CBP/ p300 acetylierungsabhängig die p65-vermittelte IL-8-Transkription unterstützt (Vanden Berghe et al., 1999), während HDAC-1 auch im stimulierten Zustand die IL-8-Promotoraktivität negativ reguliert (Ashburner et al., 2001). Das RNA-Polymerase II-Holoenzym wird mit maximalem Kontakt zum Multiproteinkomplex an die TATA-Box des IL-8-Promotors rekrutiert und synthetisiert im phosphorylierten Zustand die IL-8 mRNA (Nissen and Yamamoto, 2000).

Posttranskriptionell steht IL-8 unter der Kontrolle von p38 MAPK. Ist dieser Signalweg nicht aktiviert, kommt es zu einer schnellen Degradation der IL-8 mRNA, die zusammen mit der transkriptionellen Repression zu den extrem niedrigen basalen mRNA-Spiegeln führt. Die Degradation von IL-8 wird durch die AU-reichen cis Elemente in der 3'-UTR (*untranslated region*) vermittelt. Im induzierten Zustand der Zelle bewirkt der p38 MAPK-Signalweg MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*)-abhängig die Stabilisierung des neusynthetisierten IL-8-Transkripts (Winzen et al., 1999).

In Hoffmann et al. wurde die signalabhängige molekulare Regulation des IL-8-Promotors untersucht, die dafür verantwortlich ist, dass dieses Gen quantitativ so unterschiedlich exprimiert wird. Hierfür wurde das physiologisch relevante System der Stimulation des *il8*-Gens durch IL-1 bzw. EGF (*epidermal growth factor*) untersucht. Unter Einsatz vergleichender Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente konnten cFOS und FRA-1 als Transkriptionsfaktoren aus der AP-1-Familie identifiziert werden, welche IL-1-abhängig an den endogenen IL-8-Promotor binden. Wie schon in Kapitel 1.1.2.5 erwähnt, wird die Transkription von IL-8 synergistisch durch cFOS und NF- $\kappa$ B induziert und durch FRA-1 hemmend beeinflusst (Hoffmann et al., 2005).

Bemerkenswert ist, dass bislang kein IL-8-Maushomolog identifiziert wurde (Zlotnik and Yoshie, 2000), so dass Untersuchungen in *knock out*-Mäusen oder deren Zellen nicht möglich sind.



### 1.1.3.3 Das Zytokin IL-6

Im Gegensatz zu IL-8 existiert in der Maus ein Homolog für das humane IL-6. Die Genregulation von IL-6 und IL-8 weist, wie im Folgenden näher ausgeführt, viele gemeinsame Aspekte auf (Schmitz et al., 2001; Vanden Berghe et al., 1999; Krause et al., 1998).

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, dass bei Entzündungsprozessen vermehrt freigesetzt wird. Analog zu IL-8, wird auch die IL-6-Genexpression durch eine Vielzahl an Stimuli induziert. Dazu gehören inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF sowie bakterielle und virale Produkte (Ray et al., 1989 und die darin angegebenen Literaturhinweise). Neben seiner Funktion bei Entzündungen und im Immunprozess spielt IL-6 unter anderem eine entscheidende Rolle im Knochenmetabolismus, bei der Hämatopoese, in der neuronalen Entwicklung und bei einigen Erkrankungen wie z.B. bei Alzheimer und Osteoporose (Keller et al., 1996). Dabei ist seine Wirkung sowohl proinflammatorisch, wie z.B. bei der Vermittlung der Akute Phase-Antwort und der „systemischen“ Entzündung, als auch antiinflammatorisch, indem es die Bildung von IL-1 und TNF negativ reguliert. IL-6 aktiviert Gene, deren Produkte das Ziel haben, einen Gewebeschaden möglichst klein zu halten (Ray et al., 1989). Dabei wird die Wirkung von IL-6 mittels spezifischer Rezeptoren über das transmembranöse Signalprotein gp130 an die Zellen vermittelt (Kishimoto et al., 1992). Die Signaltransduktion beinhaltet die Aktivierung von JAK (*janus kinases*)-Tyrosinkinase-Familienmitgliedern und der MAPK Kaskade (Heinrich et al., 2003).

Humanes IL-6 wird, wie IL-8, als Vorläufermolekül gebildet, von dem ein Signalpeptid abgespalten wird. Das reife Protein ist 184 Aminosäuren lang und liegt glykosiliert vor (Haegeman et al., 1986). Die konservierten Regionen in der murinen und humanen Form des IL-6-Protein zeigen eine große Homologie (Van Snick et al., 1988), so dass humanes IL-6 murine IL-6-responsive Zellen induzieren kann (Keller et al., 1996).

Weiterhin wird IL-6 in unstimulierten Zellen, analog zu IL-8, kaum exprimiert (Vanden Berghe et al., 2000). Erst nach einer Induktion z.B. durch IL-1 wird die Genexpression von IL-6 stark induziert (Krause et al., 1998; Ray et al., 1989). Diese wird, wie auch die von IL-8, transkriptionell und posttranskriptionell reguliert. Der ungefähr 300bp große IL-6-Promotor enthält eine sehr komplexe Kontrollregion (Keller et al., 1996). Verschiedene cis Elemente vermitteln die Aktivierung und Repression des IL-6-Promotors, unter anderem AP-1, CRE, NF-IL6 (*nuclear factor interleukin 6*), NF- $\kappa$ B, SRE und MRE (*multiple response element*) (Vanden Berghe et al., 2000; Keller et al., 1996). Die meisten cis regulatorischen Elemente sind in der Region von -225 bis -111 lokalisiert (Ray et al., 1988).

Bei der transkriptionellen Regulation von IL-6 spielt NF- $\kappa$ B eine große Rolle, wie Experimente in IKK $\beta$ - und IKK $\gamma$ -defizienten Mäusen gezeigt haben (Schmidt-Supprian et al., 2000; Chu et al., 1999). Die TNF-aktivierten p38 MAPK- und ERK-Signalwege tragen zur transkriptionellen Aktivierung des IL-6-Promotors durch eine Modulation der Transaktivierungsleistung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 bei (Vanden Berghe et al., 1998; Beyaert et al., 1996). Auch der JNK-Signalweg scheint für die IL-1-induzierte IL-6-Transkription essentiell zu sein (Krause et al., 1998). Ein erster Schritt der TNF-abhängigen IL-6-Genregulation ist die zytoplasmatische Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Vanden Berghe et al., 2000).

Nach dem Modell von Vanden Berghe et al. wird der Kofaktor CBP/ p300 zum multi-responsiven IL-6-Promotor rekrutiert und durch die zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen mit den am Promotor gebundenen Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB, C/EBP und NF- $\kappa$ B belegt (Vanden Berghe et al., 2000). Der genaue Mechanismus ist nicht geklärt, jedoch sind analog zu IL-8 mit großer Wahrscheinlichkeit verschiedene Chromatinmodifikationen erforderlich, um die Bildung des Enhanceosoms zu ermöglichen (Vanden Berghe et al., 2000).

Wie bei IL-8 auch, scheint der p38 MAPK-Signalweg eine Rolle bei der mRNA-Stabilisierung von IL-1-induzierter IL-6-Expression zu spielen (Chen et al., 2005; Patil et al., 2004). Darüber hinaus scheint der ERK-Signalweg zelltypabhängig einen Beitrag zur IL-1-abhängigen mRNA-Stabilität von IL-6 zu leisten (Chen et al., 2005).

## 1.2 RNA Interferenz

### 1.2.1 Allgemeines und Historie zur RNA Interferenz

Zur Untersuchung von Proteinfunktionen können *knock out*-Methoden oder auch Strategien wie RNA Interferenz oder *antisense* Methoden eingesetzt werden. Die Genfunktionsanalyse *RNA silencing*/ RNA Interferenz (RNAi) hat die Forschungswelt in den letzten Jahren geradezu revolutioniert und wurde 2002 von *Science* als „*breakthrough of the year*“ bezeichnet (Couzin, 2002). *RNA silencing* umfasst Genregulationsmechanismen, die mit Hilfe einer Suppression der Transkription (*transcriptional gene silencing*, TGS) oder durch einen sequenzspezifischen RNA-Degradationsprozess (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS/ RNAi) die Synthese eines spezifischen Proteins verhindern (Agrawal et al., 2003). Diese Mechanismen beeinflussen nicht nur Transkription und Proteinsynthese, sondern auch mRNA *turnover*, Proteinstabilität sowie die Kontrolle von endogenen Genen und solchen, die durch Transposons oder Pathogene eingebracht wurden (Sontheimer, 2005).

PTGS oder auch *cosuppression* wurde als erstes bei Pflanzen beschrieben (Übersicht in Boshier and Labouesse, 2000). Die Grundlage für RNAi zu Forschungszwecken legten Fire und Mello mit ihren Arbeiten am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Sie entdeckten, dass applizierte dsRNA Genantworten supprimiert. Kurze Zeit später konnte in einem *Drosophila melanogaster in vitro*-System gezeigt werden, dass die eingebrachte dsRNA durch die RNase III Dicer (Bernstein et al., 2001) ATP-abhängig in si(*short interfering*)RNAs mit 21-22 Nukleotiden Länge geschnitten werden (Zamore et al., 2000), die als Vermittler der RNAi wirken (Elbashir et al., 2001b; Hammond et al., 2000). Auch der Multienzymbkomplex, der die Degradation der mRNA durch siRNAs bewirkt, wurde identifiziert (Hammond et al., 2000).

Die Antwort von Säugerzellen auf dsRNA unterschied sich deutlich von der in Pflanzen und Invertebraten. Säugerzellen antworten auf zytoplasmatische, über 30bp lange dsRNA-Moleküle mit einem unspezifischen Interferon-Abwehrsystem (Stark et al., 1998). Diese antivirale Immunreaktion induziert  $\alpha$ - und  $\beta$ -Interferone (Typ I-Interferone), welche nach Sekretion auf Zellen wirken. Typ I-Interferone induzieren über das Enzym 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS1) die RNase L, die sequenzunspezifisch mRNA degradiert. Dadurch wird die Proteinsynthese gehemmt. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung eines

zweiten Enzyms, der dsRNA-abhängigen Proteinkinase PKR. Diese bewirkt eine Phosphorylierung zellulärer Proteine, vor allem des Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$ , der dadurch die Inhibition der Proteinsynthese bewirkt. Zusätzlich induziert die PKR die Transkription von Interferongenen, die wiederum die Synthese von PKR und OAS1 aktivieren (Stark et al., 1998). Das Abschalten der Proteintranslation (Williams, 1997; Baglioni and Nilsen, 1983) hat letztendlich Apoptose zur Folge (Lee and Esteban, 1994).

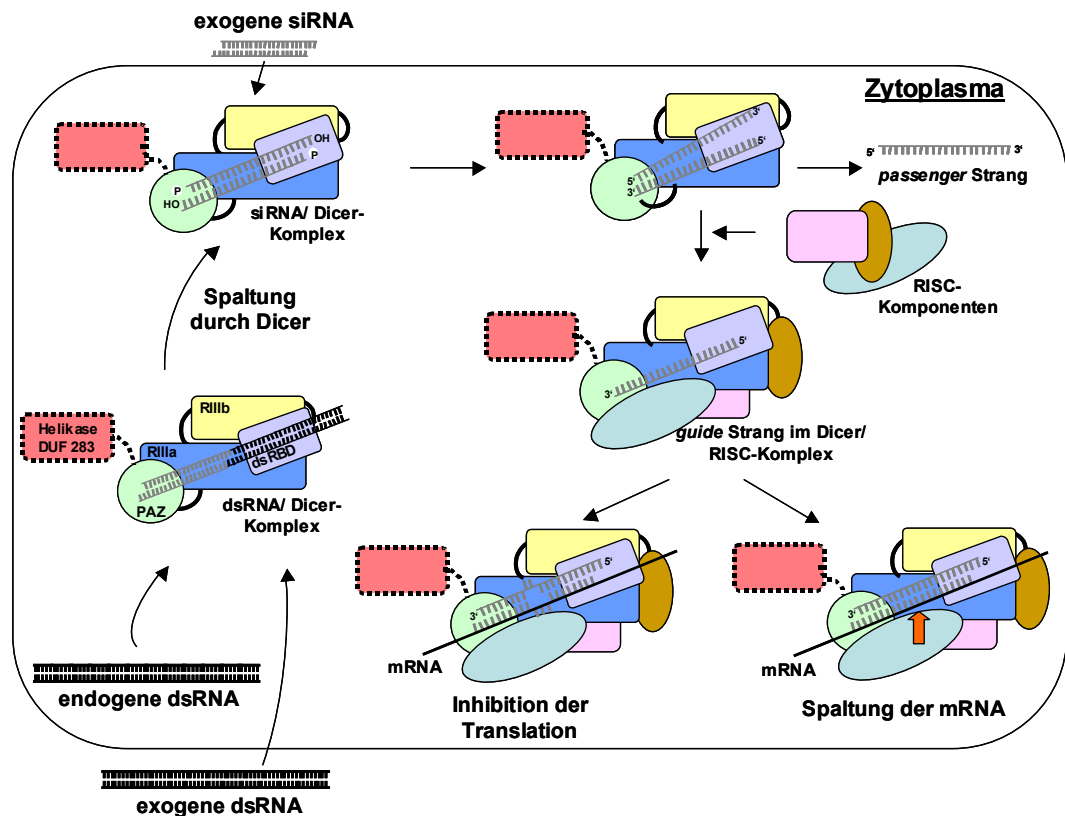
Aufgrund der unspezifischen Interferonantwort war es in Säugerzellen nicht möglich, durch Einschleusen von dsRNA eine spezifische Gensuppression zu erreichen. Ausnahmen bildeten Säugerzellen, in denen Typ I-Interferone nur schwer durch virale Infektion oder dsRNA induziert werden können (Harada et al., 1990; Barlow et al., 1984) bzw. der angeborene Abwehrmechanismus noch nicht funktionell war, wie z.B. bei Mausoozyten und Mausembryozellen (Billy et al., 2001; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000).

Der Durchbruch für RNAi in Säugerzellen gelang der Arbeitsgruppe von Tuschl im Jahr 2001. Unter Verwendung von chemisch erzeugten dsRNAs von 21 Nukleotiden Länge war es möglich, auch in adulten Säugerzellen Gene spezifisch ohne Auslösung der unspezifischen Interferonantwort partiell zu supprimieren (Elbashir et al., 2001a). Auch wenn die Untersuchungen von Elbashir et al. keine Aktivierung des Interferonsystems zeigten (Elbashir et al., 2001a), ist derzeit immer noch offen, ob siRNAs nicht doch eine unspezifische Interferonantwort induzieren (Kapitel 1.2.3).

### **1.2.2 Modell zum Mechanismus der RNA Interferenz**

Der Mechanismus der RNA Interferenz ist gegenwärtig nicht vollständig aufgeklärt, jedoch sind durch biochemische Untersuchungen viele beteiligte Faktoren und deren Funktionen identifiziert worden. Dabei war es hilfreich, dass dieser Prozess evolutionär über viele Speziesgrenzen hinweg hoch konserviert ist (Sharp, 2001).

Die kurzen RNAs von 19 bis 28 Nukleotiden Länge lassen sich in zwei Klassen einteilen: siRNAs und mi(micro)RNAs. Die endogenen Vertreter unterscheiden sich primär in der Natur ihrer Vorläufer. Im Weiteren wird nur auf den siRNA-abhängigen RNAi-Mechanismus mit Initiations- und Effektorschritt (Sontheimer, 2005) eingegangen (Abbildung 4). Die Mechanismen von siRNA- und miRNA-Wirkung sind dabei in vielen Aspekten vergleichbar.



**Abbildung 4: Mechanismus der RNA Interferenz**

Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht des RNAi-Mechanismus bei dem aus dsRNAs erzeugte siRNAs oder exogene siRNAs Genexpression von Zielgenen regulieren. Der *passenger* Strang der siRNAs verlässt den Komplex, so dass der *guide* Strang in einem Dicer/ RISC (*RNA-induced silencing complex*)-Enzymkomplex inkorporiert in der Zelle vorliegt. Die Komponenten von RISC werden durch drei Faktoren symbolisiert, restliche Proteine und Namen wurden zum Zweck der Übersichtlichkeit weggelassen. Nach Aktivierung des RISC, Lokalisation und Erkennung der Ziel-mRNA kommt es entweder zur Spaltung der mRNA oder zur Translationshemmung. Die Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen.

### 1.2.2.1 Initiationsschritt der RNA Interferenz

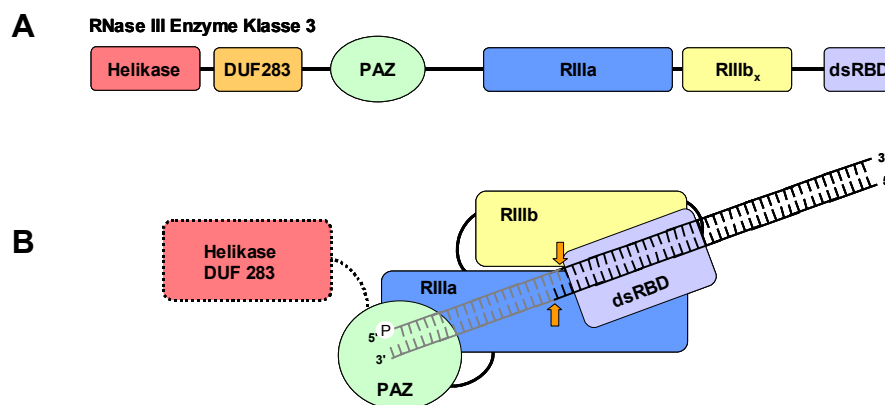
Endogene oder exogene dsRNAs mit korrekter Basenpaarung werden im Zytoplasma der Zelle zu siRNAs prozessiert, indem die dsRNA durch die Endoribonuklease Dicer in kurze RNA-Duplexe geschnitten wird. Synthetische siRNAs durchlaufen den dsRNA-Prozessierungsschritt durch Dicer nicht. Um RNAi auch in Säugerzellen stattfinden zu lassen, werden künstlich hergestellte siRNAs den Zellen appliziert. Diese und die endogenen Produkte der enzymatischen Spaltung durch Dicer sind 21-25 Nukleotide lange siRNA-Moleküle, die symmetrische zwei bis drei Nukleotidüberhänge am 3'-Ende besitzen. Die beiden terminalen 5'-Nukleotide sind doppelsträngig. Das Nukleotid am 3'-Ende trägt eine Hydroxylgruppe, während das am 5'-Ende über eine Phosphatgruppe verfügt (Elbashir et al., 2001b; Zamore et al., 2000). Diese charakteristischen Enden sind für den Mechanismus des *gene silencing* essentiell. Endogene siRNAs konnten in mehreren Organismen identifiziert werden, unter anderem in Pflanzen (Hamilton and Baulcombe, 1999), Pilzen (Catalanotto et al., 2002), Invertebraten (Elbashir et al., 2001b) und Vertebraten (Billy et al., 2001).

Die Nukleotidüberhänge und die Hydroxylgruppe am 3'-Ende der endogenen siRNA-Moleküle führten zu der Hypothese, dass eine RNase III an der Prozessierung der siRNAs beteiligt ist (Elbashir et al., 2001b; Bass, 2000). Diese Vermutung konnte bestätigt werden

(Bernstein et al., 2001). Biochemische Beweise belegten, dass siRNAs mit zwei Nukleotid-überhängen am 3'-Ende optimal für eine Induktion des RNAi-Mechanismus sind. Ohne die Phosphatgruppe am 5'-Ende kann die siRNA nicht in den RISC-Komplex inkorporiert werden. Aus diesem Grund werden synthetische siRNAs, wie ein Experiment in *Drosophila* Embryoextrakten zeigt, am 5'-Ende von einer Kinase phosphoryliert (Nykanen et al., 2001).

### RNase III Dicer

Dicer gehört zu den RNase III-Enzymen, die im RNA-Metabolismus von Phagen bis zu Säugern (Carmell and Hannon, 2004) involviert sind. Die Hydrolyse von dsRNA wird meist durch Enzyme der Ribonuklease III-Superfamilie katalysiert (Conrad and Rauhut, 2002; Nicholson and Nicholson, 2002). Es lassen sich anhand der Domänen drei Klassen der RNase III-Familie unterscheiden, wobei Dicer der Klasse 3 zugeordnet wird (Carmell and Hannon, 2004).



**Abbildung 5: Struktur des RNase III-Enzyms Dicer**

Schematische Domänenstruktur (A) bzw. Domänenanordnung (B) des humanen RNase III-Enzyms Dicer. (B) zeigt die Interaktion von Dicer mit einem dsRNA-Substrat. Modifiziert nach (Carmell and Hannon, 2004; Zhang et al., 2004)

Wie Abbildung 5 A verdeutlicht, zeichnen sich diese Enzyme durch eine C-terminale *dsRNA-binding domain* (dsRBD), zwei RNase III-Domänen, eine PAZ (Piwi/ Argonaute/ Zwillie)-Domäne, eine DUF283-Domäne mit unbekannter Funktion und eine N-terminale DEXH/ DEAH RNA-Helikase/ ATPase-Domäne aus (Carmell and Hannon, 2004). Die hoch konservierte PAZ-Domäne, die nach den Argonaute (AGO)-Proteinen Piwi, Argonaute und Zwillie benannt wurde (Carmell et al., 2002; Cerutti et al., 2000), ist nur in Dicer und Proteinen der Argonauten-Familie (AGO) zu finden. Dort spielt sie eine wichtige Rolle in der Erkennung der dsRNA, obwohl die Bindungsaffinität gegenüber Nukleinsäuren gering ist. Laut der Untersuchungen von Zhang et al. hat Dicer ein Prozessierungszentrum, welches durch die RIIIa- und RIIIb-Domänen eines Moleküls gebildet wird (Abbildung 5 B). Dieses Zentrum prozessiert die dsRNA ungefähr 20 Nukleotide vom Substratende entfernt. Dabei erkennt die PAZ-Domäne den 3'-Überhang des RNA-Moleküls und die RIIIa-Domäne misst, möglicherweise unter Mitwirkung der PAZ-Domäne, den Abstand zwischen dem PAZ-gebundenen Ende der dsRNA und der einzubringenden Schnittstelle. Die räumliche Anordnung der beiden RIII-Domänen verdeutlicht die Asymmetrie der katalytischen Region (Zhang et al., 2004). Es resultieren, wie oben schon erwähnt, Produkte mit 5'-Mono-

phosphatgruppen und zwei Nukleotidüberhängen am 3'-Ende (Elbashir et al., 2001b; Zamore et al., 2000).

### 1.2.2.2 Effektorschritt der RNA Interferenz

Nach der Prozessierung der siRNAs durch Dicer kommt es zur Inkorporation der kurzen RNA-Duplexe in einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP, bei siRNAs auch *RNA-induced silencing complex* (RISC) genannt). Aktive RISC-Komplexe enthalten einzelsträngige siRNA-Moleküle, so dass vor der Übertragung zusätzlich noch eine Denaturierung der siRNA-Duplex stattfindet.

Ein Strang der siRNA-Duplex wird als sogenannte *guide* RNA auf den RISC-Komplex übertragen und vermittelt die mRNA-Spaltung (Schwarz et al., 2003). Dabei ist die Auswahl des *guide* Strangs nicht willkürlich. Die relative Stabilität der Basenpaarung im artifiziellen siRNA-Molekül spielt eine zentrale Rolle bei der Entscheidung, welcher Strang ausgewählt wird (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Der Strang mit dem 5'-Ende an der Seite mit der instabileren Basenpaarung wird als *guide* Strang ausgewählt. Nach dem Modell von Schwarz et al. (2003) gibt es eine Korrelation zwischen der terminalen Stabilität der siRNAs und der Effizienz der Ziel-mRNA-Erkennung, so dass vorzugsweise der Strang mit der niedrigeren Stabilität im RISC-Komplex inkorporiert bleibt (Schwarz et al., 2003). Die komplementäre Sequenz nennt sich *passenger* Strang und wird nicht auf den Effektor-Komplex übertragen.

Der Wechsel vom doppelsträngigen RNA-Molekül zum Einzelstrang gehört zu den noch wenig untersuchten Prozessen des RNAi-Mechanismus. Aktuelle Modelle gehen davon aus, dass Dicer mit der entstandenen siRNA asymmetrisch komplexiert bleibt. Zudem macht die Stabilität der siRNAs einen aktiven, energieabhängigen Prozess der Denaturierung des RNA-Duplexes wahrscheinlich. Eine Helikase der DEXD/ H-Familie könnte eine solche Reaktion katalysieren (Sontheimer, 2005). Jedoch sind auch andere Mechanismen möglich, die zu der Aktivierung des RISC führen.

Für *Drosophila* sind verschiedene Komplexzusammensetzungen als Zwischenzustände auf dem Weg zur Entstehung des aktiven kompletten RISC-Komplexes beschrieben worden (Sontheimer, 2005 und die darin angegebenen Literaturhinweise). Eine Tabelle mit RISC-Komponenten in unterschiedlichen Organismen ist im folgenden Kapitel zu finden.

Im Verlaufe der Bildung des vollständigen RISC-Komplexes werden die einzelsträngigen siRNAs, assoziiert mit Dicer, auf RISC übertragen (Pham et al., 2004). Es gibt Untersuchungen in unterschiedlichen Organismen, wonach die prominentesten RISC-Faktoren, die Argonaute-Proteine, direkt oder indirekt mit Dicer interagieren (Tahbaz et al., 2004; Tabara et al., 2002; Hammond et al., 2001) und so eine Verknüpfung zwischen dem Initiations- und dem Effektorschritt herstellen.

Es wurde gezeigt, dass das 5'-Ende des *guide* Strangs an AGO2 bindet (Tomari and Zamore, 2005). Eine Denaturierung der siRNA findet folglich nur statt, wenn RISC den *guide* Strang übernehmen kann. Für den Transfer des *guide* Strangs von Dicer in den RISC-Komplex ist in *Drosophila* R2D2 als weitere essentielle Komponente mit einer Tandem

dsRNA-bindende Domäne identifiziert worden (Liu et al., 2003). Das Protein heterodimerisiert mit dem Dicer-Enzym DCR2 aus *Drosophila*. In *Caenorhabditis elegans* ist ein Protein mit ähnlicher Domänenstruktur identifiziert worden, dass *in vitro* mit dem Dicer-Enzym DCR1 assoziiert (Tabara et al., 2002).

Um effizient in RISC inkorporiert zu werden, benötigen die siRNAs die charakteristischen Strukturmerkmale 5'-Phosphat und zwei Nukleotid 3'-Überhänge (Elbashir et al., 2001c; Nykanen et al., 2001). Wie bereits dargestellt, spielt bei der Erkennung dieser terminalen Merkmale die sogenannte PAZ-Domäne eine wichtige Rolle.

Nach der Aktivierung des Effektor-Komplexes wird die Ziel-mRNA lokalisiert. Untersuchungen mehrerer Organismen deuten darauf hin, dass der komplette RISC-Komplex mit Ribosomen assoziiert ist (Pham et al., 2004; Zhang et al., 2004; Djikeng et al., 2003), so dass RNAi und Translation funktionell verbunden wären. Dadurch könnte das Auffinden der spezifischen mRNA durch RISC erleichtert werden (Sontheimer, 2005).

Wurde die Ziel-mRNA durch den aktivierten RISC-Komplex lokalisiert, erfolgte im Anschluss deren Erkennung (Schwarz et al., 2003). Sie wird über eine Hybridisierung mit der *guide* RNA identifiziert. Bei ausreichender Komplementarität zwischen mRNA und *guide* Strang, kommt es zehn Nukleotide vom 5'-Ende der *guide* RNA entfernt (Sontheimer, 2005) zur RISC-vermittelten Spaltung der mRNA (Elbashir et al., 2001c).

Bei einer vollständigen Sequenzkomplementarität zwischen der kurzen siRNA und der Ziel-mRNA wird die mRNA hydrolysiert. Translationale Inhibition können siRNAs dann vermitteln, wenn die Hybridisierung der siRNA mit der mRNA infolge von Fehlbasenpaarungen nicht perfekt ist (Zamore et al., 2000). Bei einer mRNA-Spaltung des Zielgens kann der *silencing*-Effekt auf RNA- und Proteinebene beobachtet werden. Ist nur die Translation blockiert, ist eine Suppression nur auf Proteinebene erkennbar.

Die durch Spaltung entstandenen mRNA-Fragmente werden in sogenannte *processing bodies* (P-Bodies) transportiert. Dies sind kleine, zelluläre Partikel, die Zentren der mRNA-Degradation darstellen (Sheth and Parker, 2003). Im Jahr 2005 wurde von zwei Arbeitsgruppen ein Zusammenhang zwischen RNAi, Translation, mRNA *turnover* und mRNA-Aufbewahrung hergestellt. Sie zeigten, dass die Argonaute-Proteine 1 und 2 in den P-Bodies konzentriert vorliegen, so dass die gespaltenen mRNAs in den P-Bodies von Nukleasen abgebaut werden können (Liu et al., 2005; Sen and Blau, 2005). Es ist auch bekannt (Bregues et al., 2005), dass mRNAs in den P-Bodies nicht degradiert, sondern nur temporär zwischengelagert werden. Dies ist für den Fall einer durch siRNAs (oder miRNAs) vermittelten Translationsrepression eine gute Möglichkeit, um die mRNA der Translationsmaschinerie zu entziehen.

Der *guide* Strang der siRNA bleibt beim Spaltungsprozess der mRNA unversehrt, so dass der einmal zusammengesetzte Komplex mehrfach Spaltungszyklen durchlaufen kann. Während die Spaltung der mRNA ATP-unabhängig abläuft (Martinez and Tuschl, 2004; Nykanen et al., 2001), benötigt die schnelle Regeneration von RISC ATP (Haley and Zamore, 2004). Es ist möglich, dass an diesem mRNA-Dissoziationsschritt eine ATP-

abhängige Helikase beteiligt ist, die die Trennung des mRNA *guide* Strang-Hybrids unterstützt (Meister and Tuschl, 2004).

### **Multienzymkomplex RISC**

Die Aktivität der siRNA-vermittelten mRNA-Degradation wurde in Komplexen identifiziert, die Größen zwischen ~160kDa und ~80S aufwiesen (Pham et al., 2004; Hutvagner and Zamore, 2002; Martinez et al., 2002; Mourelatos et al., 2002; Nykanen et al., 2001; Hammond et al., 2001). Alle Effektor Komplexe enthielten Komponenten der AGO-Familie mit den für sie charakteristischen Domänen PAZ und PIWI (Carmell et al., 2002). So konnten auch im humanen minimalen RISC AGO1 und AGO2 als die einzigen Proteine identifiziert werden. Diese binden stark (Liu et al., 2004; Martinez et al., 2002) unter Beteiligung der PAZ-Domäne an einzelsträngige siRNAs im Effektor Komplex (Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004). Durch die PIWI-Domäne verfügt RISC zusätzlich über eine Nukleasefunktion (Song et al., 2004; Elbashir et al., 2001c).

Die Bindung der siRNA und der mRNA erfolgt in einer Spalte, die zwischen der PAZ- und der PIWI-Domäne im AGO2-Molekül liegt. Dabei bindet das 3'-Ende der siRNA in einer Bindetasche der PAZ-Domäne, während das 5'-Ende der siRNA möglicherweise auf der anderen Seite der Tasche bindet. Die Aktivität der gegenüberliegenden PIWI-Domäne spaltet die mit der siRNA hybridisierten mRNA (Song et al., 2004).

Die gesamte Zusammensetzung sowie die beteiligten Komponenten des RISC sind noch nicht vollständig bekannt. Eine Tabelle mit bereits isolierten Komponenten ist auf der folgenden Seite dargestellt.

RISC katalysiert mit Endonukleaseaktivität (Slicer) eine Phosphodiesterhydrolyse, deren Produkte eine 3'-Hydroxyl- und eine 5'-Phosphatmonoestergruppe tragen (Martinez and Tuschl, 2004; Schwarz et al., 2004). Die Aktivität ist abhängig von divalenten Metallionen (Martinez and Tuschl, 2004; Schwarz et al., 2004) und wurde dem bereits beschriebenen RISC-Protein AGO zugeordnet (Liu et al., 2004; Song et al., 2004). Dabei konnte die PIWI-Domäne von AGO als RNase H-Domäne identifiziert werden, die dafür zuständig ist, dass ausschließlich die mRNA in einem siRNA:mRNA-Hybrid gespalten wird (Liu et al., 2004). Diese Reaktion ist analog zur RNase H-vermittelten Hydrolyse von RNAs in DNA:RNA-Hybriden, in der die Spaltung durch einen DNA *guide* Strang vermittelt wird (Song et al., 2004). In der PIWI-Domäne von AGO sind drei konservierte, saure Aminosäuren identifiziert worden, die auch im katalytischen Zentrum von RNase H-Enzymen lokalisiert sind und dort ein  $Mg^{2+}$ -Ion koordinieren. Dieses Kation ermöglicht den nukleophilen Angriff der Phosphodiesterbindung in der RNA, dessen Spaltprodukte wie die mRNA-Fragmente nach der RISC-katalysierten Hydrolyse auch eine 5'-Phosphat- und eine 3'-Hydroxylgruppe aufweisen (Chapados et al., 2001; Yang and Steitz, 1995).



Komplex (Originalname)	Quelle	Bekannte oder mögliche Komponenten	Größe (geschätzt)	Mögliche Funktion im RNAi-Signalweg	Referenz
B	<i>D. melanogaster</i> Embryos	n.b.	n.b.	siRNA-Bindung, Vorläufer RISC-loading complex?	(Tomari et al., 2004)
Dcr2-R2D2	<i>D. melanogaster</i> S2-Zellen	DCR2, R2D2	~250 kDa	dsRNA-Prozessierung, siRNA-Bindung	(Liu et al., 2003)
Dcr2-R2D2 (R1)	<i>D. melanogaster</i> Embryos	DCr2, R2D2	~250 kDa	dsRNA-Prozessierung, siRNA-Bindung, Vorläufer von RISC	(Pham et al., 2004)
RISC-loading complex‡, RLC (A)	<i>D. melanogaster</i> Embryos	DCR2, R2D2	n.b.	dsRNA-Prozessierung, siRNA-Bindung, Vorläufer von RISC	(Tomari et al., 2004; Pham et al., 2004)
R2	<i>D. melanogaster</i> Embryos	n.b.	n.b.	RISC-assembly Intermediat?	(Pham et al., 2004)
Holo-RISC (R3, RISC)	<i>D. melanogaster</i> Embryos	AGO2, DCR1, DCR2, Fmr1/ Fxr, R2D2, Tsn, Vig	~80S	Ziel-RNA-Bindung und -Spaltung	(Tomari et al., 2004; Pham et al., 2004)
RISC	<i>D. melanogaster</i> S2-Zellen	AGO2, Fmr1/ Fxr, Tsn, Vig	~500 kDa	Ziel-RNA-Bindung und -Spaltung	(Caudy et al., 2003; Caudy et al., 2002; Hammond et al., 2001; Hammond et al., 2000)
RISC	<i>D. melanogaster</i> S2-Zellen	AGO2	~140 kDa	Ziel-RNA-Bindung und -Spaltung	(Rand et al., 2004)
RISC*	<i>D. melanogaster</i> Embryos	n.b.	~200 kDa	Ziel-RNA-Bindung und -Spaltung	(Nykanen et al., 2001)
Fmr1-associated complex	<i>D. melanogaster</i> S2-Zellen	L5, L11, 5S rRNA, Fmr1/ Fxr, AGO2, Dmp68	n.b.	Ziel-RNA-Bindung und -Spaltung?	(Ishizuka et al., 2002)
Minimal RISC	HeLa-Zellen	eIF2C1 (AGO1) oder eIF2C2 (AGO2)	~160 kDa	Ziel-RNA-Bindung und -Spaltung	(Martinez and Tuschl, 2004; Meister et al., 2004; Liu et al., 2004; Martinez et al., 2002)
miRNP	HeLa-Zellen	eIF2C2 (AGO2), Gemin3, Gemin4	~550 kDa	miRNA-Assoziation, Ziel-RNA-Bindung und -Spaltung	(Hutvagner and Zamore, 2002; Mourelatos et al., 2002)

**Tabelle 2: Komponenten und Funktionen von diversen RISC-Komplexen**

‡ Möglicherweise analog zum *Caenorhabditis elegans* DCR-1-RDE-1-RDE-4-DRH1-2-Komplex (charakterisiert durch Koimmunpräzipitation), \*Aktivierter Komplex. Abkürzungen: AGO Argonaute, DCR Dicer, Dmp68 *Drosophila melanogaster*-Ortholog der Säuger p68 RNA *unwindase*, eIF2C1 *eukaryotic translation-initiation factor 2C1*, eIF2C2 *eukaryotic translation-initiation factor 2C2*, Fmr1/ Fxr *Drosophila melanogaster*-Ortholog des *fragile-X mental-retardation protein* (FMRP), miRNP miRNA-Proteinkomplex, rRNA ribosomal RNA, Tsn, *tudor-staphylococcal nuclease*; Vig, *vasa intronic gene*, n.b. nicht beschrieben. Modifiziert nach (Sontheimer, 2005)

### 1.2.3 Nebeneffekte und Schwierigkeiten bei Verwendung von siRNAs

Das Potential einer spezifischen Suppression von Genen in Säugerzellen ist sehr hoch. Neben dem Versuch, die Effizienz von RNAi methodisch weiter zu entwickeln, beschäftigte sich daher eine Reihe von Studien auch mit möglichen unspezifischen Effekten. Unter den

sogenannten *off target*-Effekten werden unspezifische Genexpressionsveränderungen in der Zelle verstanden, die auf die Applikation der siRNAs zurückzuführen sind, jedoch nicht spezifisch mit der zu supprimierenden Zielstruktur zusammenhängen (Sontheimer, 2005).

Diese können durch z.B. zu hohe Konzentrationen an siRNAs oder schlechte Transfektionsbedingungen siRNA-sequenzunspezifischen Charakter haben. Dazu zählen auch die siRNA-induzierten Interferonantworten. Es gibt Veröffentlichungen, wonach siRNAs interferonstimulierbare Gene aktivieren. So zeigten Sledz et al., dass transfizierte siRNAs neben einer Induktion dieser Gene auch eine interferonvermittelte Aktivierung des JAK/ STAT-Signalweges hervorrufen können (Sledz et al., 2003). Wichtig ist, dass diese siRNAs enzymatisch mit einem T7 RNA-Polymerase-System und RNase III-Verdau hergestellt wurden. Zum Vergleich wurden für die Untersuchungen auch chemisch synthetisierte siRNAs eingesetzt, die ein entsprechendes Ergebnis erbrachten.

Eine Induktion der Interferonantwort durch endogen transkribierte siRNAs mit Hilfe von Plasmiden und lentiviralen Vektoren wurde ebenfalls beobachtet (Persengiev et al., 2004; Bridge et al., 2003), wobei sich die Induktion von Interferonzielgenen wie z.B. der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase auch durch die Vektorkontrolle allein zeigte (Bridge et al., 2003). Im Gegensatz zu Sledz et al. war durch chemisch synthetisierte siRNA in diesem Versuchsansatz keine unspezifische siRNA-Induktion nachzuweisen. Daten anderer Arbeitsgruppen widerlegten eine siRNA-induzierte Interferonantwort (Scacheri et al., 2004; Chi et al., 2003) bzw. lieferten Bergündungen für *off target*-Effekte. Rossi und Mitarbeiter zeigten, dass T7 RNA-Polymerase-abhängige siRNAs in mehreren Zellsystemen IFN $\alpha$  und IFN  $\beta$  induzieren können: Sie zeigten damit eine mögliche Erklärung für die von Sledz et al. (Sledz et al., 2003) beobachtete Interferonantwort auf (Kim et al., 2004), erklären jedoch nicht den Befund, der mit chemisch synthetisierten siRNAs erhalten wurde. Es wird dargelegt, dass die für Transkripte von T7 Systemen und Pol III-Promotoren charakteristischen 5'-Triphosphate verantwortlich für die Interferonantwort sind (Kim et al., 2004). Die Intention dabei war, auch die unspezifischen Effekte von Bridge et al. zu erklären.

Neben den erwähnten Beispielen für die Beobachtung und die Widerlegung von Interferonantworten sind siRNA-sequenzspezifische Effekte beschrieben worden. Schon kurze Zeit nach Erscheinen der vielbeachteten Publikation aus dem Labor von Thomas Tuschl (Elbashir et al., 2001a) wurde die Spezifität der siRNAs in Frage gestellt, da Punktmutationen in den siRNAs kaum eine Veränderung der beobachteten Suppression zeigten (Boutla et al., 2001). Amarzguioui et al. beschrieben, dass mutierte siRNA-Sequenzen vor allem im 5'-Bereich toleriert werden (Amarzguioui et al., 2003). SiRNAs mit bis zu fünf Fehlbasenpaarungen am 5'-Ende und neun am 3'-Ende der siRNA können trotzdem die Spaltung der Zielsequenz vermitteln, wenn auch in einem schwächerem Ausmaß (Haley and Zamore, 2004). Gemäß den Daten von Jackson et al. müssen mRNA und siRNA nur in elf aufeinander folgenden Basen übereinstimmen, um *gene silencing* zu bewirken (Jackson et al., 2003).

Des Weiteren ist inzwischen bekannt, dass siRNAs, die komplementär zu verschiedenen Sequenzen eines Transkripts sind, unterschiedliche mRNA-Expressionsprofile hervorrufen können (Jackson et al., 2003). Auch Befunde von Persengiev et al. zeigten, dass chemisch

synthetisierte siRNAs konzentrationsabhängig unspezifische Expressionsänderungen bei über 1000 Genen hervorrufen können (Persengiev et al., 2004). Dabei kommt es sowohl zur Induktion als auch zur Repression von Genen, die in die unterschiedlichsten Zellfunktionen, unter anderem auch in die Interferonantwort, eingebunden sind (Persengiev et al., 2004). Eine mögliche Erklärung sind Hybridisierungen zwischen mRNAs und siRNAs trotz Fehlbasenpaarungen. Diese können zur Translationshemmung oder aber auch Degradation von Nicht-Zielgenen führen (Jackson and Linsley, 2004). Im Falle einer Repression von Proteinen wirken siRNAs als miRNAs (Zeng et al., 2003; Boutla et al., 2001). Doench et al. zeigten eine Proteinrepression im Gegensatz zur mRNA-Degradation bei Verwendung von siRNAs, die nur teilweise komplementär zu der Zielsequenz in der 3'-UTR der mRNA waren. Dabei war vor allem die Komplementarität im 5'-Bereich der siRNAs wichtig, während Fehlbasenpaarungen im 3'-Ende toleriert wurden (Doench et al., 2003). Diese Aussage steht im Gegensatz zur den Befunden von Amarzguioui et al. (Amarzguioui et al., 2003).

Unterstützt werden diese Befunde durch Daten von Saxena et al.: Diese zeigten, dass siRNAs mit drei bis vier Fehlbasenpaarungen gegen 3'-UTR Regionen wie miRNAs die Translation beeinträchtigen, jedoch keine Spaltung des Transkripts hervorrufen (Saxena et al., 2003).

Diese Beobachtungen können die von Jackson et al. publiziert *off target*-Effekte (Jackson et al., 2003) nur unter der Annahme erklären, dass die Hemmung der Proteine sekundär die Veränderungen auf mRNA-Ebene hervorrufen.

Im Zusammenhang mit *off target*-Effekten muss auch der *passenger* Strang berücksichtigt werden. Wird der *sense* Strang des siRNA-Moleküls in RISC inkorporiert, so kann dieser nicht zur Suppression der Zielstruktur führen, da er nicht die zur Ziel-mRNA komplementäre Baseninformation enthält. Vielmehr wird er durch Hybridisierung mit anderen Transkripten unerwünschte Nebeneffekte auslösen (Schwarz et al., 2003). Dieses Kriterium sollte bei der Auswahl der siRNAs berücksichtigt werden (Mittal, 2004; Reynolds et al., 2004).

Alle diese Untersuchungen zeigen, dass die Auswahl einer geeigneten siRNA-Sequenz einen großen Anteil am Gelingen der Experimente mit siRNAs hat. Daher werden immer neue „Design Regeln“, nach denen siRNAs weniger *off target*-Effekte verursachen sollen, entwickelt. Neben thermodynamischen Eigenschaften (Chalk et al., 2004; Reynolds et al., 2004; Khvorova et al., 2003), Basenzusammensetzungen (Reynolds et al., 2004) und Nukleotidpräferenzen für bestimmte Positionen (Reynolds et al., 2004) werden unter anderem auch lokale Sekundärstrukturen der mRNAs (Schubert et al., 2005; Schramm and Ramey, 2005; Luo and Chang, 2004) berücksichtigt.

Die vorhandenen Publikationen zu *off target*-Effekten von siRNA sind nicht immer miteinander vergleichbar, da es bis heute keine einheitlichen Standards für die Durchführung von siRNA-Experimenten gibt. Ein eindrucksvolles Beispiel liefern zwei Publikationen, die trotz gleicher siRNA-Sequenz gegen Luziferase und gleichem Zellsystem zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (Persengiev et al., 2004; Jackson et al., 2003). Während Persengiev et al. unspezifische, konzentrationsabhängige Induktionen und Repressionen beobachten, konnten Jackson et al. keine siRNA-Konzentration ermitteln, die bei vergleich-

barer Suppression des Zielgens eine Reduktion des *off target*-Effektes zeigt. Eine solche Diskrepanz kann z.B. durch unterschiedliche Transfektionsbedingungen bedingt sein.

Es verdeutlicht, dass die zur Zeit unter Verwendung von siRNAs erhaltenen Ergebnisse, sowohl was die gewünschten als auch die unerwünschten Effekte angeht, für ein gegebenes Zellsystem sorgfältig evaluiert werden müssen und nicht universell gültig sind. Bis Bedingungen für eine universell und ohne das Hervorrufen von unspezifischen Effekten einsetzbare siRNA-Synthese entwickelt sind, muss jeder Experimentator versuchen, die größte Effizienz und Spezifität für das verwendete System zu erreichen und das Experiment bestmöglich zu kontrollieren.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Bedeutung der RNA Interferenz zeigt sich unter anderem durch die vielen Publikationen, die mit siRNA-Strategien durchgeführte funktionelle Studien in der Grundlagenforschung und in der medizinischen Forschung beschreiben. Die RNAi-vermittelte Suppression von intrazellulären Signalmolekülen birgt große Möglichkeiten, aber auch noch weitgehend unbekannte Risiken bei der Modulation der Genexpression im Rahmen akuter oder chronischer Entzündungen.

Die eingangs beschriebenen Signalwege mit den Schlüsselproteinen TAK1, JNK und AP-1, durch die die entzündlichen Zytokine IL-1 $\alpha$  oder TNF $\alpha$  die Expression weiterer proinflammatorischer Moleküle wie IL-8 und IL-6 regulieren, ist sehr komplex und stark reguliert. Es ist daher interessant in der Signalkaskade an Schlüsselpositionen modulierend durch RNAi einzugreifen. Im diesem Kontext sollten in dieser Arbeit zwei wesentliche Ziele verfolgt werden:

- (I) Systematische Anwendung und Austestung dreier technisch unterschiedlicher Ansätze von RNAi. Hierbei sollte als Zielstruktur das Adapterprotein TAB1 des rezeptorproximal gelegenen TAK1-/ TAB1-Komplexes gewählt und die Verwendung von synthetisch hergestellten siRNAs, stabil exprimierten shRNAs und mit rekombinatem Dicer generierten d-siRNA-Gemischen miteinander verglichen werden. Intention dabei war, die unterschiedlichen Methoden zur Suppression von Genen beurteilen zu können. Die durch siRNA-vermittelte Suppression der Zielstrukturen TAB1 und TAK1 bedingten Phänotypen sollten zusätzlich bestimmt und verglichen werden. Hierzu sollte die Expression von 136 Entzündungsgenen sowie 19 sogenannten Haushaltsgenen mit Hilfe von DNA-Oligonukleotid-Microarrays analysiert werden.
- (II) Die Kette molekularer Ereignisse, die zur Ausbildung eines entzündlichen Phänotyps führt sollte an zwei weiteren charakteristischen Punkten durch den Einsatz von RNAi moduliert werden. Dazu wurden als Zielstrukturen ausgewählt:
  - (A) Transkriptionsfaktoren, welche die induzierbare Expression von entzündungsrelevanten Genen steuern. Die Auswahl sollte mit Hilfe einer initialen Genexpressionsstudie anhand einer IL-1 $\alpha$ -abhängigen Kinetik auf mRNA-Ebene durchgeführt werden.
  - (B) Gene, die durch proinflammatorische Zytokine stark reguliert werden und somit potentiell wichtige Kandidaten für die Ausbildung einer Entzündung sind. Diese sollten ebenso durch Analyse einer IL-1 $\alpha$ -abhängigen Zeitreihe mit Hilfe von Expressionsuntersuchungen ausgewählt werden.

Nach der Auswahl geeigneter Zielstrukturen sollte, wie für TAB1 und TAK1 auch, die phänotypische Charakterisierung von siRNA-vermittelter Suppression dieser Moleküle als Schlüsselfaktoren im oben beschriebenen Signalweg durchgeführt werden. Die Phänotypen sollten ebenfalls anhand der Expressionsprofile von Entzündungsgenen des DNA-Microarrays analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterial

Plastikwaren, Einwegmaterial und Ähnliches wurden von den Firmen Eppendorf, Starlab, Sarstedt, Omnilab, Roth GmbH, Greiner, Neolab, Nunc und Brand bezogen.

### 2.2 Geräte

#### Elektrophorese-, Westernblot- und Fotografiestysteme

- Biometra BioDoc Analyze UV-Transilluminator
- Biotec Fisher PHERO-STAB 0632 Spannungsgerät
- Hoefer Mighty Small, SE250/260 Gelelektrophorese-Apparatur
- Schleicher&Schuell *SemiDryBlotter*
- Sigma Vertikale duale Elektrophoresekammer
- BioRAD 170-4469XTU Wide Mini-Sub Cell GT System

#### Mikroskope und Photometer

- Eppendorf BioPhotometer
- Leitz Diavert
- Leitz Laborlux 11
- MR6500 Dynatech Mikrottestplattenleser
- Shimadzu Spektralphotometer UV-160A
- Zeiss Axiovert 200M
- Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer
- Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies

#### Verschiedenes

- Biometra Geltrockner
- B. Braun Biotech International Certomat H Inkubator
- EG&G Berthold Lumat LB 9507 Luminometer
- Eppendorf Thermomixer 5436
- Heidolph Vortex
- Landgraf Thermocycler
- MWG Biotech Primus Thermocycler
- Lauda C6 CS Wasserbad
- Perkin Elmer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzer)
- 7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems
- Protec Optimax Filmentwicklermaschine
- Affymetrix Array scanner 428

#### Waagen

- Chyo Electronic Balance MP-3000
- Sartorius Analytic

#### Zellkultur

- GFL Wasserbad
- Heraeus Brutschrank CO<sub>2</sub> Autozero
- Heraeus Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472

Zentrifugen

- Beckmann J2-21 Centrifuge
- Eppendorf Concentrator 5301
- Heraeus Biofuge Fresco
- Heraeus Biofuge Pico
- Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge (DuPont)
- Sigma 4K15
- Sigma 6K10

**2.3 Chemikalien**

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

**2.4 Lösungen und Puffer**Coomassie Brilliant Blue-Lösung

0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
50% (v/v)	Methanol
20% (v/v)	Essigsäure

2xHeBS (sterilfiltriert)

0,28mol/l	NaCl
0,05mol/l	HEPES
1,5mmol/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
pH 7,05 mit 5mol/l NaOH einstellen	

10x Laemmli-Laufpuffer

0,5mol/l	Tris
1,92mol/l	Glycin
0,5% (w/v)	SDS

4x Laemmli-Auftragspuffer

100mmol/l	Tris (pH 8,8)
8% (w/v)	SDS
24% (v/v)	Glycin
16% (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,02% (w/v)	Bromphenolblau
mit ddH <sub>2</sub> O auf 25ml auffüllen	

Luziferase-Reagenz

200mmol/l	Tricin
10,7mmol/l	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> *5H <sub>2</sub> O
26,7mmol/l	MgSO <sub>4</sub>
333mmol/l	DTT
10mg	Coenzym A
5,931mg	Na-Luziferin
5,3mmol/l	ATP

PBS

137mmol/l	NaCl
2,7mmol/l	KCl
4,3mmol/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,4mmol/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Sammelgelpuffer

1mol/l	Tris (pH 6,8)
--------	---------------

10x Semi Dry Blotpuffer

25mmol/l	Tris
192mmol/l	Glycin
20% (v/v)	Methanol

TAE-Puffer

4mmol/l	Tris
0,11% (v/v)	Essigsäure
1mmol/l	EDTA

TBS-Puffer (pH 7,4)

10mmol/l	Tris
1,54mol/l	NaCl

TBST-Puffer

TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20

Trenngelpuffer

1mol/l	Tris (pH 8,8)
--------	---------------

TSS-Lösung

10% (w/v)	Polyethylenglykol 6000
5% (v/v)	DMSO
50mmol/l	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
mit LB-Medium auf 25ml auffüllen	

Lysepuffer 1

10mmol/l	Tris (pH 7,05)
30mmol/l	Natriumpyrophosphat
20mmol/l	$\beta$ -Glycerophosphat
50mmol/l	NaCl
50mmol/l	NaF
2mmol/l	$\text{Na}_3\text{VO}_4$
1% (v/v)	Triton X-100
1 $\mu$ g/ml	Pepstatin
10 $\mu$ g/ml	Leupeptin
0,5mmol/l	PMSF

Lysepuffer 2

100mmol/l	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8)
0,2% (v/v)	Triton X-100
1 $\mu$ g/ml	Pepstatin
10 $\mu$ g/ml	Leupeptin
0,5mmol/l	PMSF

Lysepuffer 3

62,5mmol/l	Tris (pH 6,8)
2% (w/v)	SDS
10% (v/v)	Glycerol
50mmol/l	DTT
0,01% (w/v)	Bromphenol-Blau

RNA/ DNA Auftragspuffer

50%(v/v)	Glycerin
1mmol/l	EDTA (pH 8,0)
0,25% (w/v)	Bromphenolblau

Milch

5% (w/v)	Trockenmilchpulver in TBST-Puffer
----------	-----------------------------------

5x Fragmentierungspuffer

20mmol/l	Tris-Acetat (pH 8,1)
50mmol/l	KOAc
15mmol/l	MgOAc

Hybridisierungspuffer

50mmol/l	Na-Phosphat (pH 8,0)
50%	Formamid
6x	SSC
5x	Denhardts Lösung
0,5%	SDS

20x SSC

3mol/l	NaCl
0,3mol/l	Tri-Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,0 einstellen

## 2.5 Medien

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) LB-Medium

mit folgenden Zusätzen:		10g	BactoTrypton
10% (v/v)	FKS	10g	NaCl
100 $\mu$ g/ml	Streptomycin	5g	Hefeextrakt
100U/ml	Penicillin	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen und autoklavieren	
2mmol/l	L-Glutamin		

## 2.6 Enzyme und Enzympuffer

Sämtliche Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen, MBI Fermentas, Stratagene, Bioline und Amersham Biosciences bezogen und in den entsprechenden Puffern eingesetzt.

## 2.7 Antikörper und rekombinante Proteine

Eingesetzte Primärantikörper

- $\alpha$ -c-JUN Antikörper (H-79, Santa Cruz)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit den Aminosäuren 1-79 von humanem c-JUN
- $\alpha$ -phospho-c-JUN Antikörper (Ser63) (Cell Signaling Technology)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen phospho-Ser63-Peptid, welches zusätzlich die Ser63-



umgebenen Aminosäuren von humanem c-JUN enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A

- $\alpha$ -JUND Antikörper (329, Santa Cruz)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit dem C-Terminus des murinen JUND
- $\alpha$ -JUNB Antikörper (N-17, Santa Cruz)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit der N-terminalen Domäne von murinem JUNB (murine und humane Sequenz unterscheiden sich in zwei Aminosäuren)
- $\alpha$ -cFOS Antikörper (H-125, Santa Cruz)  
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem rekombinanten, von den C-terminalen Aminosäuren 210-335 abgeleiteten Protein cFOS p62 (human)
- $\alpha$ -FRA-1 Antikörper (R-20, Santa Cruz)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit dem N-Terminus von FRA-1 aus der Ratte
- $\alpha$ -TAB1 Antikörper (Prof. Dr. Matsumoto, Nagoya, Japan)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit dem Peptid der Aminosäuren 480-500 aus TAB1
- $\alpha$ -TAK1 Antikörper (M579, Santa Cruz)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit rekombinantem, vollständigem murinem TAK1 (Aminosäuren 1-579)
- $\alpha$ -phospho-NF- $\kappa$ B p65 Ser536 Antikörper (Cell Signaling Technology)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen Phosphopeptid, welches die Ser536-umgebenen Aminosäuren von humanem NF- $\kappa$ B p65 enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A
- $\alpha$ -phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  Ser32 Antikörper (Cell Signaling Technology)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen Phosphopeptid, welches die Ser32-umgebenen Aminosäuren von I $\kappa$ B $\alpha$  enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A
- $\alpha$ -p38 (pTpY 180/ 182) Antikörper (Biosource)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen phospho-Thr180/ Tyr182-Peptid, abgeleitet von humanem p38
- $\alpha$ -phospho-JNK (Thr183/ Tyr185) Antikörper (Cell Signaling Technology)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen phospho-Thr183/ Tyr185-Peptid, welches zusätzlich die Thr183/ Tyr185-umgebenen Aminosäuren von humanem p54/ JNK enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A
- $\alpha$ -ERK2 Antikörper (C-14, Santa Cruz)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem Peptid von C-terminalen Aminosäuren von p42 (ERK2) der Ratte

Eingesetzte Sekundärantikörper, verknüpft mit HRP (*horseradish peroxidase*)

$\alpha$ -Kaninchen Esel, Verdünnung 1:3000, Amersham Biosciences  
 $\alpha$ -Maus Schaf, Verdünnung 1:2000, Amersham Biosciences

Rekombinante Proteine

humanes, rekombinantes IL-1 $\alpha$  Prof. Dr. Saklatvala, London, England  
 humanes, rekombinantes TNF $\alpha$  Strathmann  
 humanes, rekombinantes IL-6 Prof. Dr. Lüscher, Aachen  
 humanes, rekombinantes gp80 Prof. Dr. Lüscher, Aachen

**2.8 Vektoren**

pCR-Blunt II TOPO	Invitrogen
pEGFPC1	Clontech
pEGFP-TAK1wt	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht, Hannover
pEGFP-hTAB1wt	Ph.D. Sakurai, Osaka, Japan
pGL2 Control	Promega
pCS3MT	Dr. Holland, London, England
pCDNA3.1	Invitrogen
pSV- $\beta$ -Gal	Promega
pUHD13.3-IL-8-Promotor-Luc wt	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht, Hannover
pSUPER	Prof. Dr. Schmitz, Gießen
pBSPAC $\Delta$ P	PD Dr. Nourbakhsh, Hannover
pSUPER-TAB1	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht, Hannover
pCR-Blunt II TOPO hTAK1 <sub>125-868</sub>	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht, Hannover
pCR-Blunt II TOPO Luziferase <sub>392-1046</sub>	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht, Hannover

**2.9 TaqMan-Assays on Demand, siRNAs, Primer und Oligonukleotide**TaqMan-Assays on Demand, Applied Biosystems

Name	Accession Number	Assay ID
c-JUN	NM_002228	Hs00277190_s1
JUNB	NM_002229	Hs00357891_s1
JUND	NM_005354	Hs00534289_s1
cFOS	NM_005252	Hs00170630_m1
FRA-1	NM_005438	Hs00759776_s1
IL-6	NM_000600	Hs00174131_m1
IL-8	NM_000584	Hs00174103_m1
ACTB	NM_001101	Hs99999903_m1
GUSB	NM_000181	Hs99999908_m1
IRF7	NM_001572	Hs00185375_m1
IFIT1	NM_001548	Hs01675197_m1
RGS2	NM_002923	Hs00180054_m1
NFKB1	NM_003998	Hs00765730_m1

## siRNA-Oligonukleotide

Protein-name	Accession Number	siRNA-Name	Sequenz	Firma
IL-8	NM_000584	IL-8 siRNA#1	5'-AACUCCACAGUCAAUUUATT-3' 3'-TTUUGAGGUGUCAGUUAAU-5'	MWG Biotech
		IL-8 siRNA#2	5'-GAACUUAGAUGUCAGUGCATT-3' 3'-TTCUUGAAUCUACAGUCACGU-5'	MWG Biotech
		IL-8 siRNA#3	5'-AGAACUGAGAGUGAUUGAGTT-3' 3'-TTUCUUGACUCUCACUAACUC-5'	MWG Biotech
IL-6	NM_000600	IL-6 siRNA#1	5'-CUCACCUCUUCAGAACGAATT-3' 3'-TTGAGUGGAGAAGUCUUGCUU-5'	MWG Biotech
		IL-6 siRNA#2	5'-CAAGAGUACAUGUGUGAATT-3' 3'-TTGUUCUCAUUGUACACACUU-5'	MWG Biotech
		IL-6 siRNA#3	5'-AUAUGUGAAGCUGAGUUAATT-3' 3'-TTUAUACACUUCGACUCAAUU-5'	MWG Biotech
c-JUN	NM_002228	c-JUN SMART Pool	keine Sequenzinformation vorhanden	Dharmacon
cFOS	NM_005252	cFOS siRNA#1	5'-AGGAUUAAGAUGGCUGCAGTT-3' 3'-TTUCCUUAAUUCUACCGACGUC-5'	Eurogentec
		cFOS siRNA#2	5'-CUAGAGUUCAUCCUGGCAGTT-3' 3'-TTGAUCUCAAGUAGGACCGUC-5'	Eurogentec
		cFOS siRNA#3	5'-CUUCAUCCACGGUCACUTT-3' 3'-TTGAAGUAAGGGUGCCAGUGA-5'	Eurogentec
FRA-1	NM_005438	FRA-1 siRNA#1	5'-GGCCUUGUGAACAGAUAGTT-3' 3'-TTCCGGAACACUUGUCUAGUC-5'	Eurogentec
		FRA-1 siRNA#2	5'-GCAUCAACACCAUGAGUGTT-3' 3'-TTCGUAGUUGUGGUACUCACC-5'	Eurogentec
		FRA-1 siRNA#3	5'-GAUGAGAAAUCAGGGCUGCTT-3' 3'-TTCUACUCUUUAGACCCGACG-5'	Eurogentec
JUND	NM_005354	JUND siRNA#1	5'-UGAUGAAGAAGGACGCGCUTT-3' 3'-TTACUACUUCUCCUGCGCGA-5'	Eurogentec
		JUND siRNA#2	5'-AGGCCUUGGAGGAUUUACATT-3' 3'-TTUCCGGGACCUCCUAAAUGU-5'	Eurogentec
		JUND siRNA#3	5'-GAGAAAGUGAAGACCCUCATT-3' 3'-TTCUCUUUCACUUCUGGGAGU-5'	Eurogentec
JUNB	NM_002229	JUNB siRNA#1	5'-UGGAACAGCCUUCUACCATT-3' 3'-TTACCUUGUCGGGAAGAUGGU-5'	Eurogentec
		JUNB siRNA#2	5'-GACCAAGAGCGCAUCAAAGTT-3' 3'-TTCUGGUUCUCGCGUAGUUUC-5'	Eurogentec
		JUNB siRNA#3	5'-AACUCCUGAAACCGAGCCUTT-3' 3'-TTUUGAGGACUUUGGCUCGGA-5'	Eurogentec
TAB1	E14752	TAB1 siRNA	5'-CCGCAGCUACUCUGCUGAUTT-3' 3'-TTGGCGUCGAUGAGACGACUA-5'	Dharmacon
Luziferase	X65324	Luziferase siRNA	5'-CGUACGCGAAUACUUCGAUU-3' 3'-UUGCAUGC GCCUUAUGAAGCU-5'	Dharmacon, MWG Biotech
GFP	U55763 (pEGFPC1)	GFP siRNA	5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCATT-3' 3'-TTCGUUCGACUGGGACUUAAGU-5'	MWG Biotech

Sämtliche Primer und Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

Oligonukleotide zur Klonierung des Vektors pSUPER-TAB1 (Expressionsprodukt: TAB1 shRNA)

Name	Sequenz
hTAB1 hp <i>forward</i>	5'-GATCCCCCGCAGCTACTCTGCTGATTTCAAGAGAATCAGCAGAGTAGCTGCGGTTTTGGAAA-3'
hTAB1 hp <i>reverse</i>	5'-AGCTTTTCCAAAACCGCAGCTACTCTGCTGATTTCTTGAATCAGCAGAGTAGCTGCGGGGG-3'

Primer zur Klonierung der Vektoren pCR-Blunt II TOPO hTAK1<sub>125-868</sub> und pCR-Blunt II TOPO Luziferase<sub>392-1046</sub> sowie zur Herstellung der TAB1 d-siRNAs, TAK1 d-siRNAs und Luziferase d-siRNAs

Name	Sequenz
hTAB1d-siRNA <i>se</i>	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAGCTACTATGCTGATGGCAA-3'
hTAB1d-siRNA <i>as</i>	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGATAAACTCAGTGTCAATCATCGC-3'
hTAK1d-siRNA <i>se</i>	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGTTGGAAGAGGAGCCTTTGGA-3'
hTAK1d-siRNA <i>as</i>	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGATAAACCGCATCAAGTGAGTCATT-3'
Luziferase d-siRNA <i>se</i>	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGTTACAGATGCACATATCGAG-3'
Luziferase d-siRNA <i>as</i>	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGATAAAATCCACATATCAAATATCC-3'

Sequenzierprimer

Name	Sequenz
T3 <i>as</i>	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'
pSUPER-Insert <i>as</i>	5'-CGATAAGCTTTTCCAAAA-3'
T7 <i>se</i>	5'-TAATACGACTCACTATAG-3'
M13 <i>reverse</i>	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
M13 <i>forward</i> (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

Primer für RT-PCR-Reaktionen

Name	Sequenz
JUNB <i>se</i>	5'-CCGGATGTGCTACTAAATGG-3'
JUNB <i>as</i>	5'-AGAAGGCGTGTCCCTTGAC-3'
Tubulin <i>se</i>	5'-TTCCTGGCCAGCT(GC)AA(AGCT)GC(AGCT)GACCT(AGCT)CGCAAG-3'
Tubulin <i>as</i>	5'-CATGCCCTCGCC(AGCT)GTGTACCAGT(AGCT)A(AGCT)GAAGGC-3'

## 2.10 Standards

GeneRuler 100bp DNA Ladder, MBI Fermentas

1031bp, 900bp, 800bp, 700bp, 600bp, 500bp, 400bp, 300bp, 200bp, 100bp, 80bp

$\lambda$ -DNA/ *EcoR* I und *Hind* III Marker 3, MBI Fermentas

21226bp, 5148bp, 4973bp, 4268bp, 3530bp, 2027bp, 1904bp, 1584bp, 1375bp, 947bp, 831bp, 564bp

Niedermolekularer Proteinstandard (*Low Molecular Weight Calibration Set for SDS Electrophoresis*), Amersham Biosciences

97kDa (Phosphorylase B), 66kDa (Albumin), 45kDa (Ovalbumin), 30kDa (Carboanhydrase), 20kDa (Trypsininhibitor), 14kDa ( $\alpha$ -Lactalbumin)

## 2.11 Bakterienstämme

### E.coli-Stamm TOP10

F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

### E.coli-Stamm XL1-Blue

F<sup>+</sup>: Tn10 (Tet<sup>r</sup>) *proA+B+* *lacI<sup>f</sup>*  $\Delta$ (*lacZ*)M15*l* *recA1* *gyrA96* (Nal<sup>r</sup>) *thi-1* *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>) *glnV44* *relA1* *lac*

## 2.12 Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits

- *GFX Micro Plasmid Prep Kit*, Amersham Biosciences
- *QIAGEN Plasmid Maxi Kit*, Qiagen
- *RNeasy Mini Kit*, Qiagen
- *QIAshredder*, Qiagen
- *RNase-Free DNase Set*, Qiagen
- *QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen
- *QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen
- Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1), Roth GmbH
- *Dicer siRNA Generation Kit*, Peqlab
- *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit*, Invitrogen
- *ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, Applied Biosystems
- DNA-Microarrays Infilhum, TestInfilhum und HA286, MWG Biotech/ Ocimum
- *cDNA Synthesis System*, Roche
- *MEGAscript T7 Kit*, Ambion
- *Amino Allyl Message™ aRNA Amplification Kit*, Ambion
- *High Pure RNA Tissue Kit*, Roche
- *Micocon concentrators*, Amicon
- *FluoroLink Cy3-UTP 4 reactions*, Amersham Biosciences
- *RNA 6000 Nano Chip*, Agilent Technologies
- *Denhardts Lösung*, Sigma
- *dNTP Set*, Roth GmbH
- *pd(N)<sub>6</sub> Random Hexamer*, Amersham Biosciences
- *TaqMan Universal PCR Master Mix*, No AmpErase® UNG, Applied Biosystems
- *Optical Adhesive Covers*, Applied Biosystems
- *Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plates*, Applied Biosystems
- Medium und Zusätze (Zellkultur), GibcoBRL
- Bradford-Kit: *Roti-Quant*, Roth GmbH
- PVDF-Membran, Millipore
- *ECL Westernblotting detection reagent RPN2106*, Amersham Biosciences
- Röntgenfilme Biomax-ML, Biomax-MR, Kodak
- *RayBio® Human Cytokine Antibody Array VI, VII*, RayBiotech
- *DuoSet® ELISA Development System Human IL-8, Human IL-6*, R&D Systems
- *Substrate Reagent Pack*, R&D Systems
- *Luminescent β-Galactosidase Detection Kit II*, BD Biosciences Clontech

## 2.13 Verwendete Software

- ImaGene  
früher MWG Biotech, jetzt Ocimum Biosolutions
- MAVI  
früher MWG Biotech, jetzt Ocimum Biosolutions
- CytoBase  
Medizinische Hochschule Hannover, *Cytokine Microarray Project*, SFB566: Prof. Dr. Kracht, Internet: <http://www.mh-hannover.de/forschung/sfb566/microarray/base/index.phtml>, 01.04.06.
- ImageJ  
Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, Internet: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2005, 01.04.06.
- Mayday  
Nils Gehlenborg, Janko Dietzsch and Kay Nieselt: *A Framework for Visualization of Microarray Data and Integrated Meta Information*, Information Visualization 4(3), 164-175, 2005, doi:10.1057/palgrave.ivs.9500094.

## 2.14 Molekularbiologische Methoden

### 2.14.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.14.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxipräparation)

Entsprechend der Präparationsmaßstäbe (Mini-/ Maxipräparation) zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die transformierten Bakterien in 4ml bzw. 500ml LB-Flüssigkulturen mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bzw. für 6-8h im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Für die Gewinnung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde der *GFX Micro Plasmid Prep Kit* der Firma Amersham Biosciences verwendet, für die Gewinnung im großen Maßstab der *Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen. Die Aufarbeitung der Bakterienkulturen zur DNA-Isolation erfolgte nach Vorschrift der Hersteller. Bei der Mini-Präparation wurde die DNA in der Regel in 30-50µl ddH<sub>2</sub>O und bei der Maxi-Präparation in 200µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 2.14.1.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *RNeasy Mini-Kits* und des *QIAshredder Kits* der Firma Qiagen. Je nach Zellmenge wurden die Zellen in verschiedenen Volumina an Lysepuffer aufgenommen und über eine *QIAshredder*-Säule aufgebrochen. Nach der Aufreinigung über Silicagel-Säulchen erfolgte die Elution der RNA in 30-50µl RNase-freiem Wasser. Um eine DNA-freie RNA-Lösung für Microarray-Experimente zur Verfügung zu haben wurde zwischen den Waschschritten eine DNase I-Behandlung (30U) durchgeführt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

## 2.14.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

### 2.14.2.1 Reinigung von DNA durch Affinitätschromatografie

DNA-Lösungen lassen sich mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen aufreinigen. Die Aufreinigung der Nukleinsäure von Salzen und Proteinen erfolgte nach Herstellerangaben über eine Silicagel-Säule, wobei die DNA-Lösung in Gegenwart hoher Salzkonzentration in einem guanidinhydrochloridhaltigen Puffer auf die Säule aufgetragen und anschließend mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen wurde. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte in 30µl ddH<sub>2</sub>O.

### 2.14.2.2 Phenol/ Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation von DNA

Die Durchführung einer Phenol/ Chloroform-Extraktion ist nötig, um Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu befreien. Diese Nukleinsäurelösung wurde mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt, gemischt und zur Phasentrennung 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Die hydrophile Nukleinsäure reichert sich dabei in der wässrigen Phase an, während die Proteine in der sogenannten Interphase zu finden sind. Die untere organische Phase wurde durch Zugabe von einem Volumen ddH<sub>2</sub>O nachextrahiert. Die Entfernung von Phenolresten aus der vereinigten wässrigen Phase erfolgte in gleicher Weise durch Nachextraktion der Wasserphase mit einem Volumen Chloroform. Aus der wässrigen Phase wurden die Nukleinsäuren mit 1/10 Volumen 3mol/l Natriumacetat und zwei Volumen 70% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt, am nächsten Tag 30min bei 4°C und 13000rpm abzentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei 37°C im Thermoblock wurde das Pellet in 20µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.14.2.3 DNA-Gelextraktion mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*

Zur Isolation von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus Agarosegelen kann der *QIAquick Gel Extraction Kit* eingesetzt werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelstück entsprechend seiner Masse in einem bestimmten Volumen eines chaotropen Puffers aufgelöst. Die DNA wurde an einer Säule mit einer porösen Silicagel-Matrix immobilisiert und nach einem Waschschrift mit 30µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.14.2.4 Lithiumchlorid-Präzipitation von RNA

Zu dem dsRNA-Syntheseansatz (20µl) bei Herstellung von d-siRNAs wurden 30µl nuklease-freies Wasser und 30µl LiCl-Präzipitationslösung (keine Konzentrationsangabe, Peqlab) pipettiert und dieser Ansatz für 3h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol überschichtet und für weitere 30min zentrifugiert. Nach dem Trocknen der RNA bei Raumtemperatur wurde sie in RNase-freiem Wasser gelöst.

### 2.14.3 Trennung von Nukleinsäuren

#### 2.14.3.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten mittels Elektrophorese im Bereich zwischen 200 und 20000bp werden in der Regel Gele aus 1-2%igen (w/v) Agaroselösungen verwendet, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit annähernd proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts der DNA ist. Um Nukleinsäuren sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Ethidiumbromid angefärbt. Der Farbstoff lagert sich zwischen benachbarten Basen (bevorzugt G/C-Paare) einer DNA-Helix an, so dass einzelne Banden unter UV-Licht bei 312nm durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden können. Zur Durchführung wurde die benötigte Agarosemenge in 1x TAE unter Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf 50°C in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 40-100V. Zur Detektion wurde dem Gel dabei direkt Ethidiumbromid (10mg/ml) zugesetzt. Zur Größenbestimmung wurden auf jedem Gel 5-10µl eines geeigneten DNA-Standards aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte durch Aufnahme der Fluoreszenz am BioDoc Analyze UV-Transilluminator.

#### 2.14.3.2 Nichtdenaturierendes PAA-Gel

Um Größe und Integrität von RNAs (z.B. dsRNA, d-siRNAs) abschätzen zu können, wurden die entsprechenden Proben auf einem 15%igen nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 9V. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,1mg/ml) 10min unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die RNA-Banden mit interkaliertem Ethidiumbromid wurden auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Größenbestimmung der RNA-Fragmente konnte ein 100bp-DNA-Standard mitgeführt werden, da dsRNAs und dsDNAs ein ähnliches Laufverhalten haben. Die Zusammensetzung des nativen PAA-Gels ist in folgender Tabelle angegeben:

Lösung	PAA-Gel (15%)
ddH <sub>2</sub> O	4,8ml
10x TAE	1,2ml
30% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung	6ml
40% (w/v) APS	30µl
TEMED	12,8µl

#### 2.14.3.3 Kapillarelektrophorese

Der *RNA 6000 LabChip® Kit* wurde zur Qualitätskontrolle der für die Arrayanalyse verwendeten RNAs sowie cRNAs und für die Überprüfung der mit dem Dicer-Kit generierten dsRNAs und d-siRNAs eingesetzt. Diese Nukleinsäureanalytik beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, wobei die Detektion der RNA-Fragmente anhand eines in die RNA eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt. Hierfür wurde ein sehr geringes Probenvolumen von 1µl bzw. eine Probenmenge von etwa 25-800ng benötigt. Die Proben bewegten sich aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch eine Mikrokapillare, die RNA-Fragmente wurden ihrer Größe entsprechend separiert und anhand der Fluoreszenz



detektiert. Die Ergebnisse wurden aufgezeichnet und mit der *Agilent 2100 BioAnalyzer* Software analysiert.

#### 2.14.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung für RNA und DNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm. Um etwaige Verunreinigungen von Proteinen detektieren zu können, erfolgte die Aufnahme der Spektren in einem Bereich von 220-330nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260nm und 280nm sollte für DNA zwischen 1,75 und 1,9 liegen, da die DNA bei Werten <1,75 zu stark mit Proteinen und bei Werten >1,9 mit RNA verunreinigt ist. Für RNA sollte die Ratio idealerweise 2,0 betragen. Eine DNA-Konzentration von 50ng/µl bzw. eine RNA-Konzentration von 40ng/µl entspricht einer Absorption von eins.

#### 2.14.5 PCR (*polymerase chain reaction*) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Bei der PCR-Technik werden DNA-Abschnitte von einer thermostabilen DNA-Polymerase durch zyklisches Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge und Neusynthese der komplementären DNA-Stränge durch die Polymerase amplifiziert, ausgehend von sich an den 3'-Enden der Einzelstränge anlagernden komplementären Oligonukleotiden (Primer). Dabei ist theoretisch eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erreichbar. Die Reaktion besteht standardmäßig aus drei sich wiederholenden Temperaturstufen, wobei zusätzlich eine initiale Denaturierung und eine finale Elongation durchgeführt wurde. Die folgende Tabelle zeigt das eingesetzte Temperaturprofil:

	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95°C	1min
Denaturierung	95°C	1min
Anlagerung der Primer	54-70°C	1min
Elongation	72°C	1-2min/kb(Taq); 0,5min/kb(Pfu)
finale Elongation	72°C	12min

Die optimale Anlagerungstemperatur der Primer hängt von der Sequenz ab und muss experimentell bestimmt werden. Zur Orientierung kann sie mit der 2+4-Formel abgeschätzt werden. Dabei werden für jedes C oder G 4°C und für jedes A oder T 2°C addiert. Die PCR-Reaktionen wurden mit 20-30 Zyklen im folgenden Standardansatz durchgeführt:

50-100ng	DNA-Matrize (Plasmid)
0,5mmol/l	Primer sense
0,5mmol/l	Primer antisense
1x	10x Puffer
0,2mmol/l pro Nukleotid	dNTP
1,5-5mmol/l	MgCl <sub>2</sub>
5% (v/v)	DMSO
2,5U	Pfu- oder Taq-Polymerase
ad 50µl	Wasser

Die für die Herstellung der d-siRNA-Gemische amplifizierten PCR-Produkte wurden mit der Pfu-Polymerase generiert, alle anderen verwendeten PCR-Produkte mit der Taq-Polymerase.

### 2.14.6 Reverse Transkription PCR (RT-PCR)

Zur Amplifikation von mRNA muss diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, wozu Reverse Transkriptasen bzw. RNA-abhängige DNA-Polymerasen eingesetzt werden. Zur Reversen Transkription der gesamten Zell-mRNA wurden Gemische aus Zufalls-Hexamer-Primern verwendet. Die Gesamtreaktion aus Reverser Transkription und Amplifikation der cDNA durch PCR wird als RT-PCR bezeichnet.

Ein 25µl-Ansatz für eine RT-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Probenmix:	RT-Mix:
0,3-1µg Gesamt-RNA	1µl 5xRT-Puffer
3µl 5xRT-Puffer	1µl M-MLV Reverse Transkriptase
2µl DTT (0,1mol/l)	ad 25µl ddH <sub>2</sub> O
1µl dNTP-Mix (10mmol/l pro Nukleotid)	
1µl pd(N) <sub>6</sub> Zufalls-Hexamer (200ng/µl)	
6µl ddH <sub>2</sub> O	

Im ersten Schritt der Reversen Transkription erfolgte eine 15-minütige Denaturierung bei 65°C, gefolgt vom Abkühlen des Ansatzes auf Eis und Abzentrifugieren (13000rpm, 4°C, 1min). Nach dem Annealingschritt für 10min bei 25°C wurde dem Ansatz der RT-Mix zugefügt und 60min bei 37°C inkubiert. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert. Die nachfolgende PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

2-4µl	RT-Ansatz (je nach Gen)
0,5µl	dNTP-Mix (10mmol/l pro Nukleotid)
0,25µl	Primer <i>sense</i> (100µmol/l)
0,25µl	Primer <i>antisense</i> (100µmol/l)
2,5µl	10x PCR-Puffer
1µl	MgCl <sub>2</sub> (50mmol/l)
0,5µl	Taq-DNA-Polymerase
ad 25µl	ddH <sub>2</sub> O

Die PCR wurde nach dem unter 2.14.5 beschriebenen Temperaturprofil durchgeführt.

### 2.14.7 Real Time RT-PCR

Die Real Time RT-PCR ist eine Kombination aus der cDNA-Synthese einer herkömmlichen RT-PCR und der Real Time PCR-Technologie. Wie der Name impliziert ermöglicht diese eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Diese Methodik wurde zur relativen Quantifizierung der durch die unterschiedlichsten siRNA-Applikationen bewirkten potentiellen Veränderungen eingesetzt. Die Firma Applied Biosystems bietet vorgefertigte und validierte Anwendungen an, die sogenannten *TaqMan-Assays on Demand*<sup>™</sup>, mit denen sich ohne Optimierung quantitative Real Time PCRs durchführen lassen. Das Prinzip der *TaqMan-Assays* beruht auf dem Einsatz von herkömmlichen PCR-Reagenzien und einer zusätzlichen TaqMan-Sonde. Dies ist ein fluorogenes Oligonukleotid, dessen 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (meistens FAM (Fluorencin)) und 3'-Ende einen Quencher (TAMRA (Tetramethylrhodamine)) trägt. Zudem ist die Sonde mit einem Phosphatrest blockiert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden. Durch Anregung der Fluoreszenz (Wellenlänge 488nm), wird die des Reporterfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen

Fluoreszenzenergietransfer (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Primer und TaqMan-Sonde an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase verdrängt die Taq-Polymerase die Sonde, wodurch eine Y-förmige Sekundärstruktur entsteht und die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase aktiviert wird. Bei der folgenden Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe und damit auch der FRET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Der Zyklenzahl entsprechenden zunehmenden Amplifikation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem zusätzlichen Zyklus an. Gemessen wurden die Real Time PCR-Daten mit dem *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System*.

Die für die Real Time PCR eingesetzten cDNAs wurden, wie bei der herkömmlichen RT-PCR auch (vgl. Kapitel 2.14.6), durch Verwendung der Reversen Transkriptase von mRNA umgeschrieben. Für die oben genannte Fragestellung wurden für zwei unterschiedliche cDNA-Mengen Real Time PCR-Ansätze optimiert:

#### 12,5µl-Ansatz

0,3ng cDNA  
6,25µl 20x *TaqMan Master Mix*  
0,63µl 2x *TaqMan Assay on Demand*  
ad 12,5µl H<sub>2</sub>O

#### 25µl-Ansatz

25ng cDNA  
12,5µl 20x *TaqMan Master Mix*  
1,25µl 2x *TaqMan Assay on Demand*  
ad 25µl H<sub>2</sub>O

PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95°C	10min
Denaturierung	95°C	15s
Annealing/ Extension	60°C	1min

Je nach eingesetzter cDNA-Menge betrug die Anzahl der Zyklen zwischen 40 und 60. Die zu untersuchenden Proben wurden im 96-Loch-Maßstab als Doppelwerte pipettiert. Als Normierungskontrolle wurden in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimierte Gene wie  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ -Glucoronidase verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte als relative Quantifizierung nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf die eines nicht regulierten Haushaltsgens normalisiert. Dabei wird für jede Probe der  $C_t$ -Wert des Referenzgens vom  $C_t$ -Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen ( $\Delta C_t = C_t$  Zielgen -  $C_t$  Referenzgen). Mit Hilfe dieser  $\Delta C_t$ -Werte wurde der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle als Ratio in der Formel  $R = 2^{-\Delta C_t(\text{behandelt}) - \Delta C_t(\text{unbehandelt})}$  ausgedrückt.

Diese Berechnung geht von einer Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus aus, was jedoch nicht der Praxis entspricht. Daher ist es wichtig, dass die Steigungen der aufgenommenen Fluoreszenzintensitäts-Kurven vergleichbar waren.

#### **2.14.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Methode (Sanger et al., 1977). Die hier durchgeführte Variante stellt eine Kombination aus PCR und Sequenzierreaktion dar (*Taq-cycle-sequencing*), wobei der Ansatz zusätzlich zu den vier Desoxynukleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP die vier Didesoxynukleotide ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP

enthält, die jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Der Einbau eines Didesoxynukleotides blockiert das weitere Wachstum der Kette, weil ihm ein 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Auf diese Weise entstehen Fragmente verschiedener Länge. Statistisch erfolgen bei genügend langer Reaktionszeit Kettenabbrüche an jeder Position. Das Reaktionsgemisch wird schließlich elektrophoretisch aufgetrennt, wobei aus der Reihenfolge der Farben beim Verlassen des Gels auf die Sequenz der Probe geschlossen werden kann.

Zur Sequenzierung von DNA wurde folgender Ansatz vorbereitet und das aufgeführte PCR-Programm durchlaufen:

Sequenzierreaktion:

0,2–0,5µg dsDNA  
 5–9pmol Primer  
 4–12µl *Big Dye Premix*  
 ad 20µl HPLC-H<sub>2</sub>O  
 mit Mineralöl überschichten

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	30s
Anlagerung der Primer	45-51°C	15s
Extension	60°C	4min

Die Anzahl der Zyklen betrug 25.

Anschließend wurden 80µl ddH<sub>2</sub>O zugefügt und der gesamte Ansatz in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum Fällen der DNA wurden 10µl einer 3mol/l Natriumacetat-Lösung und 250µl 100% Ethanol hinzugegeben sowie die DNA abzentrifugiert (20–30min, 13000rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgenommen, die DNA mit 200µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10min, 13000rpm, Raumtemperatur). Das DNA-Pellet wurde schließlich bei 37°C vollständig getrocknet. Nach Zugabe von 25µl *Template Suppression Buffer* und einer guten Durchmischung erfolgte eine abschließende Denaturierung bei 95°C. Die Sequenzierung erfolgte durch den *ABI Prism 310 Genetic Analyzer*.

#### 2.14.9 Herstellung eines eukaryotischen sh(*short hairpin*)RNA-Expressionsplasmids

Durch Verwendung von shRNA-Expressionsplasmiden, wie z.B. pSUPER, wird eine intrazelluläre Synthese von shRNAs möglich gemacht. Dafür werden shRNA-Matrizen in RNA-Polymerase III-Transkriptionseinheiten kloniert, die meistens für U6 *small nuclear RNA* oder RNase P RNA H1 kodieren. Die genaue Klonierungsstrategie bei der Herstellung dieses Plasmids ist dem Ergebnisteil zu entnehmen.

##### 2.14.9.1 Annealing der Oligonukleotide (shRNA-Matrizen)

Zur Generation der dsOligonukleotide wurden jeweils 1mmol/l der ssOligonukleotide hTAB1 hp *forward* und hTAB1 hp *reverse* zusammen mit Annealing-Puffer (Reaktionspuffer A Komplex der T4 PNK) in einer 50µl-Reaktion 5min bei 95°C und 10min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Phosphorylierung der TAB1 dsOligonukleotide wurden 2µl dsOligonukleotid, 1µl T4 PNK, 1µl Reaktionspuffer, 1µl 1mmol/l ATP und 5µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und für 30min bei 37°C sowie anschließend 10min bei 70°C inkubiert.

### 2.14.9.2 Klonierung von pSUPER-TAB1

Der Vektor pSUPER wurde zur Vorbereitung der Klonierung zunächst mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Bgl* II verdaut, um überhängende Enden zu erzeugen. Im 50µl-Maßstab wurde 1µg pSUPER in Gegenwart von 5µl Reaktionspuffer R<sup>+</sup>, 10U *Hind* III und 43µl ddH<sub>2</sub>O 1h bei 37°C verdaut. Es folgte der Restriktionsverdau mit 10U *Bgl* II für 2h bei 37°C und die Hitzeinaktivierung bei 65°C (20min). Um während der Ligation eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde der Zielvektor vor der Ligation an den 5'-Enden mit einer Phosphatase (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Dafür wurde dem Restriktionsverdau-Ansatz am Ende der Inkubation 1µl CIAP (1U/µl) zugesetzt und dieser für weitere 30min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde bei 85°C 15min inaktiviert.

Da die Erkennungssequenzen der beiden verwendeten Restriktionsendonukleasen direkt aufeinander folgten, konnte hier trotz Einsatz von zwei Enzymen der Vektor von dem kleinen DNA-Fragment über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Kapitel 2.14.2.1) separiert werden. Mit einer Agarosegelelektrophorese wurde überprüft, dass die Verdaue quantitativ waren.

Für die Ligation der dsOligos in den linearisierten Vektor pSUPER wurden 2µl dsOligo, 1µl linearisierter und dephosphorylierter Vektor, 1µl Ligasepuffer, 1µl T4 DNA Ligase (5U/µl) und 5µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde parallel eine Ligation ohne Zugabe des zu insertierenden DNA-Fragmentes angesetzt. Die Ligationsreaktion wurde, wie im Folgenden beschrieben, in chemisch kompetente TOP10 Bakterien transformiert: Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 5-10µl des Ligationsansatzes gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, während der sich die DNA an die Bakterienmembran anlagert, wurden die Zellen für 45s einem 42°C-Hitzeschock ausgesetzt und danach für 5min wieder auf Eis inkubiert. Schließlich wurden 800µl LB-Medium/ 200µl Bakteriensuspension zugefügt und diese Vorkultur für 1h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion von Einzelklonen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die DNA der gepickten Klone wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau mit *EcoR* I und *Hind* III vorselektiert. Dabei wurden 10µl DNA einer Minipräparation mit je 3U Restriktionsenzym für 2h bei 37°C inkubiert und das Fragmentmuster mit Hilfe eines analytischen Agarosegels beurteilt. Bevor die Plasmide in eine Transfektion eingesetzt wurden, wurde die Sequenz mittels Sequenzierung (Kapitel 2.14.8) überprüft.

### 2.14.10 Herstellung von d-siRNAs mit dem *Dicer siRNA Generation Kit* (Pepqlab)

Mit Hilfe des *Dicer siRNA Generation Kits* lassen sich *in vitro*-Gemische von d-siRNA-Molekülen gegen Ziel-mRNAs generieren. Zur Herstellung des d-siRNA-Gemisches wurde die cDNA des Zielproteins als Ausgangsmaterial verwendet und mit Hilfe des rekombinanten RNase III-Enzyms Dicer in 19-21-mer siRNAs (d-siRNAs) verdaut. Durch dieses Verfahren wurden d-siRNA-Gemische gegen TAB1, TAK1 und Luziferase erzeugt. Der Mechanismus zur Herstellung ist im Ergebnisteil zu finden.

#### 2.14.10.1 Klonierung der DNA-Matrizen für TAK1 und Luziferase

Als DNA-Matrize für TAB1 diente das in der Arbeitsgruppe Kracht vorhandene Plasmid pEGFP-hTAB1. Für TAK1 und Luziferase wurde der Vektor pCR-Blunt II TOPO hTAK1<sub>125-868</sub> bzw. pCR-Blunt II TOPO Luziferase<sub>392-1046</sub> kloniert. Für die Generierung des TAK1-Vektors wurde eine RT-PCR, wie sie unter 2.14.6 beschrieben ist, mit humaner RNA aus HeLa tTA-Zellen durchgeführt. Zur Amplifikation der TAK1 cDNA wurden 2µl der generierten cDNA mit TAK1-spezifischen Primern (hTAK1d-siRNA se, hTAK1d-siRNA as), Pfu-Polymerase, dNTP-Mix, DMSO und PCR-Puffer in einem 25µl-Ansatz gemischt und nach Standard-PCR Protokoll mit einer Annealingtemperatur von 54°C amplifiziert. Zur Herstellung des Luziferase-Plasmids wurde als Matrize der Vektor pGL2 Control verwendet. Eine Amplifikation des PCR-Produktes vom Plasmid pGL2 Control war problematisch (schlechte Ausbeute), so dass der entsprechende DNA-Abschnitt mit spezifischen Primern (Luziferase d-siRNA se, Luziferase d-siRNA as) in den Vektor pCR-Blunt II TOPO kloniert wurde. Um eine Kontamination der PCR mit der Matrize zu verhindern, wurde das PCR-Produkt vor der Klonierung über ein Agarosegel aufgereinigt.

Die Klonierung erfolgte mit dem *Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit*. Der Vektor pCR<sup>®</sup>II-Blunt wird dabei in geöffneter Form geliefert, wobei die Enden kovalent mit dem Enzym Topoisomerase I besetzt sind. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass das PCR-Produkt ohne vorherige Behandlung mit Restriktionsenzymen ligiert werden kann, da die Ligation nach Mischung des PCR-Produktes und des Vektors spontan innerhalb von Minuten durch Abspaltung der Topoisomerase I stattfindet.

Um ein angemessenes Verhältnis zwischen Vektor und Insert zu gewährleisten, wurde 0,5-2µl frisches PCR-Produkt mit 1µl Salzlösung gemischt und mit sterilem Wasser auf 5µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1µl Vektor wurde der Ansatz für 30min bei Raumtemperatur inkubiert, auf Eis transferiert und direkt für die weitere Transformation eingesetzt. Diese erfolgte in chemisch kompetenten One Shot<sup>®</sup> TOP10 Zellen nach Herstellerangaben. Zur Selektion wurde der gesamte Transformationsansatz über Nacht auf kanamycinhaltigen Platten ausgebracht und bei 37°C inkubiert.

Die Sequenz des Plasmids wurde durch Sequenzierung (Kapitel 2.14.8) überprüft. Vorher wurde jedoch zur Verifizierung des korrekten Einbaus des DNA-Fragmentes in das Plasmid zuerst ein analytischer Restriktionsverdau mit 3U *EcoR* I und 10µl Plasmid-DNA einer Minipräparation für 2h bei 37°C (siehe auch 2.14.9.2) durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte anhand des entstandenen Fragmentmusters in einem analytischen Agarosegel.

#### 2.14.10.2 Herstellung der DNA-Matrize für die Transkription

Die DNA-Amplifikation von TAB1, TAK1 und Luziferase erfolgte nach Standardprotokoll mit einer Annealingtemperatur von 54°C durch PCR mit den DNA-Matrizen pEGFP-hTAB1, pCR-Blunt II TOPO hTAK1<sub>125-868</sub> und pCR-Blunt II TOPO Luziferase<sub>392-1046</sub> und spezifischen T7-Promotorsequenz-Primern (hTAK1d-siRNA se, hTAK1d-siRNA as, hTAB1d-siRNA se, hTAB1d-siRNA as, Luziferase d-siRNA se, Luziferase d-siRNA as) in einem 100µl-Ansatz. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte durch Ethanolpräzipitation wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel sichtbar gemacht.

### 2.14.10.3 Herstellung und Aufreinigung von dsRNA

Die T7 Transkription wurde im 20µl-Maßstab angesetzt und bestand aus folgenden Komponenten:

1µg PCR-Produkt  
2µl 10x T7 Reaktionspuffer  
2µl T7 Enzymmix  
8µl dNTP Mix  
ad 20µl nukleasefreies Wasser

Dieser Ansatz inkubierte für 4h bei 37°C, bevor die DNA-Matrize durch 1µl DNase I für 15min bei 37°C verdaut wurde. Die Aufreinigung der dsRNA erfolgt durch eine Lithiumchlorid-Präzipitation. Die dsRNA wurde auf einem nativen PAA-Gel und durch eine Agilentanalyse überprüft.

### 2.14.10.4 Herstellung und Aufreinigung von d-siRNA

Zur Herstellung der d-siRNAs wurden pro 10µl-Reaktion 1µg dsRNA und 1U rekombinantes Dicer-Enzyme mit ATP, MgCl<sub>2</sub> und Dicer-Reaktionspuffer gemischt und dieser Ansatz für 18h bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 2µl Dicer-Stopplösung zugegeben. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben über zwei RNA-Aufreinigungssäulchen. Durch das RNA-Aufreinigungssäulchen 1 wurden Salze und freie Nukleotide aus der Dicer-vermittelten Reaktion abgetrennt, während das RNA-Aufreinigungssäulchen 2 unverdaute dsRNA von siRNAs separierte (Ausschlussgröße unbekannt). Die Konzentration der d-siRNA-Präparationen wurde photometrisch bestimmt. Um potentielle Kontaminationen durch lange dsRNA zu detektieren, wurden Agilentanalysen und nichtdenaturierende PAA-Gele durchgeführt.

### 2.14.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Da die ChIP-Experimente nicht selber durchgeführt wurden, sei auf die ausführliche Beschreibung des Experimentes in Hoffmann et al. verwiesen (Hoffmann et al., 2005).

## 2.15 Bakterienkulturen

Alle verwendeten Bakterienstämme leiten sich von dem Sicherheitsstamm *E.coli* K12 ab. Die Aufzucht der Bakterien erfolgte in Flüssigkulturen mit LB-Medium bei 37°C und 200rpm in einem Schüttelinkubator. Antibiotika wurden entsprechend den plasmidkodierten Resistenzen zugesetzt. Ampicillin wurde mit einer finalen Konzentration von 100µg/ml und Kanamycin mit einer finalen Konzentration von 50µg/ml verwendet. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme TOP10 und XL1Blue verwendet.

### 2.15.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Flüssigkultur (5ml LB-Medium) des entsprechenden Leerstammes angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine größere Flüssigkultur angesetzt (50-150ml LB-Medium) und so lange inkubiert, bis eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 erreicht war. Die

Zellen wurden pelletiert (4°C, 3000rpm, 10min) und in 1/10 Volumen TSS (*transformation and storage solution*) bei 4°C resuspendiert. Die Suspension wurde in 200µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.15.2 Dauerkulturen von Bakterien

Die Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen erfolgte bei -80°C als Glycerin-Dauerkultur. Dafür wurden die Kulturen mit 15% Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

## 2.16 Array-Techniken

Durch die Entwicklung der Array-Technologie ist die parallele Erfassung von Veränderungen im Expressionsmuster für eine große Anzahl an Genen oder Proteinen möglich geworden. Die Methodik basiert auf der Hybridisierung von den in einem geordneten Raster (*array*) auf einem Träger immobilisierten Sonden (*spots*) mit einem spezifischen Zielmolekül in der zu untersuchenden Probe. Um eine Quantifizierung der Zielmoleküle durchführen zu können, müssen die Proben mit signalgebenden Molekülen markiert werden. In den hier verwendeten Array-Experimenten wurden je nach Fragestellung DNA-Oligonukleotide oder Antikörper als Sonden eingesetzt.

### 2.16.1 Protokoll für DNA-Microarray-Einkanalexperimente

In vorliegender Arbeit wurden Transkriptionsuntersuchungen mit Hilfe der MWG Inflammatory Arrays und des in Kooperation mit MWG Biotech entwickelten Transkriptionsfaktorarrays durchgeführt. Zur Detektion differentiell exprimierter Gene in unterschiedlichen mRNA-Populationen wurde fluoreszenzmarkierte cRNA durch Reverse Transkription von totaler RNA (Kapitel 2.14.1.2) hergestellt. Die Qualitätskontrolle der für die Arrays verwendeten RNAs und cRNAs erfolgte durch den RNA 6000 LabChip® *Kit* (Kapitel 2.14.3.3). Es wurden zwei Systeme zur Herstellung der markierten cRNA eingesetzt. Im Vergleich zu dem System von Roche (cDNA Synthesis System, Kapitel 2.16.1.1) reichen beim *Amino Allyl Message™ aRNA Amplification Kit* der Firma Ambion (Kapitel 2.16.1.2) sehr viel geringere Ausgangsmengen an RNA aus.

#### 2.16.1.1 cDNA-Synthese mit dem Roche-System

Für einen 10µl-cDNA Syntheseansatz wurden 5µg Gesamt-RNA, 1µg Oligo[(dT)<sub>24</sub>-T7promotor]<sub>65</sub>-Primer mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 5,25µl gebracht. Die RNA wurde 10min bei 70°C im Thermocycler denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zum obigen Ansatz wurde eine Lösung, bestehend aus 2µl 5x RT-Puffer, 1µl 0,1 M DTT, 1µl dNTP-Mix (10mmol/l pro Nukleotid), 6,25U RNase-Inhibitor und 12,5U AMV Reverse Transkriptase pipettiert und gründlich gemischt. Diese Reaktion wurde 60min bei 42°C im Thermocycler inkubiert, auf Eis abgekühlt und direkt in die Zweitstrang-Synthese eingesetzt. Für diese wurden 7,5µl 5x Zweitstrang-Puffer, 0,36µl dNTP-Mix (10mmol/l pro Nukleotid), 1,63µl Zweitstrang-Enzymmix und 6µl DEPC-Wasser gemischt, zu der Erststrang-Synthese pipettiert und gründlich gemischt. Dieser Ansatz inkubierte für 2h bei 16°C und kühlte



anschließend auf Eis ab. Nachdem 10U T4 DNA-Polymerase zur Reaktion zugefügt wurden, erfolgte eine weitere Inkubation für 5min bei 16°C im Thermocycler. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4,25µl 0,2mol/l EDTA, pH 8,0 gestoppt. Es folgten zwei 30-minütige Inkubationen bei 37°C mit einerseits 7,5U RNase I und andererseits 1,5U Proteinase K.

### **Synthese und Markierung der cRNA mit dem Roche-System**

Für die cRNA-Synthese wurden 100ng aufgereinigte und eingedampfte dsDNA mit folgenden Reagenzien aus dem *MEGAscript T7 Kit* der Firma Ambion gemischt: 1µl 10x Reaktionspuffer, 1µl Enzymmix (inklusive T7 RNA-Polymerase), 6µl ATP/CTP/GTP-Lösung (je 25mmol/l), 1µl U-Nukleotid-Lösung (50mmol/l), 5µl Cy3-UTP (5mmol/l) und 2µl nuklease-freies Wasser. Dieser Ansatz wurde für 16h bei 37°C im Klimaschrank inkubiert. 6,5-10µg der aufgereinigten cRNA wurden mit Wasser auf 54µl Gesamtvolumen gebracht. Nach Zugabe von 6µl 10x Fragmentierungspuffer wurde der Ansatz für 15min bei 94°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach Verdünnung des Ansatzes mit 100µl Wasser wurde dieser mit Hilfe von *Microcon concentrators* aufkonzentriert. Dafür wurde die Lösung 17min bei 9000rpm zentrifugiert, der Konzentrator umgedreht und die aufkonzentrierte cRNA 3min bei 2500rpm von der Säule eluiert.

### **Aufreinigung der dsDNA und cRNA mit dem Roche-System**

Die synthetisierte dsDNA wurde mit Hilfe des *High Pure RNA Tissue Kit* der Firma Roche nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dabei wurde die dsDNA in ethanol- und β-mercaptoethanolhaltigem Bindepuffer auf die Säule aufgetragen und diese mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen. Die aufgereinigte cDNA wurde in 34µl Elutionspuffer B eluiert.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach oben angegebenen Protokoll mit dem Unterschied, dass die cRNA in einem geringer konzentrierten Bindepuffer ohne β-Mercaptoethanol auf die Säule aufgetragen und mit 40µl Elutionspuffer A eluiert wurde.

#### **2.16.1.2 cDNA-Synthese mit dem Ambion-System**

Für die Erststrangsynthese wurden 500ng RNA zusammen mit 0,5µl von T7 Oligo(dT) Primern (keine Konzentrationsangabe) mit Wasser auf ein Volumen von 6µl gebracht und 10min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden zu diesem Ansatz 4µl eines *Reverse Transcription Master Mix* pipettiert, der aus 1µl 10x *First Strand Buffer*, 2µl dNTP Mix, 0,5µl RNase Inhibitor und 0,5µl *ArrayScript* bestand. Die Reaktion inkubierte 2h bei 42°C.

Für die Zweitstrangsynthese wurde der Ansatz mit 40µl eines *Second Strand Master Mix* (31,5µl nukleasefreies Wasser, 5µl 10x *Second Strand Buffer*, 2µl dNTP Mix, 1µl DNA-Polymerase und 0,5µl RNase H) versehen und 2h bei 16°C im Thermocycler inkubiert.

### **Synthese und Markierung der aRNA mit dem Ambion-System**

Die Synthese von aRNA (herkömmlich als cRNA bekannt) erfolgte in einer *in vitro*-Transkription über Nacht bei 37°C mit der dsDNA als Matrize und dem IVT Master Mix aus 1,5µl aa(aminoallyl)UTP (50 mmol/l), 6µl ATP-, CTP-, GTP-Mix (25 mmol/l), 1,5µl UTP

Lösung (50 mmol/l), 2µl T7 10x Reaktionspuffer und 2µl T7 Enzyme-Mix. Die Reaktion wurde mit 30µl nukleasefreiem Wasser abgestoppt.

5–20µg eingedampfte aRNA wurden in 4,5µl *Coupling Buffer* aufgenommen und mit 5,5µl Cy3 in DMSO für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 2,75µl Hydroxylamin (4mol/l) und weiterer 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde dem Reaktionsgemisch 2,75µl nukleasefreies Wasser zugegeben.

### **Aufreinigung der dsDNA, aRNA und markierter aRNA mit dem Ambion-System**

Die Aufreinigung der synthetisierten dsDNA oder aRNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Nukleinsäuren wurden in einem Bindepuffer auf Säulen aufgetragen und diese mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen. Die Elution der aufgereinigten cDNA oder aRNA erfolgte in nukleasefreiem Wasser.

#### **2.16.1.3 Hybridisierung der Microarrays**

Die cRNA oder aRNA wurde unter Vakuum bis auf ungefähr 3µl eingedampft und mit 100µl Hybridisierungspuffer versehen. Anschließend wurde der Ansatz für 3min bei 94°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Arrays wurden mit einem beidseitig klebenden Rahmen beklebt, die zu hybridisierende Probe aufgetragen und mit einem Abdeckplättchen blasenfrei abgedichtet. Die Hybridisierung fand in einer Hybridisierungskammer unter Schütteln für 16h bei 42°C im Wasserbad statt. Das Deckplättchen und der Rahmen wurden unter Waschlösung 1 entfernt und der Objektträger jeweils für 5min in einem Färbegestell in Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1% SDS), Waschlösung 2 (1x SSC) und Waschlösung 3 (0,5x SSC) geschwenkt. Die zum Waschen verwendete Pufferreihe mit absteigender Konzentration an SSC wurde vor Gebrauch auf 30°C erwärmt. Vor der Trocknung des Arrays durch zweiminütige Zentrifugation bei 1700rpm wurde er mit Waschlösung 3 nochmals abgespült.

#### **2.16.1.4 Analyse und Auswertung der Microarray-Untersuchung**

Zur Messung der hybridisierten Cy3-markierten Probe auf dem Array wurde der konfokale Laser-Scanner *Affymetrix Array scanner 428* verwendet, wobei der Cy3-Farbstoff bei 543nm angeregt und die Emission bei 570nm gemessen wurde. Jeder Array wurde sechsmal bei maximaler Auflösung mit absteigender Photomultiplerverstärkung eingelesen, um den dynamischen Bereich der Messung aufzuspreizen. Die zwei schwächsten *scans* sollten an keiner Stelle Sättigung aufweisen. Bei der höchsten Einstellung sollte auch der schwächste *spot* sichtbar sein. Es resultierten 16 bit TIF-Abbildungen, deren Hybridisierungssignale mit der *ImageJ 4.0* Software quantifiziert werden konnten. Dabei wurden für jeden *spot* Signal- und Hintergrundintensität bestimmt. Die Signalintensitäten der *spots* der einzelnen *scans* wurden in einen Wert zwischen 0 und 65535 übersetzt. Die weitere Datenauswertung erfolgte mit MAVI, einem Programm, das alle Daten der verschiedenen *scans* für jeden *spot* zu einem einzigen Wert zusammenfasst. Die Software erhöht den dynamischen Bereich, zudem werden Sättigungsprobleme vermieden. Möglich ist dies durch lineare Regression der Intensitätsdaten der *scans* von drei unterschiedlichen Photomultiplerverstärkerintensitäten. Weiterhin kann mit Hilfe von MAVI eine Normalisierung der einzelnen Arrays über die

Durchschnittsintensität des Arrays oder über die Auswahl der Haushaltsgene kalkuliert werden. Die normalisierten Daten werden als IPC-Werte bezeichnet.

Die aus der MAVI-Analyse für jeden Array resultierenden Ergebnisdateien wurden zusammen mit der Genbeschreibung in Microsoft Excel importiert. Mit Hilfe von Excel Makros, die von Dipl. Biol. Axel Weber und Dr. Oliver Dittrich-Breiholz entwickelt wurden (vgl. CytoBase, Kapitel 2.13), konnte die nachfolgende Auswertung, zu der z.B. die Filterung und sinnvolle Aufarbeitung von Daten gehörte, zum Teil rationalisiert durchgeführt werden.

Die Intensitätswerte von *spot* und von Replikat wurden drei Filterkriterien unterzogen, sobald die Intensitäten der beiden *spots* für ein Gen eine über 1,5-fache Differenz aufwiesen. Im anderen Fall wurde der Mittelwert aus *spot* und Replikat in die Auswertung eingesetzt.

Die Filterung war darauf ausgelegt, den *spot* zu identifizieren, der die „echte“ Intensität liefert, um diesen für die Analyse der Genexpressionsveränderungen zu verwenden. Im ersten Schritt wurde die Gleichmäßigkeit der beiden *spots* für ein Gen verglichen. Dafür wurde die Standardabweichung der Signalwerte der Pixel in jeweils beiden *spots* bestimmt und ins Verhältnis zueinander gesetzt. War diese Ratio mindestens zwei, so wurde der *spot* mit der geringeren Standardabweichung verwendet. Das zweite Kriterium bezog sich auf den Hintergrund der Signale. Wenn die Differenz zwischen den Mittelwerten (*mean*) des Hintergrundes von *spot* und Replikat den Faktor 1,3 überschritt, wurde der *spot* mit dem höheren Wert für den Hintergrund herausgefiltert. Der dritte Parameter gleicht eine Schwachstelle des eingesetzten MAVI-Programms aus und greift nur bei *spots* mit Intensitäten größer 10000. Die *spot*-Intensitäten nehmen mit ansteigenden Photomultiplerverstärkungen linear zu, was sich durch eine gleiche Steigung zwischen den Messwerten der unterschiedlichen *scans* ausdrückt. Im hohen Intensitätsbereich nimmt die Linearität der Signale ab und MAVI berechnet durch eine lineare Regression einen neuen Wert für das Signal. Für die durchgeführten Untersuchungen ist eine zu große Toleranz, ab der eine lineare Regression durchgeführt wird, im MAVI-Algorithmus implementiert worden. Aus diesem Grund wurde die Differenz zwischen der Steigung von *spot* und Replikat bei hohen Intensitäten gebildet. War diese größer als 0,015, so wurde der *spot* mit der größeren Steigung in die Auswertung miteinbezogen. Von den aufbereiteten Daten wurden die Gensonden in eine weitere Auswertung eingesetzt, die Intensitäten mit Werten über 100 in jedem Array des Experimentes aufwiesen. Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Ratios gebildet und in einer geeigneten Form, z.B. als Heatmap mit Hilfe von Mayday, als Balkengraph durch Sigmaplot oder in einer Tabelle, dargestellt.

### **2.16.2 Protokoll für den RayBio® Human Cytokine Antibody Array VI und VII**

Eingesetzt wurden die RayBio® Human Cytokine Antibody Arrays VI und VII zur Untersuchung von Veränderungen im Sekretionsprofil von Zytokinen. Dafür wurde der Überstand von behandelten und stimulierten KB-Zellen verwendet. Das Prinzip dieser Proteinarray-Technologie basiert auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Es befinden sich auf jeder der Array-Membranen VI und VII *spots* mit spezifischen Antikörper für 60 unterschiedliche Zytokine (Antigene). Die Zytokine aus der Probe werden von den auf der Trägermembran aufgebracht Antikörper gebunden. Durch Bindung des zweiten

Antikörpers, der mit Biotin konjugiert ist, an das jeweils spezifische Zytokin entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Das Biotin wird über ein HRP (*horseradish peroxidase*)-markiertes Streptavidin erkannt, so dass sich die Zytokinkonzentration in der Probe anhand eines ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Signals auf einem Röntgenfilm detektieren lässt.

Das Experiment wurde unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien durchgeführt. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter leichtem Schütteln der Membranen.

Vor Inkubation der Array-Membranen mit 1,2ml Überstand für 2h bei Raumtemperatur wurden unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen durch eine 30-minütige Inkubation in 1x Blockpuffer abgesättigt. Anschließend wurden die Membranen dreimal je 5min mit 2ml Waschpuffer I und zweimal je 5min mit 2ml Waschpuffer II gewaschen. Es folgte die Inkubation der Array-Membranen mit in Blockpuffer verdünnten biotinkonjugierten  $\alpha$ -Zytokin Antikörpergemisch für 2h und nach oben beschriebenem Waschvorgang eine Über-Nacht-Inkubation mit in Blockpuffer verdünnten HRP-konjugiertem Streptavidin bei 4°C. Am Folgetag wurden die Membranen erneut gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz, entstanden durch die Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem Detektionspuffer. Dafür wurden pro Membran 250 $\mu$ l 1x Detektionspuffer C and 250 $\mu$ l 1x Detektionspuffer D gemischt und die Signale der Membran nach Inkubation des Detektionsreagenzes auf einem Film sichtbar gemacht.

## 2.17 Zellkultur-Techniken

### 2.17.1 Zelllinien

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden folgende Zelllinien kultiviert:

- humane epitheloide Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa tTA (exprimieren konstitutiv einen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (tTA) (Gossen and Bujard, 1992))
- humane epitheloide Zervixkarzinom-Zelllinie KB

Die Kultivierung sämtlicher Zellkulturen erfolgte in DMEM mit 10% (v/v) FKS (fötale Kälberserum), 100 $\mu$ g/ml Streptomycin, 100U/ml Penicillin und 2mmol/l L-Glutamin im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Passage der adhärenen Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage, sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten. Dazu wurde das Medium dekantiert, die Zellen abgeschlagen oder abgeschabt und resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt.

### 2.17.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer, indem die Zellsuspension 1+1 mit Trypanblau (0,8% (v/v) in PBS) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage Trypanblau aktiv auszuscheiden, während tote oder geschädigte Zellen dies nicht mehr vermögen und blau angefärbt werden. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurden vier Großquadrate ausgezählt. Für die Bestimmung der Zellzahl gilt die Formel: Zellzahl/ ml = ausgezählte Zellen/ Anzahl der Großquadrate x 2 x 10<sup>4</sup>

### 2.17.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die mit Medium abgelösten Zellen bei 1000rpm für 5min bei Raumtemperatur sedimentiert, in 1ml kaltem Einfriermedium (DMEM mit 2mmol/l L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 40% FKS und 10% DMSO) resuspendiert und in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend über Nacht in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol befüllten Nalgene *Cryo Freezing Container* in einen -80°C Tiefkühlschrank gestellt und zur längeren Lagerung in einem Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurde aus dem Dewargefäß ein Kryoröhrchen entnommen, schnell aufgetaut und in 10ml Medium überführt. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert (5min, 1000rpm, Raumtemperatur), in frischem Medium mit 20% FKS resuspendiert und auf die gewünschte Kulturflasche ausgesät.

### 2.17.4 Transfektion von Säugerzellen

Unter Transfektion wird das Einführen von Fremd-DNA in eine Eukaryotenzelle verstanden. Meist ist es das Ziel, ein oder mehrere Gene der neu aufgenommenen DNA zu exprimieren und zu charakterisieren. Es gibt verschiedene Techniken, um eukaryotische Zellen zu transfizieren z.B. die Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode, die Elektroporation, das Einsetzen viraler Vektoren oder die Verwendung kationischer Liposomen. Die Transfektionseffizienz ist von einer Vielzahl verschiedener Parameter, wie z.B. den verwendeten Zellen, der angewandten Methode oder der Größe und Qualität der zu transfizierenden DNA, abhängig.

Bei der stabilen Transfektion wird die eingeführte DNA dauerhaft in das Genom der Zelle eingebaut, während dies bei transienten Transfektionen nicht geschieht. Hier verlieren die Zellen die Fremd-DNA nach mehreren Tagen der Kultivierung wieder. Die Selektion auf stabile Integration erfolgt in der Regel über ein Resistenzgen.

#### 2.17.4.1 Transiente Transfektion von Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode

Diese Methode macht sich die schwere Löslichkeit des Salzes Kalziumphosphat zunutze. Die Ausbildung von Kalziumphosphat-DNA-Komplexen wird dabei durch langsames Mischen einer HEPES-gepufferten Salzlösung mit einer Lösung aus Kalziumchlorid und DNA initiiert. Die Präzipitate lagern sich anschließend auf der Oberfläche der Zellen ab und werden von den Zellen aufgenommen.

Die folgenden Angaben gelten für jeweils ein Loch einer 6-Lochplatte. Erfolgte die Transfektion der Zellen in anderen Kulturgefäßen, wurden die Volumina der Kulturfläche angepasst.

Am Vortag der Transfektion wurden je nach Zelltyp und Kultivierungsdauer pro Loch  $2-4 \times 10^5$  Zellen in 2ml Medium ausgesät. Für jedes Loch wurden 225µl 2xHeBS, 250µl H<sub>2</sub>O und die gewünschte Menge DNA gemischt, die Bildung der Präzipitate erfolgte durch vorsichtige Zugabe von 31,5µl einer kalten 2mol/l CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Die Suspension wurde auf die Zellen pipettiert und diese dann für mindestens 4h im Brutschrank inkubiert. Zum Entfernen der

Präzipitate wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2ml frischem Medium versehen und für weitere 24-48h kultiviert. Vor dem Waschschrift wurden die Zellen für drei Minuten mit Schockmedium (10% Glycerin in DMEM-Medium) behandelt.

#### 2.17.4.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA-Molekülen zur Herstellung genspezifischer *knock downs*

siRNA- und d-siRNA-Moleküle wurden mit speziell für kleine RNA-Moleküle geeigneten liposomalen Transfektionsreagenzien transfiziert.

Die Zellen wurden abhängig von der zu hemmenden RNA ein bis zwei Tage vorher in 24-Lochplatten in einer Konzentration von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Loch oder in 6-Lochplatten in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Loch mit FKS (10%(v/v))-haltigem DMEM ausgesät.

Die siRNAs gegen c-JUN, JUNB, JUND, cFOS, FRA-1, IL-8, IL-6, GFP und Luziferase wurden in Konzentrationen von 50-200nmol/l per Loch in einem Gesamtvolumen von 500 $\mu$ l bei 24-Lochansätzen und von 1ml bei 6-Lochansätzen transfiziert. Die Transfektion von 620ng d-siRNAs erfolgte in 24-Lochplatten in einem Gesamtvolumen von 500 $\mu$ l, so dass sich eine finale d-siRNA-Konzentration von 88nmol/l per Loch ergab. d-siRNAs wurden nur mit *GeneSilencer*<sup>®</sup> *siRNA Transfection Reagent* transfiziert.

#### Transfektion von siRNA-Molekülen mit *GeneSilencer*<sup>®</sup> *siRNA Transfection Reagent*

Für die Transfektion des kationischen Lipidreagenzes *GeneSilencer*<sup>®</sup> *siRNA Transfection Reagent* der Firma Peqlab wurden die Zellen am Versuchstag zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Pro 24-Loch wurden die in der Tabelle angegebenen Lösungen A und B einzeln zusammenpipettiert, wobei Lösung B gut gemischt 5min bei Raumtemperatur inkubierte. Anschließend wurde Lösung B zu Lösung A gegeben und zur Komplexbildung für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplexlösung aus Transfektionsreagenz und siRNA-Molekülen wurde auf die Zellen gegeben und diese im Brutschrank kultiviert. Nach 4h wurde den transfizierten Zellen 500 $\mu$ l 20%-serumhaltiges Medium zugesetzt. Die Zellen wurden nach 24-48h mit den gewünschten Stimuli behandelt oder unbehandelt gelassen und geerntet.

Für die 6-Lochplatten wurde die beschriebene Prozedur mit den in der folgenden Tabelle angegebenen Mengen für Löcher einer 6-Lochplatte durchgeführt. Bei kotransfizierten Plasmiden wurden diese mit den siRNAs zusammen zu Lösung B gegeben.

	pro 24-Loch		pro 6-Loch	
	<i>Lösung A</i>	<i>Lösung B</i>	<i>Lösung A</i>	<i>Lösung B</i>
<i>GeneSilencer</i> <sup>®</sup> <i>siRNA Transfection Reagent</i>	3,5 $\mu$ l		5 $\mu$ l	
serumfreies Medium	25 $\mu$ l	15 $\mu$ l	25 $\mu$ l	15 $\mu$ l
<i>siRNA Diluent</i>		10 $\mu$ l		25 $\mu$ l
siRNA		x $\mu$ l		x $\mu$ l

#### Transfektion von siRNA-Molekülen mit *jetSI*<sup>®</sup>-*ENDO*

Das Transfektionsreagenz *jetSI<sup>®</sup>-ENDO* der Firma polyplus-transfection vermittelt die Endozytose der siRNA-Moleküle durch positiv geladene Partikel.

Am Tag der Transfektion wurde *jetSI<sup>®</sup>-ENDO* in serumfreiem Medium verdünnt, kräftig gevortext und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde ein bestimmtes Volumen an siRNA-Lösung in DMEM ohne FKS mit einem finalen Volumen von 100µl pipettiert. Diese Lösung B wurde vorsichtig gevortext. Lösung A wurde entsprechend der untenstehenden Tabelle zusammenpipettiert. Direkt nach Zugabe der Lösung A zu Lösung B wurde der Ansatz 10s lang gevortext und im Anschluss 30min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und mit 800µl DMEM ohne Zusätze/ 6-Loch versehen. Die Komplexlösung wurde zu den Zellen gegeben, welche in der Folge für mindestens 4h im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurde 1ml DMEM mit der zweifachen Serum-Konzentration (20%(v/v))/ 6-Loch hinzupipettiert und die Zellen für die gewünschte Zeit weiterkultiviert.

Das Transfektionsreagenz *jetSI<sup>®</sup>-ENDO* wurde nur für Transfektionen im 6-Loch-Maßstab eingesetzt. Die verwendeten Mengen sind der Tabelle zu entnehmen.

	pro 6-Loch	
	Lösung A	Lösung B
<i>jetSI<sup>®</sup>-ENDO</i>	8µl	
serumfreies Medium	92µl	100µl-x
siRNA		xµl

#### 2.17.4.3 Herstellung eines stabilen Transfektanten-Zellpools

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie HeLa tTA stabil mit 5µg der Plasmide pSUPER und pSUPER-TAB1 in 6-Lochplatten nach der Kalziumphosphatmethode transfiziert. Das Puromycin-Plasmid pBSPACΔP wurde zu jedem Ansatz in der Menge von 1µg kotransfiziert. Nach 48h wurden die Zellen aus drei Löchern vereinigt und in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Die Selektion wurde mit dem Antibiotikum Puromycin (0,75µg/ml, Calbiochem), dessen Resistenzgen auf dem pBSPACΔP-Plasmid liegt, durchgeführt. Bei Erreichen konfluenten Zellrasen erfolgte eine Teilung.

#### 2.17.5 Stimulation und Ernten von Zellen

Die Stimulation der Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen erfolgte in Vollmedium, wobei der jeweilige Stimulus für die bestimmte Zeit zu den Zellen gegeben wurde. Die Konzentration von IL-1α betrug 10ng/ml, von TNFα 20ng/ml, von IL-6 100ng/ml und von gp80 1µg/ml.

Bei Einsatz der MAPK-Inhibitoren PD98059 (Alexis), SP600125 (Tocris) und SB203580 (Calbiochem) wurden die Inhibitoren dem Medium der Zellen 30min vor dem Ernten bzw. vor der Stimulation in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 50µmol/l PD98059, 20µmol/l SP600125 und 2µmol/l SB203580.

Zum Ernten der Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS abgeschabt, anschließend bei 13000rpm und 4°C kurz abzentrifugiert und bis zum Gebrauch

bei -80°C gelagert. Für ELISAs und das Zytokinarray-Experiment wurden die Überstände von Zellen verwendet. Potentiell im Überstand vorhandene Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand des Mediums wurde für die Versuche eingesetzt.

### **2.17.6 Chromatinfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342**

Zur Anfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33342) verwendet, der zwischen benachbarten Basen der DNA interkaliert. Ein Aliquot der Stammlösung (10mg/ml in DMSO) wurde in einer 1:500-Verdünnung auf die Zellen gegeben und diese für 10-20min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem geeigneten Filter am Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

## **2.18 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.18.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen**

Die Herstellung von Ganzzelllysaten erfolgte zur Messung von Reportergenaktivitäten und zur Immunodetektion im Westernblot. Die Präparation der Ganzzellextrakte wurde auf Eis durchgeführt, um eine Degradation zellulärer Proteine und eine Dissoziation zellulärer Proteinkomplexe zu vermeiden. Das Zellmaterial wurde je nach Verwendungszweck mit unterschiedlichen Methoden in einem passenden Zellysepuffer aufgeschlossen, die im Folgenden beschrieben werden.

#### **2.18.1.1 Lysate zur Immunodetektion im Westernblot**

Durch Verwendung eines Lysepuffer mit einer relativ hohen Triton X-100-Konzentration von 1% sollte sichergestellt werden, dass die Zellen vollständig lysiert werden und die Proteinkonzentration hoch ist. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, für 1min bei 13000rpm und 4°C pelletiert, in Lysepuffer 1 resuspendiert und gevortext. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen abzentrifugiert (13000rpm, 15min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Je nach Zelltyp wurden für eine, einem 6-Loch entsprechende, Zellmenge etwa 50µl Lysepuffer 1 verwendet.

#### **2.18.1.2 Lysate zur Messung von Reportergenaktivitäten**

Die Lyse erfolgte exakt wie für die Lysate zur Immunodetektion im Westernblot beschrieben. Der eingesetzte Lysepuffer 2 enthielt jedoch weniger Triton X-100, so dass die Bedingungen schonender waren.

#### **2.18.1.3 Direktlysate**

Für Versuche, bei denen eine Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten nicht nötig war, wurden die Zellen direkt in einem SDS-haltigen Puffer (Lysepuffer 3) lysiert und sofort für 5min bei 95°C aufgeköcht. Diese Art der Lyse wurde zum Teil dann verwendet, wenn mit sehr kleinen Zellmengen gearbeitet werden musste, da sie die maximale Ausbeute an Protein garantiert.



### 2.18.2 Bestimmung der Aktivität von Enzymen durch Reporter-gen-Versuche

Durch die Transfektion von plasmidkodierten Reporter-genen, die unter der Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors oder Promotorabschnittes stehen, lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivierung des Promotors ziehen. Als Reporter-gene werden in der Regel Enzyme verwendet, deren Aktivität leicht zu messen ist. In dieser Arbeit wurden dabei die Enzyme Luziferase und  $\beta$ -Galaktosidase gemessen.

#### 2.18.2.1 Luziferase-Messung

Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch mit Coenzym A den Farbstoff Luziferin um, wobei es durch Chemilumineszenz zur Aussendung von Licht kommt. Die Bestimmung der Luziferase-aktivität erfolgte als Doppelwert. Dazu wurden 20 $\mu$ l Lysat in einem Messröhrchen vorgelegt und in das Luminometer gestellt. Nach Injektion von 100 $\mu$ l des Luziferase-Reagenzes durch das Gerät erfolgte 5s später die Messung der Chemilumineszenz für 10s.

In dieser Arbeit wurde das Luziferase-Reporter-genplasmid pUHD13.3-IL-8-Promotor-Luc-wt verwendet, bei dem das Reporter-gen von einem minimalen humanen IL-8-Promotor kontrolliert wird, der unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B besitzt.

#### 2.18.2.2 Beta-Galaktosidase-Messung

Da die Transfektionseffizienz einen Einfluss auf die Messwerte von Reporter-genversuchen hat, wurde ein zweites, konstitutiv exprimiertes Reporter-gen zu Normalisierung kotransfiziert. Dazu wurde das Plasmid pSV- $\beta$ -Gal verwendet, bei dem ein bakterielles  $\beta$ -Galaktosidasegen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors exprimiert wird. Die Galaktosidaseaktivität wurde ebenfalls durch Messung der Chemilumineszenz eines umgesetzten Substrates bestimmt.

Zur Inaktivierung der endogenen  $\beta$ -Galaktosidase wurden 20 $\mu$ l Lysat 1h bei 50°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und wieder auf Raumtemperatur erwärmt. Im Versuchssystem der Firma Clontech wandelt die  $\beta$ -Galaktosidase ein nicht näher von der Firma beschriebenes Substrat um. Zur Messung wurden 7,5 $\mu$ l Lysat in einem Luminatorröhrchen vorgelegt und mit 25 $\mu$ l eines  $\beta$ -Galaktosidasepuffer-Substratgemisches (pro 7,5 $\mu$ l Lysat: 25 $\mu$ l Reaktionspuffer+ 0,5 $\mu$ l Substratlösung) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte direkt im Anschluss für 10s. Jede Probe wurde als Doppelwert gemessen.

### 2.18.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode, die auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue* G-250 an Proteine in saurer Lösung beruht. Dieses Reagenz bindet am stärksten an Arginin-Reste aber nur schwach an Histidin-, Lysin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninreste. Bei der Bindung erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465nm zu 595nm.

Das Reagenz wurde aus einer Mischung des Farbstoffkonzentrats *Roti Quant* 40% (v/v) und ddH<sub>2</sub>O 60% (v/v) hergestellt. In einer 96-Lochplatte wurden 100 $\mu$ l der zu messenden Probe

und einer BSA (*bovine serum albumin*)-Standardreihenlösung (0-35mg/ml in PBS) als Dreifachwerte vorgelegt und mit 100µl der Farbstofflösung versetzt. Nach etwa 5min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 595nm in einem *ELISA Reader*. Die Konzentration der Probe wurde anhand der Standardreihe bestimmt.

#### 2.18.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970)

Die Beweglichkeit von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel ist abhängig von ihrer Gesamtladung und ihrer Größe, so dass Proteine sich trotz unterschiedlicher Molekülgrößen mit derselben Geschwindigkeit auf die Anode zu bewegen können, wenn ihre Größenunterschiede durch die Ladungen wieder ausgeglichen werden. In Anwesenheit denaturierender Substanzen hingegen, wie durch das hier verwendete anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), stellt die Beweglichkeit der Proteine eine Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte dar (dieses gilt streng genommen nur für die Beweglichkeit von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 12-70 kDa). SDS bindet dabei an die hydrophoben Bereiche eines Proteins, wodurch die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziieren und führt eine starke negative Ladung in die denaturierten Polypeptidketten ein, so dass diese im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem folgenden Schema, wobei die Konzentration der Trenngele den jeweiligen Versuchsanforderungen durch Variation der Menge an Acrylamid-Stammlösung angepasst wurde (7,5-15%).

Lösung	10%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	2740µl	3255µl
Trenngelpuffer	4600µl	-
Sammelgelpuffer	-	630µl
2% (w/v) SDS-Lösung	600µl	250µl
30% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung	4000µl	840µl
40% (w/v) APS	36µl	15µl
TEMED	24µl	10µl

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, welches nach dem Auspolymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet wurde. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt, 5min bei 95°C denaturiert, abzentrifugiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke in Abhängigkeit der Größe der verwendeten Gele. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für einen Westernblot eingesetzt.

#### 2.18.5 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Westernblot) und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion

Beim Westernblot handelt es sich um eine analytische, immunologische Methode, die dem spezifischen Nachweis geringer Proteinmengen aus einem komplexen Gemisch dient.

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im *semi dry*-Verfahren. Dazu wurde eine voraktivierte PVDF-Membran auf das Gel gelegt und von oben und unten in

jeweils zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2mm) eingelegt, welches zuvor in 1x Blotpuffer mit 20% Methanol getränkt wurde. Die Elektrophorese erfolgte für 2h bei  $0,75\text{mA}/\text{cm}^2$ , wobei der Transfer der Proteine im Anschluss durch Färbung der Membran mit *Coomassie*-Lösung überprüft wurde. Nach Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit 100% Methanol vollständig entfärbt und in TBST gewaschen.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese für 1h bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver (in TBST) inkubiert. Anschließend wurde sie mit einer Verdünnung (1:500 bis 1:3000 je nach Antikörper) des Primärantikörpers in 5% Magermilch oder 5% BSA in TBST über Nacht unter Schwenken bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert, wonach überschüssiger Antikörper durch fünfmaliges Waschen mit TBST entfernt wurde. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte mit einer Verdünnung (1:2000 bis 1:3000) eines HRP-gekoppelten Detektionsantikörpers in 5% Magermilch für 2-3h bei Raumtemperatur. Überschüssiger Antikörper wurde erneut durch fünfmaliges Waschen mit TBST entfernt. Die Immunodetektion erfolgte anhand der Chemilumineszenz, die durch die Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz entstand, das nach den Angaben des Herstellers eingesetzt wurde. Das Verfahren basiert auf der Abspaltung von reaktivem Sauerstoff aus Persäure durch die Peroxidase, der dann Luminol oxidiert. Unter Stickstoffabspaltung und Lichtemission entsteht Aminophthalsäure. Durch Zugabe eines chemischen Verstärkers wird die Lichtintensität erhöht und kann auf einem Film (Biomax ML, Kodak) sichtbar gemacht werden.

Für eine erneute Detektion mit einem anderen Antikörper wurde die Membran kurz in Methanol gewaschen (zur Inaktivierung des Sekundärantikörpers), in TBST äquilibriert und erneut mit Trockenmilch geblockt.

#### **2.18.6 ELISA für IL-8 und IL-6**

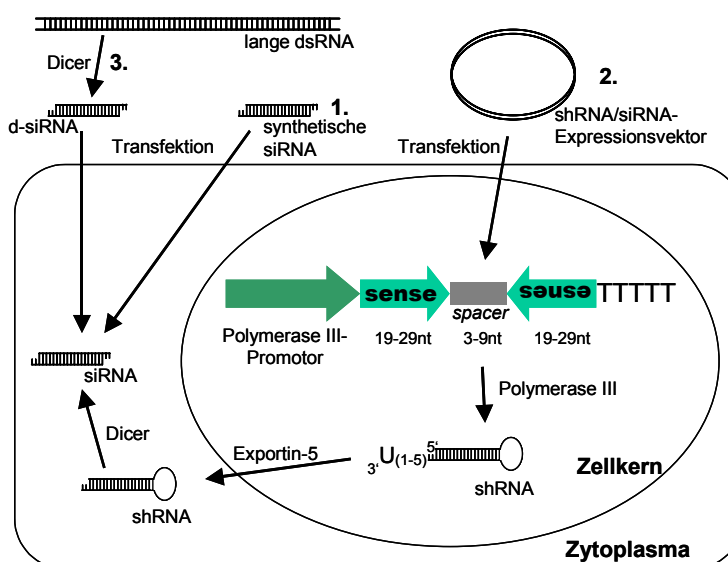
Die Bestimmung der Konzentration der Zytokine IL-8 und IL-6 erfolgte mittels eines *sandwich* ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assay*) der Firma R&D System exakt nach Herstellerangaben. Zur Messung wurden zum Teil Verdünnungen der Zellkulturüberstände im Medium angesetzt, wobei üblicherweise Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 verwendet wurden. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Konzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Mit Hilfe einer Standardkurve aus dem entsprechenden rekombinanten Zytokin kann die Konzentration des Zytokins im Überstand ermittelt werden. Als Standard diente eine aus acht Werten bestehende Standardreihe von humanem IL-8 bzw. IL-6 mit Konzentrationen von 31,3-2000pg/ml bei IL-8 und 9,4-600pg/ml bei IL-6.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Teil I: Etablierung von siRNA-vermittelter Suppression vom TAB1-Protein und Genexpressionsstudien am TAK1-/ TAB1-Signalkomplex

##### 3.1.1 Übersicht über die drei verwendeten siRNA-Strategien

Seit der ersten der Verwendung von siRNAs zur spezifischen Genhemmung in Säugerzellen (Elbashir et al., 2001a), sind die unterschiedlichsten Methoden zur Herstellung von siRNAs etabliert worden. Abbildung 6 stellt die drei für diese Arbeit relevanten Strategien schematisch dar. Dazu gehören die chemische Synthese doppelsträngiger RNA-Moleküle, plasmidbasierte *in vivo*-Expression von sh(*short hairpin*)RNAs/ si(*short interfering*)RNAs und der Verdau langer dsRNA durch RNase III-Enzyme.



**Abbildung 6: Drei RNAi-Strategien in Säugerzellen**

(1.) Chemisch synthetisierte siRNA-Moleküle können durch Transfektion in Säugerzellen eingebracht werden. (2.) ShRNAs werden anhand von Expressionsplasmiden im Kern exprimiert und nach dem Transport durch Exportin-5 ins Zytoplasma durch Dicer zu siRNAs prozessiert. (3.) D-siRNAs können *in vitro* von dsRNAs durch rekombinantes Dicer-Enzym prozessiert und in die Zellen transfiziert werden. Verändert nach (Kim, 2005)

Chemisch synthetisierte siRNAs ermöglichen nach Applikation in die Zellen eine transiente Reduktion der Ziel-mRNA. Die kommerziell erhältlichen siRNAs werden meistens in Form von 21mer-Oligonukleotiden hergestellt. Es gibt Befunde, wonach 27mer-Oligonukleotide im picomolaren Maßstab hundertmal effizienter als 21mer-Oligonukleotide sein können ohne die dsRNA-abhängige Proteinkinase PKR oder eine Interferonantwort zu aktivieren (Kim et al., 2004). Dies konnte jedoch im vorliegenden KB-Zellsystem nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Auswahl einer geeigneten siRNA-Sequenz ist eines der wichtigsten Kriterien für erfolgreiche siRNA-Experimente. Einige Firmen bieten siRNA-Gemische aus drei oder vier Oligonukleotiden unterschiedlicher Sequenz gegen eine Ziel-mRNA an (z.B. SMART Pool von Dharmacon). Damit soll, wie bei der Verwendung von d-siRNA-Gemischen (siehe unten), eine verbesserte Effizienz der Suppression erreicht werden.

Durch Herstellung von stabilen Zelllinien mit shRNA-Expressionsvektoren (z.B. pSUPER) lassen sich Limitationen der chemisch hergestellten siRNAs, wie transiente *knock down*-Effekte und die geringe Applikation der siRNAs in schwer transfizierbare Zellen, umgehen. Der erste Schritt ist jedoch, wie bei den chemisch synthetisierten siRNAs auch, die Auswahl einer geeigneten siRNA-Sequenz. Bei Plasmiden für eine *in vivo*-Synthese von shRNAs werden die shRNA-Matrizen zwischen einen RNA-Polymerase III-Promotor und einen -Terminator inseriert. Ziel ist es, mit Hilfe der Polymerase III, Transkripte mit definierten Enden zu erhalten (Paul et al., 2002; Paddison et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002; Miyagishi and Taira, 2002). Die exprimierten shRNA-Moleküle weisen eine *hairpin loop*-Struktur auf. Aus diesen shRNAs werden durch intrazelluläres Prozessieren siRNA-Moleküle generiert (Paul et al., 2002; Paddison et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002). Da die Sequenzkomplementarität zwischen siRNA und Ziel-mRNA für das effiziente *gene silencing* kritisch ist, muss sichergestellt sein, dass während der Klonierung keine Mutation in das siRNA-Expressionsplasmid eingebaut wird.

Bei der dritten Methode wird das Austesten der siRNAs durch Verwendung eines Gemisches an unterschiedlich lokalisierten, spezifischen d(Dicer)-siRNA-Molekülen gegen die Ziel-mRNA umgangen. Es wurde gezeigt, dass diese Gemische für die Suppression von vielen endogenen Genen in verschiedenen Zelltypen effektiv eingesetzt werden können (Sohail et al., 2003; Donze and Picard, 2002). Außerdem lassen sich Spleißvarianten der zu supprimierenden mRNA funktionell deletieren. Zur Herstellung des d-siRNA-Gemisches wird eine dsRNA des Zielgens mit Hilfe eines rekombinanten Dicer-Enzyms oder einer anderen RNase III in 19-21mer d-siRNAs *in vitro* verdaut (Myers et al., 2003). Vor Transfektion der d-siRNAs muss sichergestellt sein, dass das Gemisch nicht infolge eines nicht quantitativen Dicer-Verdaus mit dsRNA kontaminiert ist. Ansonsten kommt es unter anderem zur Aktivierung der PKR und in der Folge zum unspezifischem Translationsstopp (Williams, 1999). Zudem wird der TLR3-Signalweg durch dsRNAs aktiviert (Alexopoulou et al., 2001).

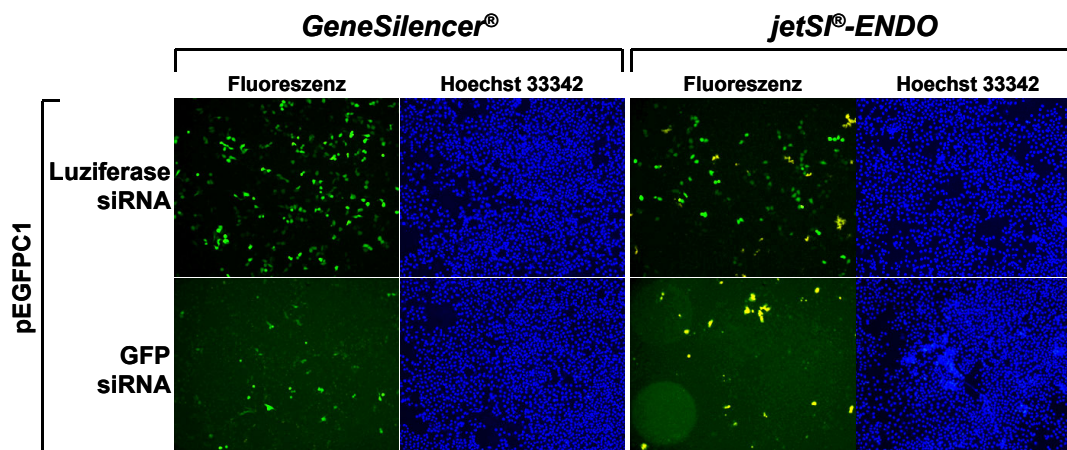
### 3.1.2 Etablierung von Transfektionsbedingungen für RNAi-Experimente

Neben der Auswahl einer geeigneten siRNA-Sequenz muss gewährleistet sein, dass die Oligonukleotide mit einer angemessenen Transfektionseffizienz in die Zellen gelangen. Um für die in dieser Arbeit verwendeten HeLa tTA- und KB-Zellsysteme Transfektionsbedingungen zu etablieren, wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien (*Gene-Silencer*<sup>®</sup> und *jetSI*<sup>®</sup>-*ENDO*) unter Verwendung von siRNAs gegen GFP und Luziferase bei unterschiedlichen Bedingungen ausgetestet. In Abbildung 7 sind die etablierten Transfektionsbedingungen für humane KB-Zellen dargestellt. Für HeLa tTA-Zellen liegen entsprechende Ergebnisse vor.

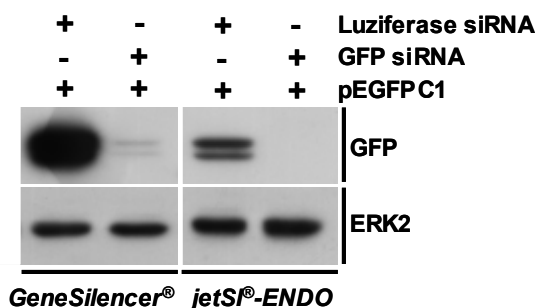
Die Zellen wurden mit dem Plasmid pEGFPC1 und siRNAs gegen GFP und Luziferase transfiziert und die Expression von GFP anhand der Grünfluoreszenz nach 24h analysiert. Ziel war es, eine Abnahme der Fluoreszenz in den GFP siRNA-behandelten Zellen zu detektieren. Das Chromatin der Zellen wurde mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Abbildung 7 A zeigt für beide Transfektionsreagenzien eine deutliche Abnahme der GFP-Expression in den Ansätzen mit GFP siRNA. Die Suppression

des exogenen Gens ist auch im Immunoblot der entsprechenden Zellextrakte zu erkennen (Abbildung 7 B). Dabei fällt auf, dass die Transfektionseffizienz mit *GeneSilencer*<sup>®</sup> deutlich größer ist als mit *jetSI*<sup>®</sup>-*ENDO*. Die Suppression von GFP ist jedoch bei beiden Reagenzien vergleichbar. Zur Beladungskontrolle wurde der Westernblot mit einem Antikörper gegen die konstitutiv exprimierte Proteinkinase ERK2 hybridisiert.

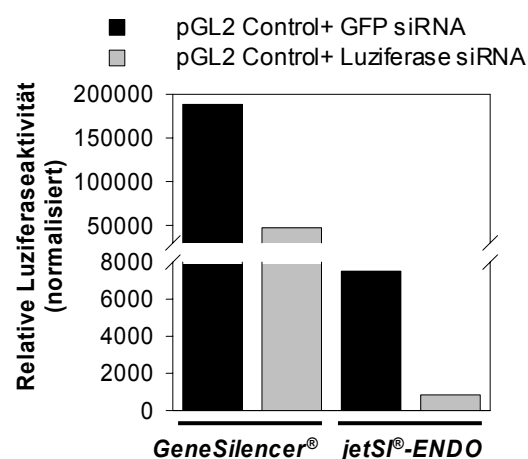
A



B



C



**Abbildung 7: Etablierte Transfektionsbedingungen für siRNA-vermittelte Suppression von exogenen Genen in KB-Zellen (verändert aus: Kettner-Buhrow and Kracht, 2005)**

$2 \times 10^5$  KB-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie mit  $1 \mu\text{g}$  pEGFP-C1 (A, B),  $1 \mu\text{g}$  pGL2 Control (C) und  $200 \text{ nmol/l}$  siRNA gegen GFP oder Luziferase, wie angegeben in 1 ml DMEM ohne Zusätze transfiziert. Dabei wurden die zwei Transfektionsreagenzien *GeneSilencer*<sup>®</sup> und *jetSI*<sup>®</sup>-*ENDO* verglichen. 4h nach der Transfektion wurde diese mit 1 ml DMEM+ 20% FKS abgestoppt. (A) 24h später wurde die GFP-Expression durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Kerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. (B) zeigt die GFP-Expression in den Zellextrakten von (A) im  $\alpha$ -GFP Immunoblot. Als Beladungskontrolle diente eine Hybridisierung mit einem  $\alpha$ -ERK2 Antikörper. (C) In den Zellextrakten wurde die Luciferaseaktivität der Zellen nach 48h bestimmt und über die Gesamtproteinkonzentration normiert.

Auch bei Bestimmung der Transfektionseffizienz über einen Reportergenversuch zeigt sich eine höhere Effizienz der Transfektion durch *GeneSilencer*<sup>®</sup> und ein analoger Hemmeffekt bei beiden Reagenzien auf das Reportergen Luziferase (Abbildung 7 C). Für dieses Experiment wurden Zellen mit dem Luciferaseexpressionsvektor pGL2 Control und siRNAs gegen Luziferase bzw. GFP unter Verwendung der beiden Transfektionsreagenzien

transfiziert, nach 48h geerntet und die Luziferaseaktivität in den Zellextrakten bestimmt. Die Normierung der Reporterogenaktivität erfolgte auf die Gesamtproteinmenge.

Aufgrund der guten Suppressionswirkung der siRNAs unter den gewählten Transfektionsbedingungen mit *GeneSilencer*<sup>®</sup> und *jetSI*<sup>®</sup>-*ENDO* kamen im Rahmen dieser Arbeit beide Reagenzien bei siRNA-Versuchen zum Einsatz.

### **3.1.3 Vergleich dreier siRNA-Methoden anhand der Suppression des Proteins TAB1**

Wie im Kapitel 1.1.1 dargelegt, steht der Signaltransduktionskomplex aus der MKKK TAK1 und dem Adapterprotein TAB1 an einer Schlüsselstelle der rezeptorproximalen Signaltransduktion proinflammatorischer Stimuli und stellt daher eine Zielstruktur bei der Identifikation neuer antiinflammatorischer Therapiestrategien dar.

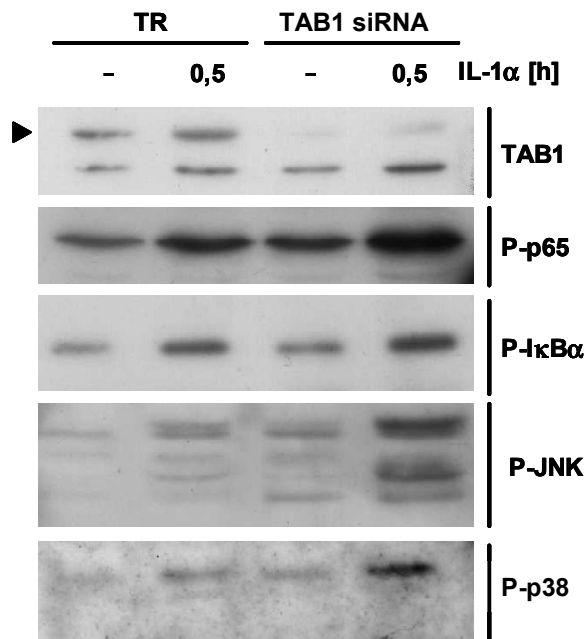
Ziel im Rahmen des Vergleichs der drei unterschiedlichen RNAi-Strategien war es, in humanen epithelialen Zelllinien eine funktionelle Deletion von TAB1 zu etablieren, um den Einfluss dieser mRNA-Suppression auf die distal vom TAK1-/ TAB1-Signalkomplex gelegene Signaltransduktion bei der unspezifischen Immunantwort zu ermitteln.

Im Folgenden sind ausgewählte Ergebnisse für alle drei RNAi-Methoden dargestellt.

#### **3.1.3.1 Suppression von TAB1 durch eine synthetische siRNA**

Das gegen humanes TAB1 chemisch synthetisierte siRNA-Oligonukleotid wurde durch Transfektion in humane HeLa tTA-Epithelzellen eingebracht. Dafür wurden diese für 48h mit TAB1 siRNA oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für eine kurze Zeitspanne (0,5h) mit IL-1 $\alpha$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach der Zellyse wurde die starke Suppression der TAB1-Expression im Immunoblot detektiert (Abbildung 8). Die Bande unterhalb von TAB1 ist vermutlich ein unspezifisches Signal (Abbildung 10). Es erscheint nicht bei jeder Detektion (Abbildung 12). Möglich ist jedoch auch, dass es sich um eine TAB1-Spleißvariante mit kleinerem Molekulargewicht handelt. Diese ist dann durch die Transfektion der TAB1 siRNAs nicht beeinflusst worden. Tatsächlich wurde 2003 eine verkürzte, durch alternatives Spleißen entstehende TAB1-Form (TAB1 $\beta$ ) beschrieben, die TAK1 nicht binden kann (Ge et al., 2003). Jedoch sollte diese nicht von dem verwendeten  $\alpha$ -TAB1 Antikörper detektiert werden, da die beiden Proteine eine unterschiedliche C-terminale Sequenz aufweisen.

Die Aktivierung der endogenen NF- $\kappa$ B-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege durch IL-1 $\alpha$  wurde mit Hilfe von Antikörpern gemessen, welche die phosphorylierten Formen der Proteine p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK und p38 MAPK aus diesen Signalwegen erkennen.



**Abbildung 8: Transiente Suppression von TAB1 durch siRNAs zeigt keine Inhibition der IL-1 $\alpha$ -induzierten Aktivierung von MAPK- und NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsproteinen**

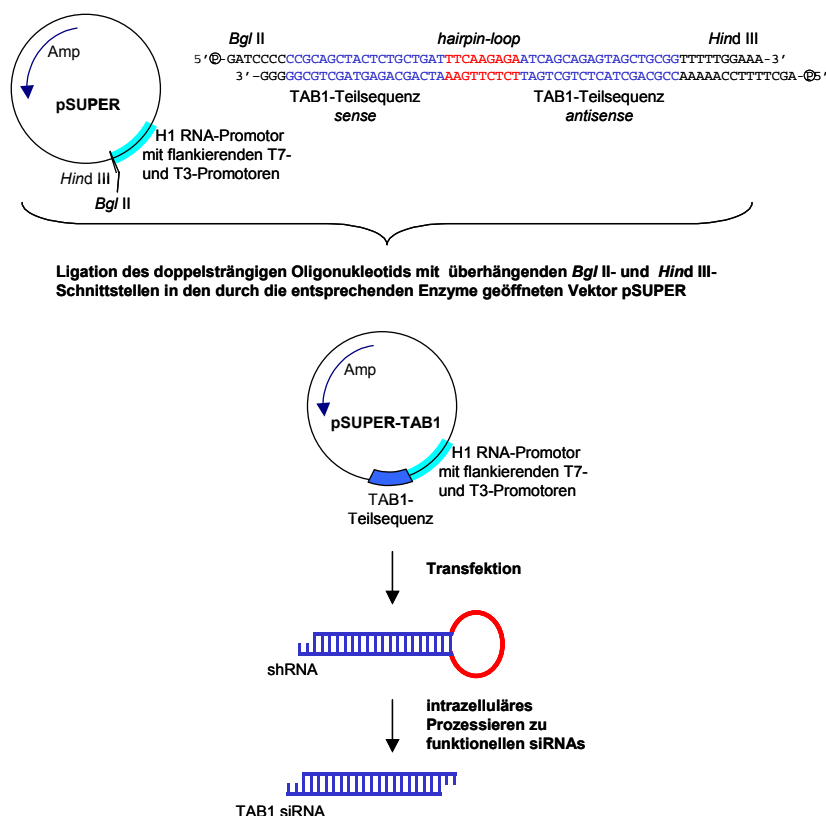
Humane HeLa tTA-Epithelzellen ( $3,3 \times 10^5$  Zellen/ T25-Flaschen) wurden für 48h mit 244nmol/l TAB1 siRNA oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 0,5h mit IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen und lysiert. Die Expression von TAB1 wurde mit einem  $\alpha$ -TAB1 Antikörper im Westernblot detektiert (siehe Pfeil). Die Aktivierung von p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK und p38 MAPK durch IL-1 $\alpha$  wurde mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern für diese Proteine gemessen.

Wider Erwarten hatte der TAB1 *knock down* keinen inhibitorischen Effekt auf die IL-1 $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, JNK und p38 MAPK in den transienten Transfektionsexperimenten. Die Phosphorylierungen von p65, JNK und p38 MAPK sind im Vergleich zu den Kontrollzellen nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  in den TAB1 *knock down*-Zellen tendenziell noch verstärkt.

### 3.1.3.2 Suppression von TAB1 durch eine endogen exprimierte shRNA

Für eine *in vivo*-Expression von TAB1 shRNAs/ siRNAs wurde zunächst ein auf pSUPER basierender Expressionsvektor generiert. Die verwendete Klonierungsstrategie zur Herstellung des Vektors pSUPER-TAB1 ist Abbildung 9 zu entnehmen.

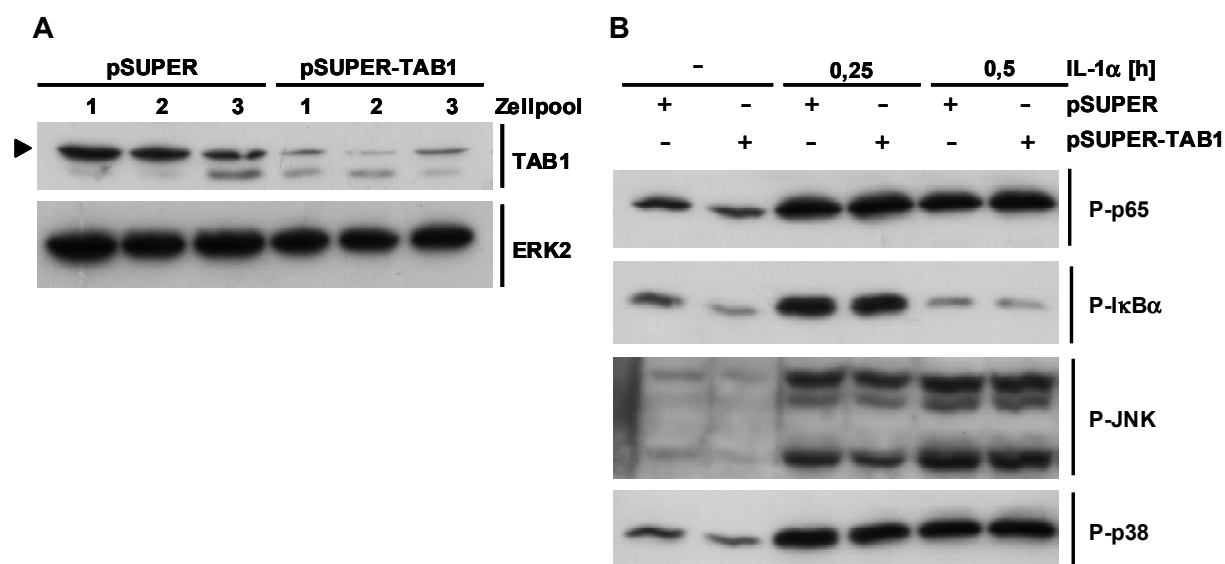




**Abbildung 9: Strategie zur Herstellung von shRNAs/ siRNAs am Beispiel von TAB1**

Zur Klonierung des siRNA-Expressionsvektors pSUPER-TAB1 wurde neben dem Plasmid pSUPER ein doppelsträngiges Oligonukleotid benötigt. Dieses wurde durch Hybridisierung von zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt. Die Sequenz des 5'-3'-Oligonukleotids beinhaltet 19 Basen in *sense* und *antisense* Orientierung, die durch eine 9nt lange *spacer*-Sequenz getrennt sind. Die 19 Nukleotide sind komplementär zu einem Abschnitt der Ziel-mRNA. Das 5'-Ende des Oligonukleotids korrespondiert mit einer *Bgl* II-Schnittstelle, während das 3'-Ende eine *Hind* III-Schnittstelle aufweist. Das 3'-5'-Oligonukleotid ist komplementär zum 5'-3'-Oligonukleotid aufgebaut. Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde nach Phosphorylierung der 5'-Enden in die *Bgl* II- und *Hind* III-Schnittstellen des linearisierten Vektors hinter die TATA-Box des H1-Promotors ligiert. Nach erfolgreicher Überprüfung der Sequenz des klonierten Expressionsvektors wurde dieser in Zellen transfiziert. In der Zelle wird ein Transkript mit definierten Enden erzeugt, das sich spontan zu einer 19-Basenpaar *stem loop*-Struktur (shRNA) faltet. Durch intrazelluläres Prozessieren dieser shRNAs entstehen funktionelle siRNAs.

Nach Kontrolle der Sequenz des klonierten Vektors wurden die Plasmide pSUPER und pSUPER-TAB1 jeweils zusammen mit einem Plasmid kotransfiziert, welches ein Resistenzgen gegen Puromycin trägt. Das ermöglichte eine Selektion stabiler Linien mit diesem Antibiotikum. Abbildung 10 A zeigt die Suppression der TAB1-Proteinmenge in humanen Epithelzellen nach stabiler Transfektion des siRNA-Expressionsvektors pSUPER-TAB1 im Vergleich zum Kontrollvektor pSUPER. Die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren wurde durch Hybridisieren desselben Blots mit einem Antikörper gegen die konstitutiv exprimierte Proteinkinase ERK2 verifiziert. Es musste jedoch bei Verwendung dieser RNAi-Strategie festgestellt werden, dass die stabilen Zellen nach einigen Wochen in Kultur das Plasmid wieder eliminierten.



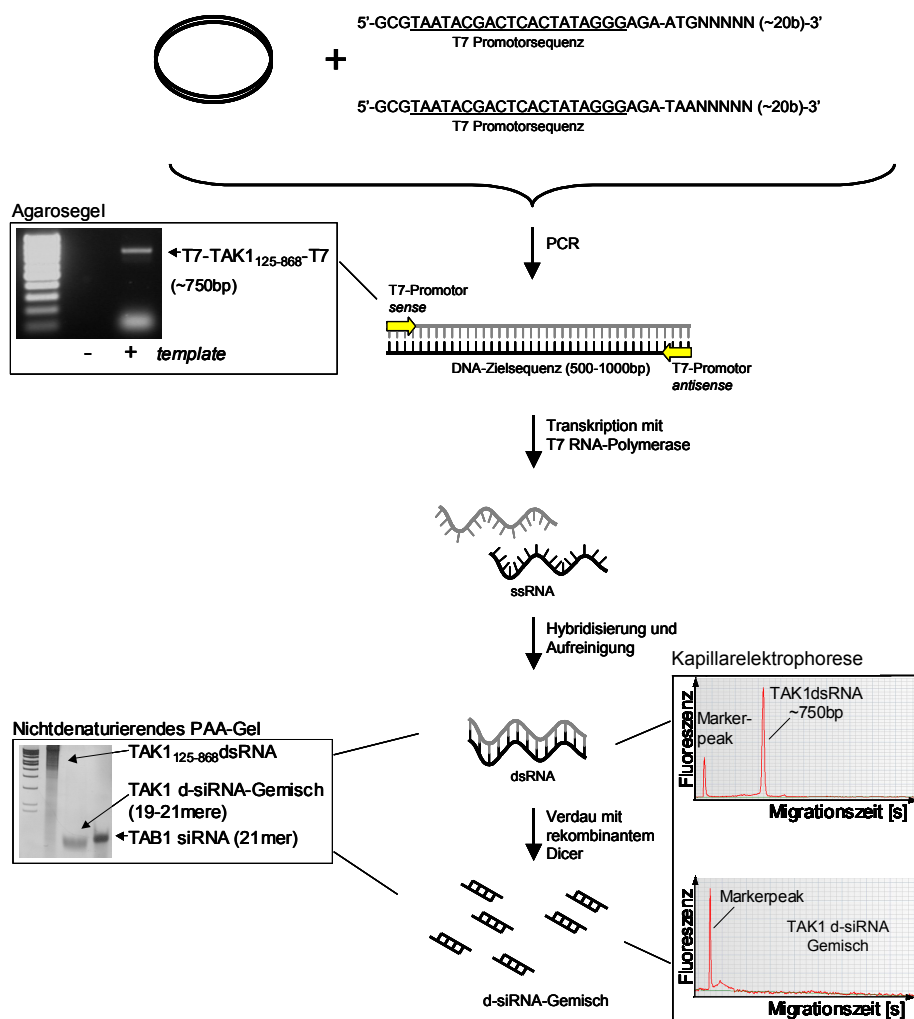
**Abbildung 10: Stabile Suppression von TAB1 durch einen shRNA-Expressionsvektor hat keinen Einfluss auf die IL-1 $\alpha$ -vermittelte Aktivität von MAPK- und NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsproteinen**

(A) Humane HeLa tTA-Epithelzellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/ 6-Loch) wurden mit  $5 \mu\text{g}$  pSUPER oder pSUPER-TAB1 stabil transfiziert. Zur Zellselktion mit Puromycin wurde je  $1 \mu\text{g}$  pBSPAC $\Delta$ P kotransfiziert. Zur Überprüfung des TAB1 *knock downs* wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression mit einem  $\alpha$ -TAB1 Antikörper im Westernblot detektiert. (B) Die stabil transfizierten HeLa tTA-Zellen (pSUPER Pool1, pSUPER-TAB1 Pool2;  $5 \times 10^5$  Zellen/ 6-Loch) wurden für zwei Zeitpunkte mit IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen, lysiert und die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege mit Hilfe von Antikörpern gemessen, die die phosphorylierten Formen von p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK und p38 MAPK erkennen.

Die IL-1 $\alpha$ -abhängige Aktivierung der NF- $\kappa$ B-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege ist in Abbildung 10 B dargestellt. Übereinstimmend mit Ergebnissen der transienten Transfektion von TAB1 siRNAs zeigt der stabile TAB1 *knock down* im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Inhibition der Aktivierung dieser drei Signalwege. Die Kinasen JNK und p38 MAPK sowie der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B werden scheinbar TAB1-unabhängig durch IL-1 $\alpha$  aktiviert.

### 3.1.3.3 Suppression von TAB1 durch Dicer-generierte siRNAs

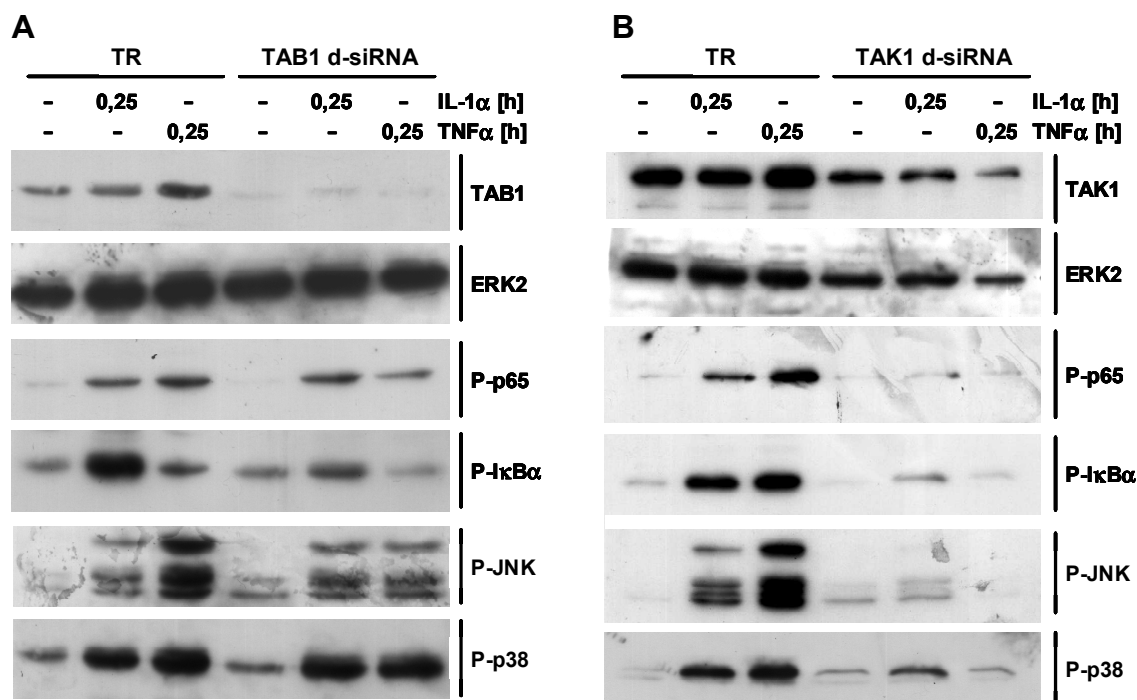
Um auch potentielle, bisher unbekannte Spleißvarianten von TAB1 supprimieren zu können, wurde ein Gemisch aus TAB1 d-siRNAs durch einen Dicer-Verdau hergestellt. Da die bisherigen siRNA-Experimente zu TAB1 keinen eindeutigen funktionellen Effekt gezeigt hatten, wurde parallel zu den Experimenten mit TAB1 d-siRNAs ein TAK1 *knock down* unter Verwendung von TAK1 d-siRNAs hergestellt. Wie in Kapitel 1.1.1.1 dargelegt, hat TAK1 eine beschriebene essentielle Funktion für die IL-1 $\alpha$ / TNF $\alpha$ -vermittelte Aktivierung der MAPK JNK und p38 MAPK sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Daher sollten TAK1 *knock down*-Zellen in diesem Kontext als Positivkontrolle für das TAB1 *knock down*-System dienen. Zur Herstellung der d-siRNA-Gemische wurde der *Dicer siRNA Generation Kit* verwendet. Der Ablauf ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Herstellung von d-siRNA-Gemischen am Beispiel von TAK1 d-siRNA**

Durch Verwendung des Plasmids pCR-Blunt II TOPO hTAK1<sub>125-868</sub> und spezifischer Primer mit flankierenden 5'-T7-Promotoren wurde das *template* für eine *in vitro*-Transkription amplifiziert und anschließend mit T7 RNA-Polymerase in „lange“ Einzelstrang-RNAs umgeschrieben. Nach Hybridisierung der ssRNAs und Aufreinigung wurden die dsRNAs durch Dicer in funktionelle d-siRNAs prozessiert. Die Größe und Qualität des PCR-Produkts T7-TAK1<sub>125-868</sub>-T7 wurde durch ein Agarosegel und die TAK1<sub>125-868</sub> dsRNA sowie das TAK1 d-siRNA-Gemisch durch ein nichtdenaturierendes PAA-Gel und eine Kapillarelektrophorese (Agilent Bioanalyzer) überprüft. Für eine Größenabschätzung der d-siRNAs wurden diese mit chemisch synthetisierten siRNAs (TAB1 siRNA, 21mer) auf dem PAA-Gel verglichen.

Zur Amplifikation von Matrizen mit flankierenden 5'-T7-Promotoren wurden PCRs mit Plasmiden der cDNAs der Ziel-mRNAs durchgeführt. Die Größen dieser PCR-Produkte lagen zwischen 650 und 850bp und wurden durch Agarosegele überprüft, wie es in der Abbildung 11 anhand der Amplifikation von T7-TAK1<sub>125-868</sub>-T7 beispielhaft dargestellt ist. Die Qualität der *in vitro* transkribierten dsRNA und der Dicer-generierten funktionellen d-siRNAs wurde durch ein nichtdenaturierendes PAA-Gel und eine Kapillarelektrophorese mittels Agilent Bioanalyzer (Abbildung 11) bestimmt, auch hier am Beispiel der TAK1 d-siRNA-Herstellung dargestellt. Das PAA-Gel zeigt anhand der zusätzlich aufgetragenen chemisch synthetisierten siRNA (TAB1 siRNA), dass die d-siRNAs im Gemisch ungefähr 20bp lang sind. Zudem ist zu erkennen, dass keine langen dsRNAs über der Nachweisgrenze des PAA-Gels im Gemisch vorhanden sind. Die Analyse der d-siRNAs mit einer sensitiveren Methode (Kapillarelektrophorese) führte zum gleichen Ergebnis. Der Nukleinsäuregehalt des Gemisches an 21meren wurde durch photometrische Messung bestimmt.



**Abbildung 12: Einfluss der durch transiente Transfektion eines d-siRNA-Gemisches gegen TAB1 (A) bzw. TAK1 (B) supprimierten Expression auf die Aktivierung der NF-κB-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege**

Humane HeLa tTA-Epithelzellen ( $2,5 \times 10^4$  Zellen/ 24-Loch) wurden für 48h mit 620ng TAB1 bzw. TAK1 d-siRNAs oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) als Kontrolle behandelt. Die Transfektion der d-siRNAs wurde mit *GeneSilencer*<sup>®</sup> in einer finalen siRNA-Konzentration von 88nmol/l pro Loch in einem Gesamtvolumen von 500µl durchgeführt. Zellen wurden für 0,25h mit IL-1α (10ng/ml) und TNFα (20ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Mit den Lysaten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die Proteine im Westernblot mit einem α-TAB1 bzw. α-TAK1 Antikörper detektiert. Die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren wurde durch Hybridisieren derselben Blots mit einem Antikörper gegen die konstitutiv exprimierte Proteinkinase ERK2 verifiziert. Die Aktivierung der NF-κB-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege durch die angegebenen Stimuli wurde mit Antikörpern gegen phosphorylierte Formen dieser Proteine gemessen.

Die Transfektionen der TAB1 bzw. TAK1 d-siRNAs erfolgten in humanen HeLa tTA-Epithelzellen. Die Hälfte der Zellen der jeweiligen Ansätze wurde nach zwei Tagen für eine kurze Zeitspanne (0,25h) mit IL-1α oder TNFα stimuliert, die andere Hälfte unbehandelt gelassen. Anhand der in Abbildung 12 dargestellten Westernblots wurde die Suppression der Proteine TAB1 und TAK1 überprüft. In Teilabbildung A ist eine TAB1-Deletion mit sehr gutem *knock down*-Effekt zu erkennen. Die verminderte Expression der Proteinkinase TAK1 ist in Abbildung 12 B dargestellt. Hier konnte nur eine partielle Suppression der TAK1-Proteinexpression erreicht werden. Die Proteinexpression beider *knock down*-Zellen wurde durch die Verwendung des Antikörpers α-ERK2 überprüft. Die Aktivierung der NF-κB-, JNK- und p38 MAPK-Signalwege durch die genannten Stimuli wurde durch Hybridisierung der Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern gemessen.

Die RNAi-vermittelte Suppression von TAK1 hebt die IL-1α- bzw. TNFα-induzierte NF-κB-Aktivierung auf. Dies wird anhand einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung der Proteine p65 und IκBα deutlich (Abbildung 12 B) und zeigt, dass TAK1 für diesen Signalweg essentiell ist. Auch für den JNK- und p38 MAPK-Signalweg ist nach Applikation der TAK1 d-siRNAs die erwartete Abnahme der Aktivierung von JNK und p38 MAPK durch die deutlich verminderte Phosphorylierung erkennbar (Abbildung 12 B).

Im Gegensatz dazu beeinflusst der TAB1 *knock down* die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nicht (p65 Phosphorylierung) bzw. nur moderat (I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylierung) (Abbildung 12 A). Weiterhin gibt es keinen Anhaltspunkt, dass TAB1 für die Aktivierung der Kinasen JNK und p38 MAPK essentiell ist. Die TAB1-Deletionszellen zeigen keinen bzw. bei Phospho-JNK nur für die TNF $\alpha$ -abhängige Signaltransduktion einen schwachen inhibitorischen Effekt (Abbildung 12 A). Die Effekte sind jedoch im Vergleich zum TAK1 *knock down* nur marginal.

Mit Hilfe der d-siRNAs gegen TAK1 wurde folglich das erwartete Ergebnis bezüglich der distal vom Komplex gelegenen Signaltransduktion bei der unspezifischen Immunantwort erhalten. Die MKKK TAK1 ist essentiell für die IL-1 $\alpha$ - bzw. TNF $\alpha$ -vermittelte NF- $\kappa$ B, JNK und p38 MAPK-Aktivierung. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass auch die erhaltenen Ergebnisse des TAB1 *knock downs*, hergestellt durch Transfektion der d-siRNAs, verlässlich sind.

Dieses und die beiden weiteren Experimente mit unterschiedlichen siRNA-Methoden geben keinen Hinweis darauf, dass TAB1 einen essentiellen Einfluss auf die IL-1 $\alpha$ - und TNF $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, JNK und p38 MAPK hat.

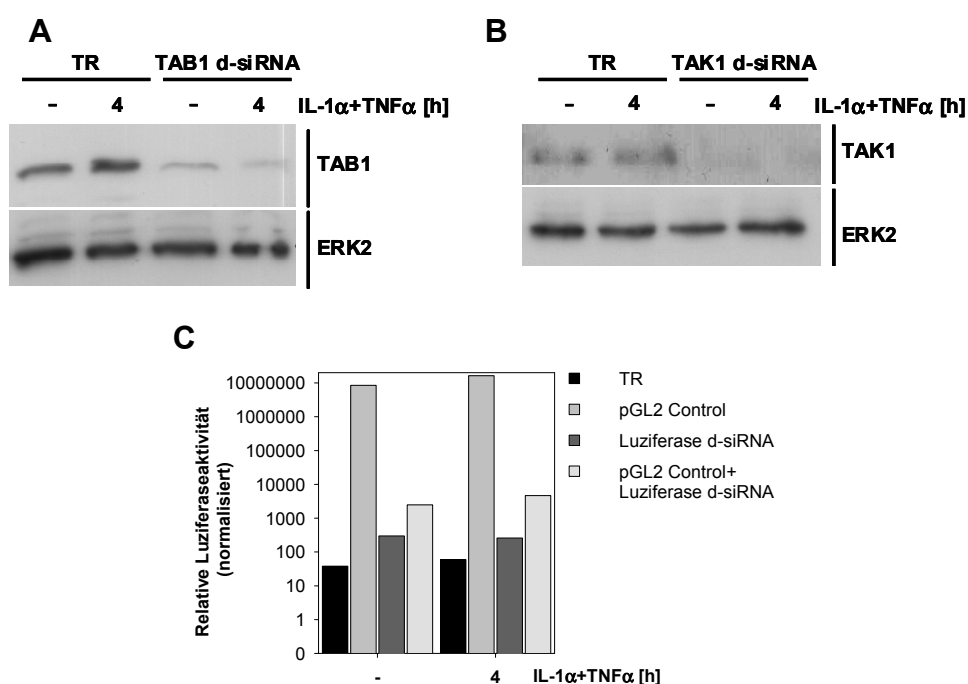
### **3.1.4 Analyse der Expression von Entzündungsgenen in TAB1 und TAK1 *knock down*-Zellen**

Parallel zu den Untersuchungen von TAB1 auf Proteinebene wurde für die NF- $\kappa$ B-, JNK- und p38 MAPK-Signaltransduktion eine breite Genexpressionsstudie mit Entzündungsarrays auf mRNA-Ebene durchgeführt. Der im Rahmen des Teilprojektes Z02 des Sonderforschungsbereichs „Zytokinrezeptoren und zytokinabhängige Signalwege als therapeutische Zielstrukturen“ entwickelte MWG Inflammatory Array enthält Oligonukleotide, die komplementär zu 136 (Inflhum, TestInflhum) bzw. 110 (HA286) Genprodukten sind. Diesen kommt eine wichtige Funktion im Entzündungsprozess zu. Mit dem Microarray ist die Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Akute Phase-Genen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren, Matrixmetalloproteinasen sowie Signaltransduktionsgenen und Enzymen messbar. Zusätzlich sind verschiedene Haushaltsgene auf dem Array vertreten. Von einigen Ausnahmen abgesehen, wurden für die erste Version des Entzündungsarrays (HA286) drei spezifische Oligonukleotide pro Gen in Zusammenarbeit mit der Firma MWG Biotech ausgewählt, wobei zur Validierung der einzelnen Oligonukleotide eine Großzahl von Experimenten mit verschiedenen Stimuli und Zelllinien durchgeführt wurde. Die Sonden sind jeweils als Replikate auf den Objektträger gedruckt. Die endgültig validierte Version des Microarrays nennt sich Inflhum und trägt jeweils eine Sonde pro Gen in Replikatform. Vor der Markteinführung wurde eine Testversion des Inflhums (TestInflhum), die bis auf eine Sonde zum Inflhum identisch ist, gedruckt. Eine vollständige Auflistung der Gensonden des Entzündungsarrays ist auf der CytoBase-Internetseite (Adresse siehe Kapitel 2.13) zu finden.

Intention der Expressionsuntersuchung war es, TAB1-abhängige Zielgene zu identifizieren und diese mit den TAK1-abhängigen Zielgenen während des Entzündungsprozesses zu vergleichen. Dafür wurden die mit d-siRNAs transfizierten Zellen für 4h mit IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$

stimuliert. Zu diesem Zeitpunkt ist eine starke Expression vieler Entzündungsgene zu erwarten.

Als Kontrolle wurden Luziferase d-siRNAs bei der Microarray-Analyse mitgeführt. Die Herstellung der Luziferase d-siRNAs erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die d-siRNA-Gemische gegen TAB1 und TAK1. Zur Bestimmung der Funktionalität der Luziferase d-siRNAs wurde das Luziferaseexpressionsplasmid pGL2 Control zusammen mit den d-siRNAs kotransfiziert und die Abnahme in den *knock down*-Zellen in einem Reporterexperiment bestimmt (Abbildung 13 C). Die d-siRNAs gegen Luziferase erreichen eine gute Suppression der Zielstruktur. Vor den Genexpressionsuntersuchungen wurden die d-siRNA-transfizierten Zellen auf die Suppression von TAB1 und TAK1 überprüft (Abbildung 13 A, B). Die RNA aus Zellen des gleichen Versuchsansatzes wie die Lysate für die Westernblots bzw. für den Luziferaseassay wurden anschließend für die Arrayanalysen eingesetzt.

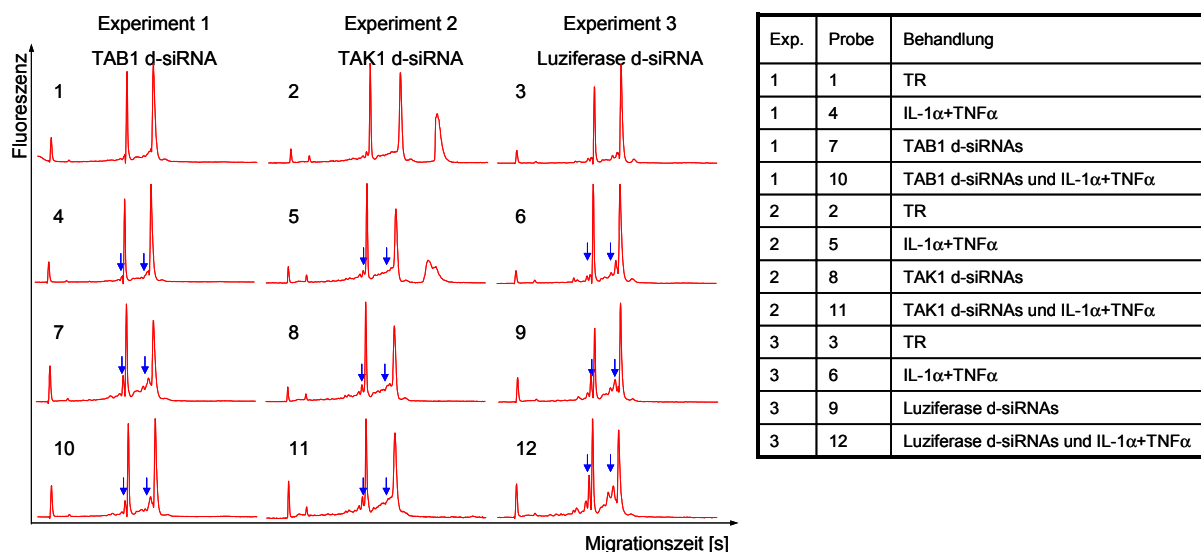


**Abbildung 13: Suppressionen in den *knock down*-Experimenten der Genexpressionsstudie**

Humane HeLa tTA-Epithelzellen ( $2,5 \times 10^4$  Zellen/ 24-Loch) wurden für 48h mit den angegebenen Nukleinsäuren (TAB1 d-siRNAs, TAK1 d-siRNAs, Luziferase d-siRNAs, pGL2 Control) oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Die Zellen wurden für 4h mit IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) und TNF $\alpha$  (20ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. (A), (B) Mit den Lysaten der TAB1 bzw. TAK1 *knock down*-Ansätze wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die Proteine im Westernblot mit  $\alpha$ -TAB1 und  $\alpha$ -TAK1 Antikörper detektiert. Die gleichmäßige Beladung wurde durch Hybridisieren derselben Blots mit einem Antikörper gegen die konstitutiv exprimierte Proteinkinase ERK2 verifiziert. (C) Mit den Lysaten des Luziferase d-siRNA-Experimentes wurde im Luminometer die Luziferaseaktivität bestimmt. Normiert wurde das Experiment auf Gesamtproteingehalt.

Sie wurde in fluoreszenzmarkierte cRNA umgeschrieben und auf den Entzündungsarrays TestInflhum (TAB1 d-siRNA-Experiment) und Inflhum (TAK1 und Luziferase d-siRNA-Experimente) hybridisiert. Die Genexpressionsanalyse umfasste, wie eine Übersicht des Versuchsaufbaus in Abbildung 14 zeigt, drei Experimentgruppen zu je vier Entzündungsarrays. Eine Auswertung der Arrays erfolgte unter Verwendung der im Kapitel 2.16.1.4 angegebenen Programme und Parameter.

Durchführung und Auswertung der Arrayanalysen waren erschwert, da die d-siRNA-Behandlung sowie die Zytokin-Stimulation der Zellen die Qualität der RNA beeinflusste. Dies verdeutlichen die Agilent-Profile der Gesamt RNA in Abbildung 14, wobei blaue Pfeile die partiell degradierte RNA in der Nähe der *peaks* der 18S und 28S rRNA markieren.



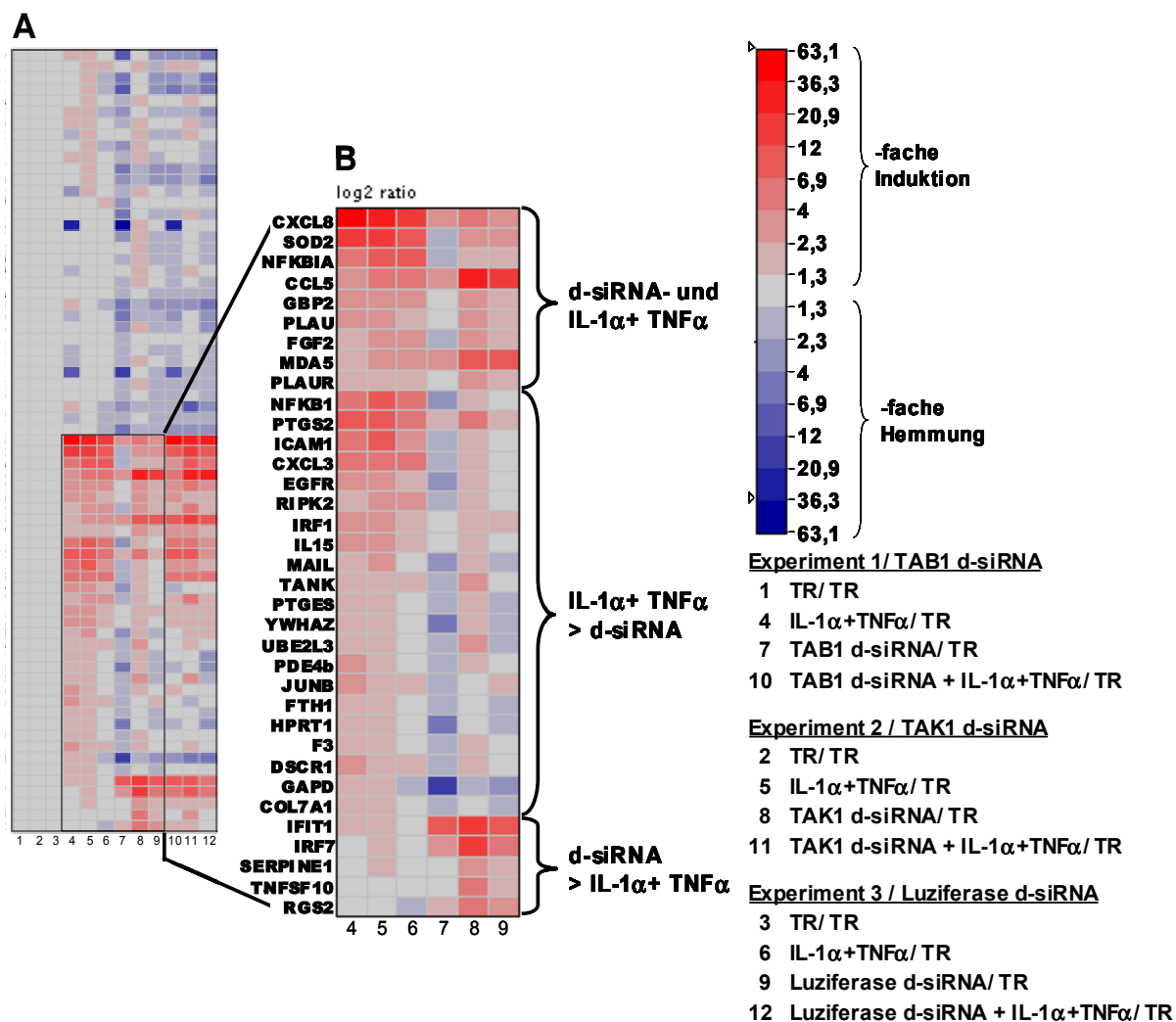
**Abbildung 14: Partielle Degradation der RNAs der TAB1, TAK1 und Luziferase knock-down-Experimente**

Die Kapillarelektrophorese erfolgte wie in Kapitel 2.14.3.3 angegeben. Die zwölf RNA-Agilentprofile sind dem Experimentaufbau der Arrayanalyse (Tabelle rechts) entsprechend angeordnet. Sie zeigen die unterschiedliche Qualität der RNAs. Die partielle RNA-Degradation ist durch blaue Pfeile markiert.

Die Messwerte wurden nicht auf die Haushaltsgene normiert, da diese Gengruppe am stärksten von der Qualität der Proben beeinträchtigt war, während die für die Interpretation des Experiments wichtigen regulierten Entzündungsgene diese Abhängigkeit nicht zeigten. Ein Vergleich der mitgeführten Kontrollen der drei Experimentgruppen verdeutlicht, dass z.B. die IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$ -regulierten Chemokine nicht betroffen sind (Vergleich nicht gezeigt).

Sobald eine Gensonde aller zwölf Arrays Intensitäten unter einem Wert von 100 aufwies, wurde das Genprodukt aus den Datensätzen herausgefiltert. Zur Berechnung der Ratiovergleiche wurden die Intensitäten der Gensonden auf die der jeweiligen Transfektionskontrolle bezogen. Die Ratios wurden in Form einer Heatmap dargestellt (Abbildung 15).

Von den 70 in Abbildung 15 A der Heatmap vorkommenden Genen zeigt die Hälfte eine starke Induktion, verdeutlicht durch die rote Färbung der Felder. Die restlichen Gene zeigen hauptsächlich Repression. Unterschiede der Genexpression zwischen den drei Arraygruppen korrelieren primär mit dem Zustand der Proben und können nicht als TAB1- und TAK1-spezifische d-siRNA-Effekte verstanden werden. Trotz der ungünstigen Bedingungen lässt sich ein Induktionsmuster in Abhängigkeit der Behandlung ablesen (Abbildung 15 B: vergrößerter Ausschnitt der Heatmap).



**Abbildung 15: Entzündungsgenprofile der TAB1, TAK1 und Luziferase d-siRNA-Experimente**

(A) Die Abbildung zeigt die Schnittmenge der Genprodukte der zwölf Arrays, die auf jedem Array Intensitäten mit Werten von mindestens 100 aufwiesen. Die Sondenintensitäten wurden als Ratiovergleiche, bezogen auf die jeweilige Transfektionskontrolle (TR), als log<sub>2</sub> Ratio in Form einer Heatmap dargestellt. Die Intensitäten wurden nicht auf die Haushaltsgene normiert. (B) Spalten der Stimuli- (4-6) und der siRNA-behandelten (7-9) Proben, die eine Induktion durch IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$  und/ oder d-siRNA zeigten, sind vergrößert dargestellt. Die Gene wurden in drei Gruppen in Abhängigkeit ihrer präferentiellen Induktion eingeteilt (IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$  und d-siRNAs oder d-siRNAs). Die der Intensität der Feldfärbungen entsprechende Genregulation ist der Farbskala zu entnehmen. Pfeile an der Skala verdeutlichen die maximal auftretende Regulation.

Die induzierten mRNAs können in drei Gruppen in Abhängigkeit der Behandlung eingeteilt werden:

Aktivierung der Gene (hauptsächlich) durch eine

- Stimulation mit IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$ ,
- Stimulation mit IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$  sowie Behandlung mit d-siRNA und
- Behandlung mit d-siRNA.

Da diese Einteilung die Effekte der Stimulation und die der siRNAs berücksichtigt, sind nur die entsprechenden Spalten vier bis neun in Teilabbildung B vergrößert. Es fällt deutlich auf, dass die Regulation durch die Zytokine IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  die meisten induzierten mRNAs betrifft, gefolgt von den Genprodukten, die sowohl durch die Applikation der d-siRNAs als



auch durch die Zytokin-Stimulation eine Regulation zeigen. Die kleinste Gruppe an induzierten Genen bilden diejenigen, bei denen ausschließlich eine deutliche d-siRNA-abhängige Beeinflussung zu erkennen ist.

In Kapitel 1.2.3 wird beschrieben, dass siRNAs eine unspezifische Antwort induzieren können. Zwei der fünf präferentiell d-siRNA-induzierten Genprodukte (IRF7 und IFIT1) gehören zur Klasse der Interferon-, dsRNA- und durch virale Infektion induzierbaren Gene. Da der Entzündungsarray noch weitere Gensonden dieser Klasse trägt, konnte die Frage beantwortet werden, ob d-siRNAs Interferonantworten aktivieren. Es wurden dafür auch Ratiovergleiche verwendet, deren Gensonden Intensitätswerte kleiner 100 aufwiesen. Diese Ratios wurden in Tabelle 3 in Klammern gesetzt.

Gen-sonden	siRNA-Effekt im unstimulierten Zustand				siRNA-Effekt im stimulierten Zustand			
	TAB1 d-siRNA-Gemisch	TAK1 d-siRNA-Gemisch	Luziferase d-siRNA-Gemisch	TAB1 siRNA	TAB1 d-siRNA-Gemisch	TAK1 d-siRNA-Gemisch	Luziferase d-siRNA-Gemisch	TAB1 siRNA
CXCL10	(2,3)	(9,9)	(17,6)	(1,0)	0,9	1,7	0,9	1,3
IRF1	1,0	1,8	1,4	1,6	0,6	0,5	0,7	1,0
IRF7	3,1	13,3	6,1	1,2	4,0	4,3	4,9	1,0
TNFSF13b	1,4	(4,6)	(1,7)	0,6	1,6	7,0	(1,5)	0,8
GBP1	2,0	(12,5)	(9,8)	1,2	2,1	3,1	4,4	1,4
IFIT1	7,1	18,6	9,7	0,7	5,9	4,9	4,4	1,0
MDA5	3,4	11,9	9,5	0,8	4,6	5,0	3,1	1,1
MX1	1,0	(1,6)	(1,7)	1,0	1,3	(1,1)	(1,1)	0,9
GAPDH	0,1	0,8	0,3	9,1	0,2	0,1	0,3	0,8

**Tabelle 3: Unterschiedlich starke Induktion von Interferonzielgenen durch d-siRNAs und siRNAs**

Es sind Ratiovergleiche für neun Gene aufgelistet, die im Zusammenhang mit dem Interferonsignalweg stehen. Gegenübergestellt sind die siRNA-Effekte im unstimulierten und stimulierten Zustand der mit d-siRNA-behandelten Zellen gegen TAB1, TAK1 und Luziferase sowie der siRNA-behandelten Zellen gegen TAB1. Für den Vergleich wurden die Ratios der unstimulierten *knock downs* auf die unstimulierte Transfektionskontrolle bezogen und die der stimulierten *knock down*-Zellen auf die der stimulierten Transfektionskontrolle. Verwendet wurden auch Gensonden mit Intensitäten unter einem Wert von 100. Diese Ratios wurden in Klammern gesetzt. Fett gedruckt sind die Ratios, die eine mindestens 1,5-fache Induktion zeigen.

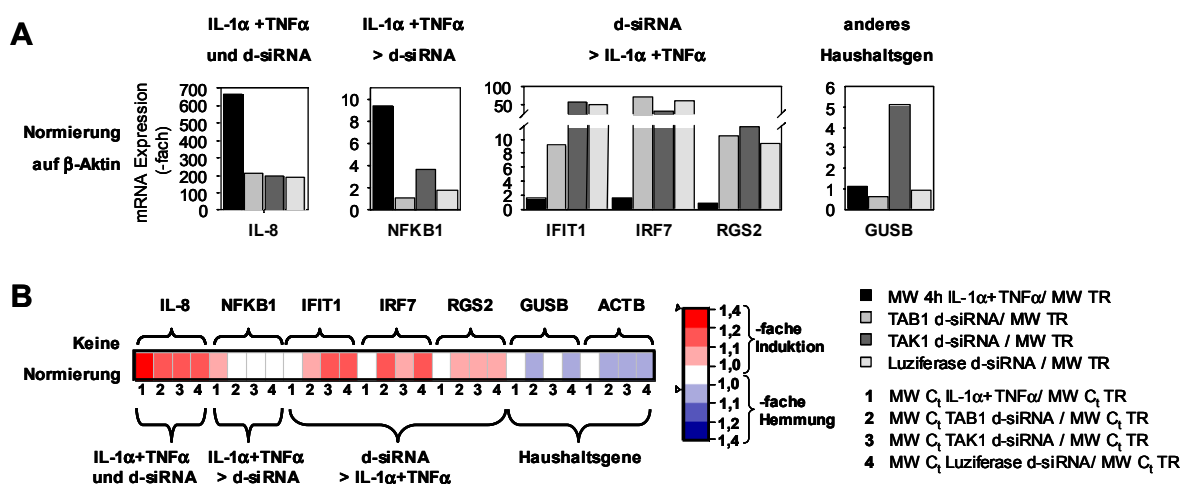
Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, dass alle drei d-siRNA-Gemische in unstimulierten und stimulierten Zellen eine starke Induktion von Genen bewirken, die im Zusammenhang mit dem Interferonsignalweg stehen. Zum Vergleich wurde die zelluläre Antwort auf die entsprechenden Gene nach Behandlung mit chemisch synthetisierten siRNAs gegen TAB1 den d-siRNA-Experimenten gegenübergestellt. Die Arraydaten für das TAB1 siRNA-Experiment wurden ebenfalls, wie oben beschrieben, generiert. Die Gegenüberstellung zeigt, dass eine Applikation von chemisch synthetisierten siRNAs keine vergleichbar starke Expression dieser Gene hervorruft. Nur die Expression von IRF1 und GAPDH ist induziert, wobei die erhöhte Ratio bei dem Haushaltsgen GAPDH möglicherweise ein Artefakt ist. Damit konnte gezeigt werden, dass d-siRNAs im Vergleich zu siRNAs eine sehr starke unspezifische Interferonantwort bewirken.

Durch Real Time PCRs wurden ausgewählte Stimuli- und/ oder d-siRNA-induzierte Genprodukte über die drei Array-Experimente mit Hilfe von *TaqMan-Assays on Demand*

nachuntersucht. Ziel war es, zu prüfen, ob die Einteilung in die oben genannten drei Gruppen auch mit einer sensitiveren Messmethode bestätigt werden kann.

Zur Durchführung der Real Time PCRs wurden die gleichen Proben wie für die Arrayanalyse eingesetzt und *TaqMan-Assays on Demand* für IRF7, IFIT1, RGS2, NFKB1 und IL-8 verwendet. Aus den Gengruppen, die durch Zytokine oder durch Zytokine und d-siRNAs induziert werden, wurde je ein Gen für die Validierung ausgewählt. Von den Genen, die hauptsächlich durch d-siRNAs beeinflusst sind, wurden drei mRNAs untersucht.

In Real Time PCRs mit relativer Quantifizierung wird in dem betrachteten Zellsystem üblicherweise  $\beta$ -Aktin (ACTB) zur Normierung der  $C_T$ -Werte verwendet. Um die Beeinträchtigung der Haushaltsgene zu zeigen, wurde für diese Untersuchung neben  $\beta$ -Aktin  $\beta$ -Glucuronidase (GUSB) als zweites Haushaltsgen mitgeführt.



**Abbildung 16: Induktion ausgewählter Entzündungsgene in Abhängigkeit von der Zellbehandlung (Zytokin, d-siRNA oder Zytokin und d-siRNA)**

Die RNA der Vergleichs- sowie der TAB1, TAK1 und Luziferase *knock down*-Zellen wurde verwendet, um cDNA für eine Real Time PCR zu synthetisieren. Unter Verwendung von *TaqMan-Assays on Demand* gegen IRF7, IFIT1, RGS2, NFKB1 und IL-8 wurde die relative Expression dieser mRNAs bestimmt. (A) Die dargestellten Daten sind auf  $\beta$ -Aktin normiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Die Mittelwerte der stimulierten Transfektionskontrollen (MW 4h IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$ ) bzw. die Werte der jeweiligen d-siRNA-behandelten Proben (TAB1, TAK1 oder Luziferase d-siRNA) wurden auf den Mittelwert der Transfektionsreagenz-Kontrollen (MW TR) bezogen. (B) Für eine Auswertung ohne Normierung auf ein Haushaltsgen wurden die Mittelwerte der  $C_T$ -Werte der stimulierten Transfektionskontrollen (MW  $C_T$  4h IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$ ) bzw. die  $C_T$ -Werte der jeweiligen d-siRNA-behandelten Proben (MW  $C_T$  TAB1, TAK1 oder Luziferase d-siRNA) auf die Mittelwerte der  $C_T$ -Werte der basalen Transfektionskontrollen (MW  $C_T$  TR) bezogen. Da große  $C_T$ -Werte niedrige mRNA-Expressionslevel bedeuten, wurden die Daten in einer invertierten Heatmap (Kästchenfärbung ausgetauscht) dargestellt. Die der Intensität der Feldfärbungen entsprechende Genregulation ist der Farbskala zu entnehmen. Pfeile an der Skala verdeutlichen die maximal auftretende Regulation.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der untersuchten Gene bezüglich ihrer Induktion in Abhängigkeit von der Behandlung. Es sind zwei Auswertungen durchgeführt worden. Im ersten Fall wurden die erhaltenen Real Time PCR-Daten auf  $\beta$ -Aktin mit der im Kapitel 2.14.7 beschriebenen  $\Delta\Delta C_T$ -Methode normiert. Dargestellt sind jeweils die Zytokin- (Mittelwert 4h IL-1 $\alpha$ + TNF $\alpha$ / Mittelwert TR) und d-siRNA-Effekte (TAB1, TAK1 oder Luziferase d-siRNA/ Mittelwert TR) auf die relative mRNA-Expression der angegebenen Gene. Die Ratios für die Zytokineffekte wurden aus dem Mittelwert der stimulierten Transfektionskontrollen und dem Mittelwert der Transfektionskontrollen aller Experimente gebildet. Für die Vergleiche der

d-siRNA-Effekte wurden die TAB1, TAK1 oder Luziferase d-siRNA-Werte auf den Mittelwert der Transfektionskontrollen der drei Experimente bezogen.

Für das zweite Haushaltsgen  $\beta$ -Glucuronidase sind deutliche Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den drei Ratios für die d-siRNA-Effekte zu erkennen, was aufgrund der Array-Ergebnisse zu erwarten war. Dennoch kann für alle Gene der präferentielle Einfluss durch Zytokine, d-siRNAs oder beide, der sich anhand der Heatmap für die einzelnen Gene erkennen lässt, mit der Real Time PCR bestätigt werden. Für die zweite Auswertung (Abbildung 16 B) wird auf eine Normierung auf ein Haushaltsgen verzichtet und die  $C_t$ -Werte verwendet. Es wurden Ratios für die Zytokineffekte aus dem Mittelwert der  $C_t$ -Werte der stimulierten Transfektionskontrollen und dem Mittelwert der  $C_t$ -Werte der basalen Transfektionskontrollen bestimmt. Auch die  $C_t$ -Werte der d-siRNA-behandelten Proben wurden auf den Mittelwert der  $C_t$ -Werte der unstimulierten Transfektionskontrollen bezogen.  $C_t$ -Werte entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen, die erforderlich sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Je größer der  $C_t$ -Wert ist, desto geringer ist die Menge der eingesetzten cDNA bzw. die mRNA-Startmenge. Um die Regulation der Gene in der gewohnten Richtung darzustellen, wurden die Ratios in einer invertierten Heatmap (Färbung der Kästchen ausgetauscht, Abbildung 16 B) abgebildet. Die zweite Auswertung, bei der nicht auf  $\beta$ -Aktin oder  $\beta$ -Glucuronidase normiert wurde, bestätigt die normierten Berechnungen der ersten Auswertung.

Im Gegensatz zu den Auswertungen der Arrays wurden die Werte der unstimulierten und stimulierten Transfektionskontrollen der Real Time PCR gemittelt. Dies ist zulässig, da die PCR unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde.

Bei der Genexpressionsanalyse konnten aufgrund unspezifischer Effekte keine potentiellen TAB1- bzw. TAK1-Zielgene identifiziert werden. Ein Vergleich der Genexpressionsprofile von TAB1 und TAK1 *knock down*-Zellen zeigt Unterschiede, die jedoch nicht als spezifische Effekte gewertet werden können, da sie mit dem summarischen Einfluss der Zellbehandlung und der Probenqualität korrelieren. Auch das Expressionsprofil der Kontroll d-siRNAs konnte nicht dazu beitragen, spezifische *knock down*-Effekte herauszuarbeiten.

Die Tatsache, dass die getesteten d-siRNA-Gemische im Gegensatz zu den eingesetzten synthetischen siRNA-Molekülen eine starke Aktivierung der Interferonantwort zusätzlich zu den entzündundrelevanten Genen hervorrufen, ist eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf die Verwendung dieser Methode für weitere RNAi-Experimente.

## **3.2 Teil II: Untersuchungen zur RNAi-vermittelten Suppression von Transkriptionsfaktoren und Entzündungsgenen während der IL-1 $\alpha$ -induzierten Entzündungsantwort**

### **3.2.1 Auswahl des Untersuchungssystems und der Zielstrukturen zur Modulation von Transkriptionsfaktoren und Entzündungsgenen mit siRNAs**

#### **3.2.1.1 Etablierung des Untersuchungssystems auf Zytokinebene: IL-1 $\alpha$ -induzierte Zytokinantwort von epithelialen KB-Zellen auf mRNA- und Proteinebene**

Entzündung ist ein komplexer Prozess an dem viele Proteine beteiligt sind. Die Abfolge der Expression von Entzündungsgenen muss daher präzise reguliert sein. Ihre Regulation ist eine Funktion der Zeit, die vermutlich durch einen zentralen Regulationsmechanismus auf RNA- und Proteinebene angepasst wird.

In dieser Arbeit soll die IL-1 $\alpha$ -induzierte Entzündungsgenantwort durch RNAi moduliert werden. Um die RNAi-bedingten Effekte effizient detektieren zu können, wurde im Folgenden ein geeignetes Untersuchungssystem ausgewählt. Generell ist es möglich, Entzündungsgenantwort auf mRNA- oder Proteinebene im miniaturisierten Arrayformat zu messen. Für einen Vergleich der mRNA- und Proteinexpression wurden zur Analyse der mRNA-Spiegel DNA-Microarrays (Entzündungsarray HA286) und zur Untersuchung der translatierten Genprodukte Proteinarrays (*RayBio*<sup>®</sup> *Human Cytokine Antibody Arrays VI und VII*) durchgeführt. Mit Hilfe des Proteinarrays lassen sich 120 humane Zytokine parallel untersuchen. Dieser Array beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion.

KB-Zellen wurden für die Analyse der mRNAs für 0,5h, 1h und 4h sowie für die Untersuchung der sezernierten Zytokine für 24h mit IL-1 $\alpha$  behandelt. Zusätzlich ist der Effekt einer Inhibition der drei bekanntesten MAPK-Signalwege (JNK, ERK, p38 MAPK) auf die IL-1 $\alpha$ -induzierte Expression entzündlicher Genprodukte (mRNA und Proteine) untersucht worden. Durch Einsatz der spezifischen, niedermolekularen Hemmstoffe PD98059, SP600125 und SB203580 war es möglich die Kinasen JNK und p38 MAPK direkt und ERK1, 2, 5 indirekt zu blockieren (Bennett et al., 2001; Schultz et al., 1997; Alessi et al., 1995). Zusätzlich wurde der alleinige Effekt von PD98059 auf die Expression der Entzündungsgene untersucht, da es die stärkste Hemmung dieser Genprodukte bewirkt.

Einerseits lassen sich durch die Blockade der MAPK Aussagen treffen, inwieweit die Weiterleitung des IL-1 $\alpha$ -Signals, das zur Induktion der IL-1 $\alpha$ -regulierten Genprodukte führt, über die MAPK-Signalwege läuft. Andererseits kann abgeschätzt werden, wie sensitiv die zwei Untersuchungssysteme Veränderungen im Vergleich zum Basalzustand detektieren. Die verwendete Dosis der Inhibitoren ermöglicht eine spezifische Hemmung, ohne dabei andere MAPK zu inhibieren (Davies et al., 2000).

Beide Arraytypen wurden parallel mit den entsprechenden Proben hybridisiert und ausgewertet. Zwischen den Sonden der Arrays gibt es eine Schnittmenge von 26 Genprodukten (Tabelle 4), die miteinander verglichen werden können.

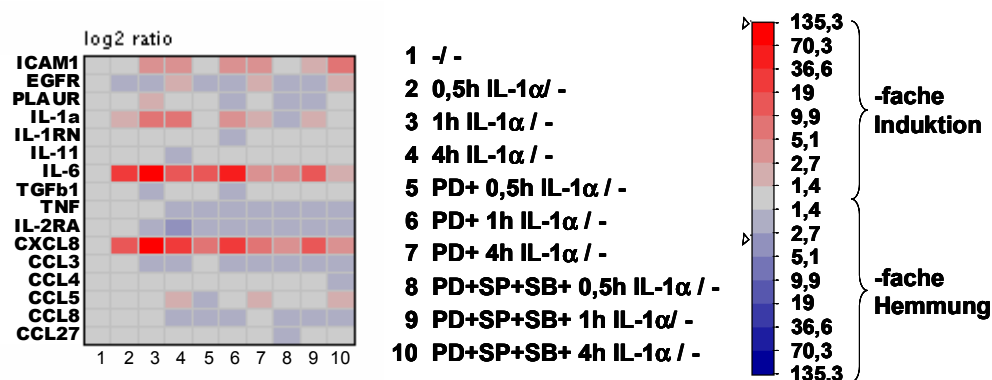
Zytokinarray	Entzündungsarray	Funktionelle Gruppeneinteilung
ICAM-1	ICAM1	Adhäsionsmolekül
EGF-R	EGFR	Wachstumsfaktor-Rezeptor
uPAR	PLAUR	Enzym, Matrixprotein, Andere
IL-1 $\alpha$	IL-1 $\alpha$	Zytokin
IL-1 $\beta$	IL-1 $\beta$	Zytokin
IL-1ra (IL-1RN)	IL-1RN	Zytokin
IL-2	IL-2	Zytokin
IL-6	IL-6	Zytokin
IL-10	IL-10	Zytokin
IL-11	IL-11	Zytokin
IL-12 p40	IL-12 $\alpha$	Zytokin
IL-16	IL-16	Zytokin
GM-CSF	CSF2	Zytokin
TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 1	Zytokin
TNF $\alpha$	TNF	Zytokin
IFN $\gamma$	IFN $\gamma$	Zytokin
IL-2 R $\alpha$	IL-2R $\alpha$	Zytokinrezeptor
ENA-78	CXCL5	Chemokin
IL-8	CXCL8/ IL-8	Chemokin
MCP-1	CCL2	Chemokin
MIP-1 $\alpha$	CCL3	Chemokin
MIP-1 $\beta$	CCL4	Chemokin
RANTES	CCL5	Chemokin
MCP-2	CCL8	Chemokin
Eotaxin	CCL11	Chemokin
CTACK	CCL27	Chemokin

**Tabelle 4: 26 Genprodukte sind sowohl auf dem Zytokinarray (*RayBio*<sup>®</sup> *Human Cytokine Antibody Array VI und VII*) als auch auf dem Entzündungsarray (HA286) vorhanden**

Rot umrahmt sind stark sezernierte Proteine, die auf dem Zytokinarray gemessen wurden (Abbildung 18) und für die es auch Sonden auf dem Entzündungsarray gibt.

Die Ergebnisse des DNA-Microarrays für die Genprodukte der Schnittmenge (Tabelle 4) sind in Abbildung 17 vorgestellt.

Von den 16 Genprodukten der Schnittmenge mit dem Zytokinarray sind sieben mRNAs (ICAM1, EGFR, PLAUR, IL-1 $\alpha$ , IL-6, CXCL8, CCL5) zu mindestens einem der drei Stimulationszeitpunkte über 1,5-fach durch IL-1 $\alpha$  induziert, und wie Tabelle 5 verdeutlicht zeigen diese zu wenigstens einem Stimulationszeitpunkt eine mindestens 20%ige Hemmung durch PD98059 und/ oder der Kombination der drei MAPK-Inhibitoren. Eine Ausnahme bildet EGFR: Der alleinige Einsatz von PD98059 kann die mRNA-Expression um 30% hemmen, während die Kombination der drei MAPK-Inhibitoren keinen Einfluss hat. Dieser Befund ist vermutlich ein Artefakt. Vier der IL-1 $\alpha$ -induzierten mRNAs (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und CXCL8) zeigen eine starke MAPK-Abhängigkeit und sind über alle Stimulationszeitpunkte durch die Inhibitoren hemmbar.



**Abbildung 17: IL-1 $\alpha$ -Induktion und Hemmeffekte durch MAPK-Inhibitoren auf ausgewählte Entzündungsgene auf mRNA-Ebene**

Für die Darstellung der Effekte von PD98059 (PD), SP600125 (SP) und SB203580 (SB) auf die Schnittmengengene (Tabelle 4) wurden die Ratios durch die IPC-Werte der Schnittmengengene mit Intensitäten ab einem Wert von 100 berechnet. Die IPCs wurden durch die unbehandelte Kontrolle (-) des Experimentes geteilt. Die der Intensität der Feldfärbungen entsprechende Genregulation ist der Farbskala zu entnehmen. Pfeile an der Skala verdeutlichen die maximal auftretende Regulation.

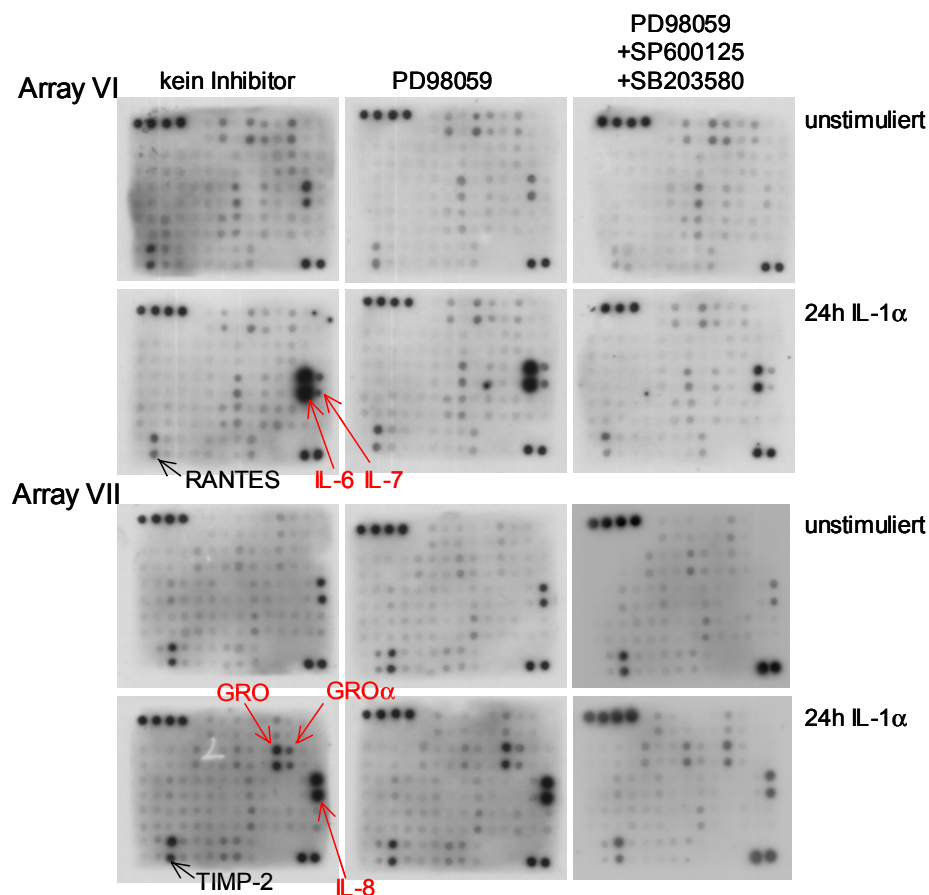
Diese Daten demonstrieren, dass die meisten der hier aufgelisteten Entzündungsgene unter der partiellen Kontrolle mindestens eines der drei klassischen MAPK-Signalwege stehen und ihre Aktivierung durch Inhibitoren dieser Signalwege vermindert werden kann. Jedoch kann für keine mRNA die Expression komplett aufgehoben werden; die MAPK sind folglich nicht essentiell für die Weiterleitung des IL-1 $\alpha$ -Signals.

Gen-sonden	Hemmung [%] durch					
	PD bei 0,5h IL1 $\alpha$	PD bei 1h IL1 $\alpha$	PD bei 4h IL1 $\alpha$	PD+SP+SB bei 0,5h IL1 $\alpha$	PD+SP+SB bei 1h IL1 $\alpha$	PD+SP+SB bei 4h IL1 $\alpha$
ICAM1	21	36	24	24	43	-
EGFR	14	18	30	-	4	9
PLAUR	19	55	8	29	60	28
IL-1 $\alpha$	41	54	79	54	77	84
IL-1RN	2	17	-	13	9	-
IL-11	1	-	-	5	-	-
IL-6	50	69	74	79	90	82
TGF $\beta$ 1	10	-	-	5	-	-
TNF	27	37	-	35	32	-
IL-2RA	28	18	-	40	6	-
CXCL8	60	73	78	78	89	88
CCL3	1	23	-	24	4	-
CCL4	5	4	-	24	3	20
CCL5	10	22	38	-	41	25
CCL8	24	23	-	38	25	1
CCL27	10	25	-	30	22	11

**Tabelle 5: Einfluss der MAPK-Hemmstoffe PD98059 (PD), SP600125 (SP) und SB203580 (SB) auf ausgewählte Entzündungsgene auf mRNA-Ebene**

Die Tabelle stellt die PD98059- und Hemmstoffkombination-bedingte Inhibition der 16 Schnittmengengene dar. Die Ratios berechnen sich anhand der IPC-Werte der Gene mit Intensitäten ab einem Wert von 100. Für die dargestellte Hemmung wurden die mit Inhibitoren behandelten, IL-1 $\alpha$ -stimulierten Proben in Beziehung zu den Proben ohne Hemmstoff (0,5h, 1h und 4h IL-1 $\alpha$ ) gesetzt und von 100 abgezogen. Hemmeffekte ab 20% sind fett gedruckt.

Um die Ergebnisse der beiden Arraytypen miteinander vergleichen zu können, wurde das Ergebnis des Zytokinarrays in Abbildung 18 dargestellt. Diese Abbildung zeigt die Hybridisierung der Überstände von unbehandelten und behandelten (Inhibitoren und Stimuli) KB-Zellen auf den Membranen des Zytokinarrays.

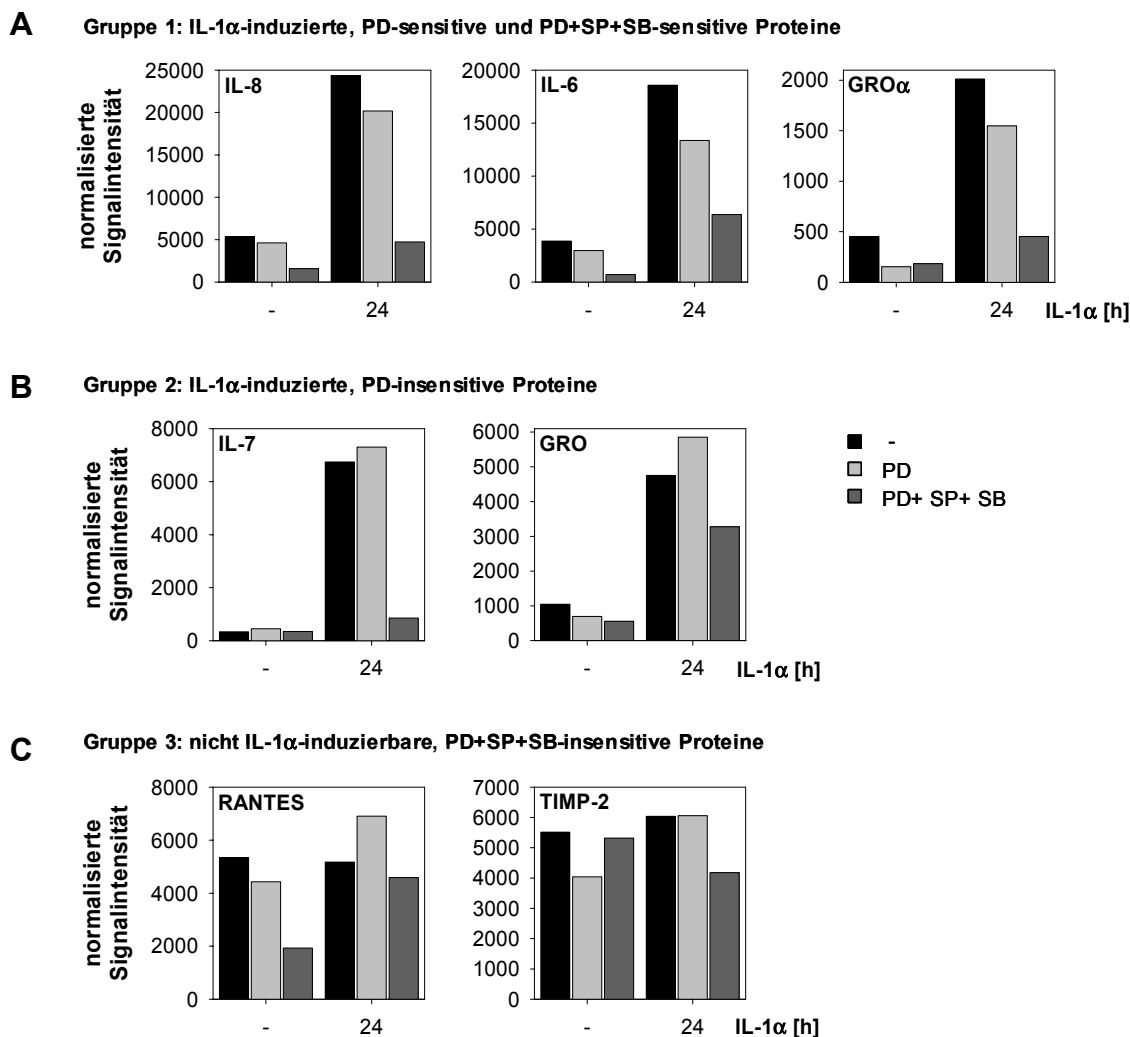


**Abbildung 18: Detektion von sezernierten Proteinen mittels Zytokinarray (RayBio® Human Cytokine Antibody Array VI und VII)**

Zur Hybridisierung der Zytokinarray-Membranen VI und VII wurde 1,2ml Überstand von behandelten und/ oder stimulierten und unbehandelten KB-Zellen verwendet. Vor Stimulation der Zellen für 24h mit IL-1 $\alpha$  wurde je ein Drittel der Ansätze für 0,5h mit den Inhibitoren PD98059 (PD), SP600125 (SP) und SB203580 (SB) oder PD98059 alleine inkubiert. Die hybridisierten Proteine wurden durch biotinkonjugierte Antikörper erkannt. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz nachdem HRP-konjugiertes Streptavidin an Biotin gekoppelt wurde. Links oben und rechts unten befinden sich Positivkontrollen auf den einzelnen Membranen. In der Reihe unter den vier oberen Positivkontrollen befinden sich Negativkontrollen. Die Signalintensitäten der spots wurden auf die Positivkontrollen normiert. Rot markierte Proteine zeigen eine IL-1 $\alpha$ -abhängige Regulation, während schwarz markierte Proteine stark sezerniert, aber nicht durch IL-1 $\alpha$  reguliert werden. Eine komplette Liste der Antikörper des Zytokinarrays ist im Anhang zu finden.

Auf den Arrays VI und VII (Abbildung 18) ist für ungefähr 30 Proteine ein schwaches Signal zu erkennen. Es kann nicht unterschieden werden, ob diese Proteine in geringem Maße sezerniert werden oder ob es sich um unspezifische Hintergrundsignale handelt. Zwei Proteine (RANTES und TIMP-2) werden stark sezerniert, lassen jedoch keine Regulation durch IL-1 $\alpha$  erkennen (Abbildung 18 und Abbildung 19 C). Bei fünf Proteinen (IL-8, IL-7, IL-6, GRO, GRO $\alpha$ ) ist eindeutig eine erhöhte Sekretion als Antwort auf IL-1 $\alpha$  nachweisbar (Abbildung 18 und Abbildung 19 A, B). Die mit Röntgenfilmen detektierten Signale des

Zytokinarrays wurden mit ImageJ (Kapitel 2.13) quantifiziert und auf die Positivkontrollen normiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.



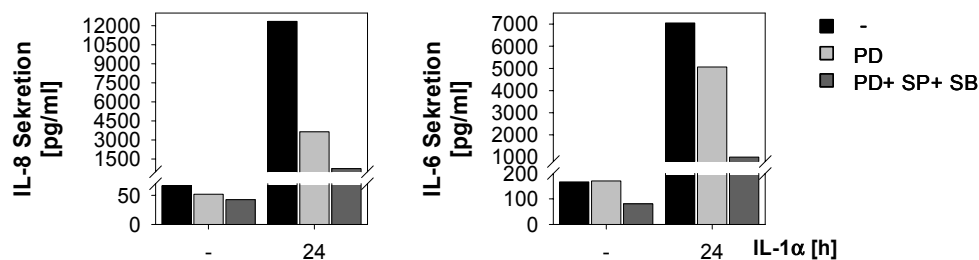
**Abbildung 19: Normalisierte Signalintensitäten von sezernierten und partiell IL-1 $\alpha$ -regulierten Proteinen**

Dargestellt sind die normalisierten Signalintensitäten von sezernierten Proteinen des Zytokinarrays aus Abbildung 18. Die Signale der spots der Röntgenfilme des Zytokinarrays wurden mit ImageJ (Kapitel 2.13) quantifiziert, über die Positivkontrollen normiert und drei Gruppen zugeordnet. Die sezernierten Proteine der Gruppe 1 (A) sind sowohl PD98059 (PD)-sensitiv als auch (partiell) hemmbar durch die Inhibitor Kombination aus PD98059, SP600125 (SP) und SB203580 (SB). In Gruppe 2 (B) sind die PD98059-insensitiven Proteine dargestellt, während Proteine der Gruppe 3 keine IL-1 $\alpha$ -Induktion zeigen.

Wie die IL-8- und IL-6-spots der Membranen „kein Inhibitor“ und „PD98059“ in Abbildung 18 erkennen lassen, liegen die Signale mit großer Wahrscheinlichkeit nicht im linearen Bereich, so dass eine Quantifizierung mit Hilfe der Signalintensität für diese spots nur eine ungefähre Konzentration der Interleukine im Medium angeben kann. Um eine genauere Konzentration von sezerniertem IL-8 und IL-6 in den Überstand zu erhalten, wurde für IL-8 und IL-6 je ein ELISA mit Verdünnungen der gleichen Überstände, die auch beim Zytokinarray eingesetzt wurden, durchgeführt. Mit Hilfe der über einen größeren Bereich linearen Messmethode (ELISA) konnte für IL-8 eine 186-fache und für IL-6 eine 42-fache Induktion durch IL-1 $\alpha$  im Überstand gemessen werden (Abbildung 20). Diese Daten entsprechen im Gegensatz zu



den Zytokinarray-Resultaten eher den Ergebnissen, welche in der Arbeitsgruppe Kracht zur IL-1 $\alpha$ -Induktion von IL-8 und IL-6 existieren.



**Abbildung 20: Validierung der Zytokinarray-Ergebnisse für IL-8 und IL-6 durch spezifische ELISAs**

Die IL-8- und IL-6-Konzentrationen der Überstände der KB-Zellen (24h mit IL-1 $\alpha$  stimuliert oder unbehandelt) wurden mit Hilfe von ELISA bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde, wie in der Abbildung angegeben, mit dem Inhibitor PD98059 (PD) oder mit der Kombination aus PD98059, SP600125 (SP) und SB203580 (SB) behandelt.

Wie aus Tabelle 6 sowie Abbildung 19 und Abbildung 20 hervorgeht, bewirkt IL-1 $\alpha$  mit einer über 100-fachen Hochregulation die stärkste Antwort auf IL-8, gefolgt von einer über 40-fachen IL-6-Sekretion und einer über 20-fachen Induktion bei IL-7. Bei GRO und GRO $\alpha$  liegen die Ratios bei ungefähr vier.

Protein	IL-1 $\alpha$ -Induktion	Hemmung [%] durch	
		PD bei IL-1 $\alpha$	PD+ SP+ SB bei IL-1 $\alpha$
IL-8	186 (4,5)	71 (17)	94 (81)
IL-7	20,3	-	87
IL-6	42 (4,8)	28 (28)	86 (66)
GRO	4,5	-	31
GRO $\alpha$	4,4	23	77
RANTES	1,0	-	11
TIMP-2	1,1	-	31

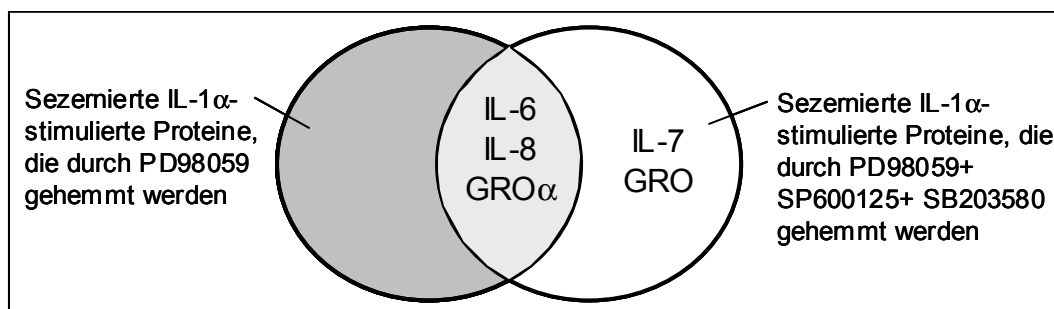
**Tabelle 6: IL-1 $\alpha$ -Induktion und Hemmeffekte durch MAPK-Inhibitoren auf sieben sekretorische Proteine, gemessen mit dem Zytokinarray aus Abbildung 18 und den ELISA-Versuchen aus Abbildung 20**

Links in der Tabelle sind die normalisierten Ratio-Werte für die IL-1 $\alpha$ -Induktion eingetragen, wobei die in Klammern gesetzten Ratios für IL-8- und IL-6-Werte des Zytokinarray-Experiments darstellen. Der rechte Teil der Tabelle listet die Hemmeffekte durch PD98059 (PD) alleine oder durch die Kombination der drei MAPK-Hemmstoffe (PD98059, SP600125 (SP), SB203580 (SB)) auf die sezernierten Proteine in Prozent auf. Fett gedruckt sind im linken Tabellenteil die IL-1 $\alpha$ -induzierten Proteine und in den beiden rechten Spalten eine über 20% gehemmte Expression durch die Inhibitoren.

Alle fünf IL-1 $\alpha$ -regulierten Proteine sind durch die Inhibitorenkombination aus PD98059, SP600125 und SB203580 hemmbar, wobei GRO eine schwache partielle (30%) und IL-8, IL-7, IL-6 und GRO $\alpha$  eine 80-90%ige Hemmung zeigen. GRO und IL-7 sind nicht PD98059-hemmbar, während die anderen drei der IL-1 $\alpha$ -regulierten Proteine eine Hemmung um 20% (GRO $\alpha$ ), 30% (IL-6) und 70% (IL-8) aufweisen. Für GRO und IL-7 gilt, dass IL-1 $\alpha$  die beiden Proteine nicht über den ERK-Signalweg induziert. IL-7 wird hauptsächlich durch die Kinasen p38 MAPK und/ oder JNK aktiviert, GRO nur zu einem geringen Anteil durch die zuletzt genannten Kinasen. RANTES und TIMP2 zeigen ebenfalls keine PD98059-Hemmung und nur eine schwache partielle Inhibition (zwischen 11 und 30%) durch die drei Hemmstoffe im

IL-1 $\alpha$ -stimulierten System. Der Einsatz dieser Moleküle hat keine selektive Blockade eines Genproduktes zur Folge, sondern trifft, wie erwartet, mehrere Gene.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse des Zytokinarrays nochmals zusammengefasst.



**Abbildung 21: Hemmbarkeit der fünf IL-1 $\alpha$ -regulierten Proteine**

Alle fünf IL-1 $\alpha$ -regulierten Proteine sind durch die Inhibitorenkombination aus PD98059, SP600125 und SB203580 hemmbar; zwei der fünf Proteine sind nicht alleine durch PD98059-hemmbar.

Für einen mRNA/ Protein-Vergleich zur Herstellung einer Korrelation zwischen der Expression der mRNA einerseits und der Sekretion der entsprechenden Proteine andererseits konnten als Schnittmenge zwischen stark sezernierten Proteinen (gemessen durch den Zytokinarray) und mRNAs (gemessen durch den Entzündungsarray) nur IL-8 (CXCL8), IL-6 und RANTES (CCL5) herangezogen werden. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der mRNA- und Protein-Untersuchung gegenübergestellt. Um die zwei unterschiedlichen Arraytypen miteinander vergleichen zu können, sind die Effekte der Hemmungen prozentual angegeben. Bei diesem Vergleich muss immer bedacht werden, dass unterschiedliche Stimulationszeitpunkte miteinander verglichen werden.

Unter-suchungs-ebene	Methode	Bedingung	Hemmeffekte [%]		
			IL-8	IL-6	RANTES
mRNA	HA 286	PD bei 0,5h IL-1 $\alpha$	60	50	10
mRNA	HA 286	PD bei 1h IL-1 $\alpha$	73	69	22
mRNA	HA 286	PD bei 4h IL-1 $\alpha$	78	74	38
Protein	Zytokinarray	PD bei 24h IL-1 $\alpha$	(17)	28	-
Protein	ELISA	PD bei 24h IL-1 $\alpha$	71	28	n.b.
mRNA	HA 286	PD+ SP+ SB bei 0,5h IL-1 $\alpha$	78	79	-
mRNA	HA 286	PD+ SP+ SB bei 1h IL-1 $\alpha$	89	90	41
mRNA	HA 286	PD+ SP+ SB bei 4h IL-1 $\alpha$	88	82	25
Protein	Zytokinarray	PD+ SP+ SB bei 24h IL-1 $\alpha$	(81)	(66)	11
Protein	ELISA	PD+ SP+ SB bei 24h IL-1 $\alpha$	94	86	n.b.

**Tabelle 7: Vergleich der Hemmeffekte von IL-8, IL-6 und RANTES auf mRNA- und Proteinebene durch MAPK-Inhibitoren**

Diese Tabelle fasst Tabelle 5 und Tabelle 6 für IL-8, IL-6 und RANTES zusammen. Es sind die normalisierten Ratio-Werte (Inhibitor+ IL-1 $\alpha$ / IL-1 $\alpha$ ) eingetragen. Bei IL-8 ist die Ratio aus PD+ 24h IL-1 $\alpha$ / 24h IL-1 $\alpha$  für den Zytokinarray eingeklammert, da der ELISA den Wert vom Zytokinarray nicht bestätigen konnte. PD98059 (PD), SP600125 (SP), SB203580 (SB), n.b.: nicht bestimmt

Ausschlaggebend für IL-8 und IL-6 sollen die ELISA-Werte sein und nicht die Zytokinarraydaten. Die eingeklammerten Werte des Zytokinarrays konnten vom ELISA nicht bestätigt werden.

Im stimulierten System bewirkt PD98059 auf mRNA-Ebene eine deutlich stärkere Hemmung von IL-6 als auf die Sekretion des Proteins. Unter Verwendung des Inhibitorengemisches wird bei IL-6 auf Protein und mRNA ein vergleichbarer Hemmeffekt erzielt. Im Gegensatz zu IL-6 ist bei IL-8 das Protein und die mRNA durch PD98059 gleich reguliert. Auch die Kombination der Inhibitoren zeigt einen vom sezernierten Protein zur exprimierten mRNA analogen Hemmeffekt. Möglicherweise zeigen die mRNAs IL-6 und IL-8 eine Abhängigkeit des PD98059-Hemmeffektes von der Stimulationsdauer.

Bei RANTES lässt sich auf Proteinebene keine Induktion durch IL-1 $\alpha$  beobachten, während die mRNA nach vierstündiger IL-1 $\alpha$ -Stimulation etwa vier- bis fünffach induziert wird. Unter PD98059-Einfluss zeigt die mRNA eine Abhängigkeit des Hemmeffektes von der Stimulationsdauer, jedoch kann das Protein nicht durch den Inhibitor des ERK-Signalwegs gehemmt werden. Bei Verwendung der Kombination der drei Hemmstoffe scheint es, wie bei IL-6 und IL-8 auch, keine Zeitabhängigkeit zu geben. Der stärkste Effekt auf mRNA-Ebene zeigt sich durch eine Behandlung mit allen drei Inhibitoren nach 1h IL-1 $\alpha$  (40% Hemmung), während auf Ebene der Proteine maximal um 10% gehemmt werden.

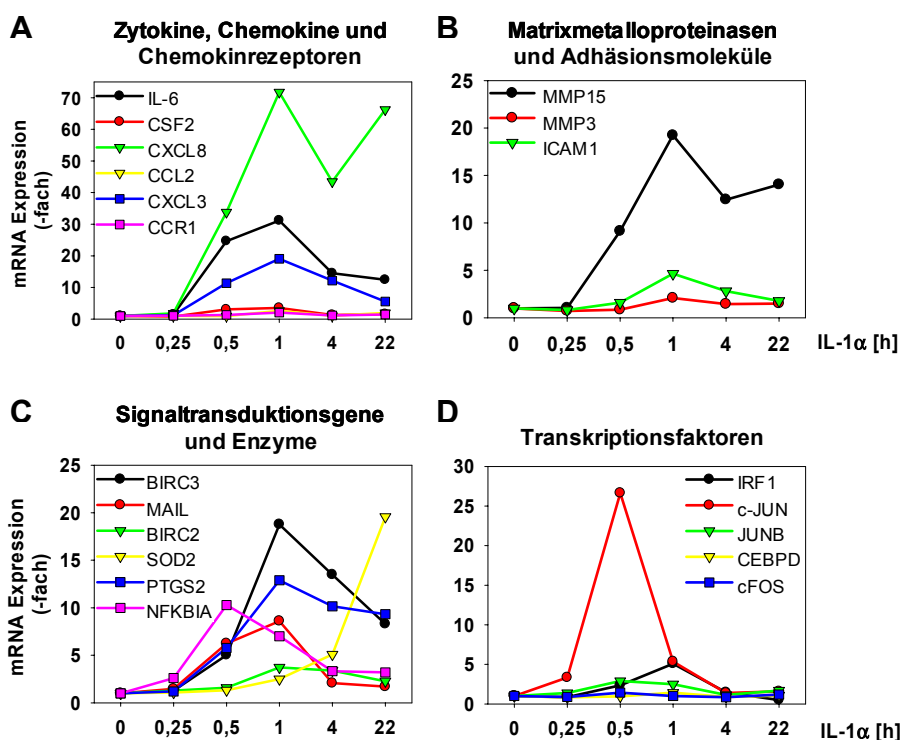
Der Vergleich der zwei Untersuchungssysteme zeigt, dass auf mRNA-Ebene Änderungen empfindlicher gemessen werden können. Es wurden daher DNA-Microarrays mit den resultierenden mRNA-Entzündungsprofilen als Methode zur Erfassung von siRNA-bedingten Änderungen ausgewählt.

### **3.2.1.2 Untersuchung auf Ebene der Transkriptionsfaktoren und Entzündungsgene**

Abbildung 22 stellt einen Vergleich der mRNA-Expressionskinetik ausgewählter Entzündungsgene des Entzündungsarrays von humanen epithelialen KB-Zellen dar. Diese wurden für die angegebenen Zeitspannen mit IL-1 $\alpha$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Durchführung und Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren. Abbildung 22 A, B und C zeigt 15 Vertreter von stark IL-1 $\alpha$ -induzierten Genen. Viele der Entzündungsgene zeigen eine anhaltende Genexpression; sie sind noch nach 22-stündiger Stimulation mit IL-1 $\alpha$  um mehr als den Faktor zehn induziert. Das Expressionsmaximum der meisten Entzündungsgene liegt bei einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulation. Da IL-8 und IL-6 aus der Gruppe der Chemokine und Zytokine die am stärksten IL-1 $\alpha$ -responsiven Expressionsprofile aufwiesen, wurden sie als Zielstrukturen zur siRNA-vermittelten Modulation ausgewählt (Kapitel 3.2.3).

Der Entzündungsarray trägt fünf Sonden für entzündungsrelevante Transkriptionsfaktoren. Diese sind in Abbildung 22 D dargestellt. Es wird deutlich, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren eine erste Welle in der Genexpression als Antwort auf IL-1 $\alpha$  darstellt, die mit großer Wahrscheinlichkeit einen Beitrag zur Expression anderer Entzündungsgene leistet. Im Gegensatz zu der anhaltenden Genexpression vieler Entzündungsgene ist die Induktion der Transkriptionsfaktoren nur transient. Von den vier Transkriptionsfaktoren, die

schon nach 30 Minuten maximal IL-1 $\alpha$ -induziert sind, gehören drei zur JUN/ FOS-Familie und ein Faktor zur C/EBP-Familie.



**Abbildung 22: Kinetik der IL-1 $\alpha$ -abhängigen Genexpression ausgewählter Entzündungsgene des Entzündungsarrays von humanen KB-Zellen**

KB-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach RNA-Isolation wurde die synthetisierte markierte cRNA auf den Entzündungsarrays HA286 hybridisiert und die Analyse mittels der in Kapitel 2.16.1.4 angegebenen Programme ausgewertet. Die IPC-Werte (Fluoreszenzintensitäten mit Werten unter 100 wurden herausgefiltert) wurden als log<sub>2</sub> Ratios, bezogen auf die unbehandelte Probe dargestellt. Die Abbildung zeigt eine Auswahl von 20 stark IL-1 $\alpha$ -induzierten Genen: (A) Zytokine, Chemokine und Chemokinrezeptoren, (B) Matrixmetalloproteinasen und Adhäsionsmoleküle, (C) Signaltransduktionsgene und Enzyme und (D) Transkriptionsfaktoren.

Um systematischer zu untersuchen, inwieweit Transkriptionsfaktoren bei der initialen Entzündungsgenexpression an der Regulation der einzelnen, in Abbildung 22 A-C gezeigten, Gene beteiligt sind, wurde im Rahmen der Doktorarbeit in Kooperation mit der Firma MWG Biotech ein Transkriptionsfaktorarray entwickelt. Ziel war es, eine globale Antwort der IL-1 $\alpha$ -vermittelten Entzündungssituation auf Ebene der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Das Microarray-Format bietet derzeit eine der ökonomischsten Möglichkeiten zur parallelen Expressionsanalyse einer Vielzahl an Zielsequenzen einer Probe unter identischen Versuchsbedingungen.

Der humane Transkriptionsfaktorarray TFhum umfasst, wie Tabelle 8 zeigt, sämtliche Gene der bZIP-Proteinfamilien, wie z.B. die JUN-, FOS-, ATF-, MAF- und C/EBP-Familie, aber auch Vertreter der STAT- und NFAT-Proteine, die keine bZIP-Proteine sind, aber mit JUN/ FOS-Familienmitgliedern interagieren. Neben diesen trägt der Array Sonden für weitere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Mitglieder aus der REL/ NF- $\kappa$ B-Familie. Unter Verwendung der Veröffentlichung von Tupler et al. konnten zudem neue, durch Sequenzierung des humanen Genoms identifizierte Mitglieder von Transkriptionsfaktor-Familien, deren Funktion aber noch unbekannt ist, in die Transkriptionsfaktorliste mit aufgenommen werden (Tupler et

al., 2001). Diese sogenannten ESTs (*expressed sequence tags*) sind kurze cDNA-Fragmente, die aus mRNAs erhalten werden und deshalb als charakteristische Marker für kodierende Abschnitte im Genom fungieren.

Ausgehend von einer Liste mit von mir ausgewählten Transkriptionsfaktoren wurden von der Bioinformatik-Abteilung bei MWG Biotech im Idealfall drei Oligonukleotidsonden pro Genprodukt entworfen, die möglichst nahe am 3'-Ende der cDNA lokalisiert sind (fast 70% der Sonden erfüllen dieses Kriterium). Insgesamt trägt der Array 348 Sonden für 138 Transkriptionsfaktoren und 19 Haushaltsgene. Sonden als Duplikate oder Triplikate reduzieren die Varianz eines Microarray-Experiments. Da die Sonden nicht validiert wurden, sind Abweichungen zwischen den Intensitäten der Gene mit Duplikaten oder Triplikaten möglich.

<b>bZIP-Proteine</b>	<b>keine bZIP-Proteine, aber Interaktionen mit JUN/ FOS-Familienmitgliedern</b>	<b>weitere Transkriptionsfaktoren</b>
JUN-Familie	STAT-Familie	IRF-Familie
FOS-Familie	bHLH-Familie	REL/ Dorsal-Familie
ATF-Familie	EST-Familie	REL/ NF- $\kappa$ B-Familie
MAF-Familie	Steroidhormonrezeptor-Familie	Zinkfingertranskriptionsfaktor-Familie
CNC-Familie	SMAD-Familie	andere Proteine
C/EBP-Familie	NFAT-Familie	
Oasis-Familie		
PAR-Familie		
HCF-Familie		

**Tabelle 8: Proteinfamilien des humanen Transkriptionsfaktorarrays TFhum**

Eine komplette Liste der Transkriptionsfaktor-Sonden ist im Anhang zu finden.

Abbildung 23 zeigt die Übersicht einer IL-1 $\alpha$ -Zeitreihe von Transkriptionsfaktoren in KB-Zellen. Für diese Microarray-Analyse wurden die gleichen Proben verwendet wie bereits für die Hybridisierung des Entzündungsarrays (Abbildung 22). Die Arraydaten wurden, wie in Kapitel 2.16.1.4 beschrieben, ausgewertet und unter Verwendung der Software Mayday in Form einer Heatmap dargestellt.

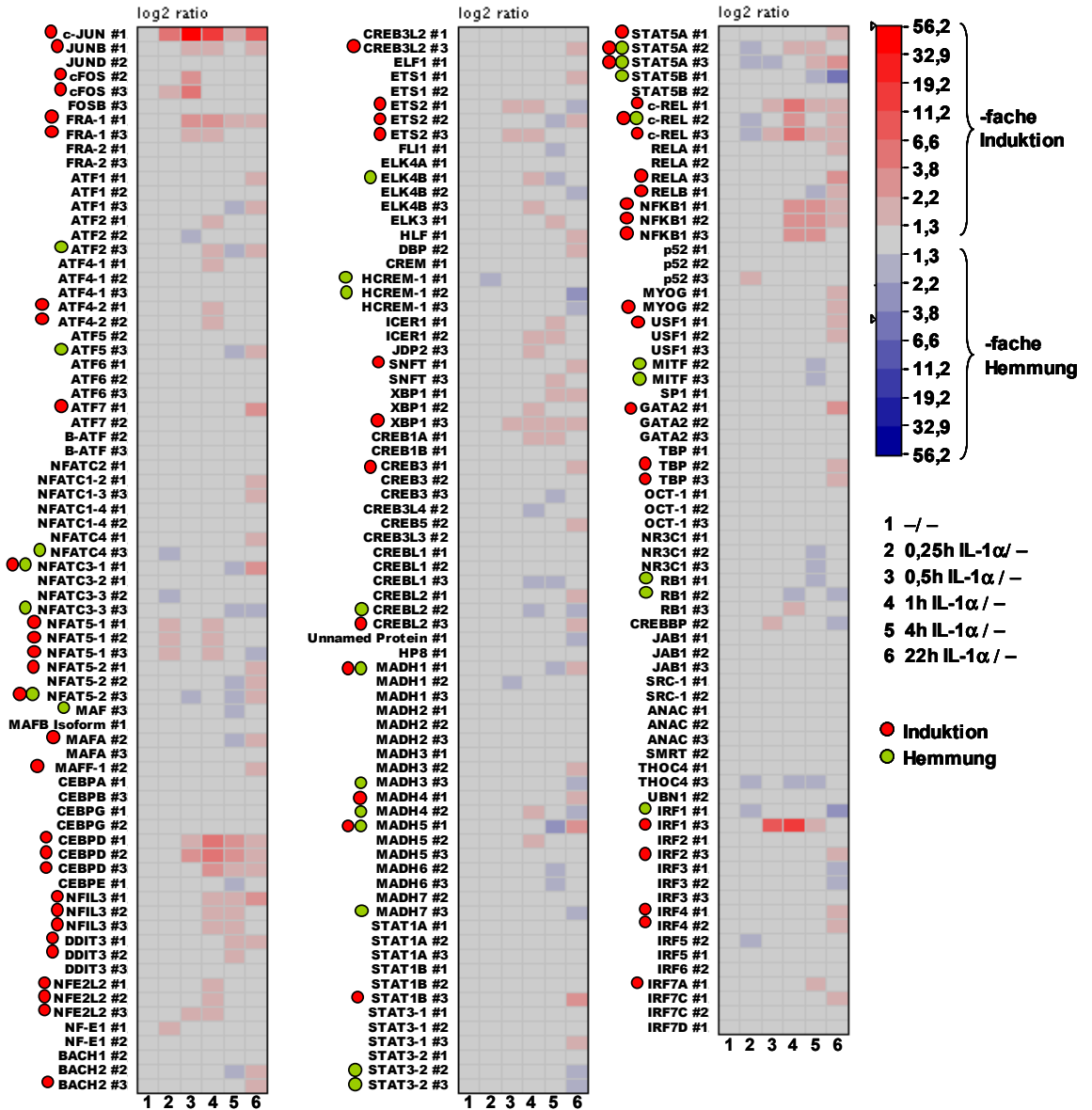


Abbildung 23: IL-1α-Kinetik der Genexpression von Transkriptionsfaktoren aus humanen KB-Zellen

KB-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit IL-1α (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach dem Ernten der Zellen und RNA-Isolation wurde die synthetisierte markierte cRNA auf dem Transkriptionsfaktorarray TFHum hybridisiert und mittels der in Kapitel 2.16.1.4 angegebenen Programme ausgewertet. Sonden (zum Teil mehrere Sonden pro Gen, #1 bis #3) mit Fluoreszenzintensitäten mit Werten unter 100 wurden herausgefiltert. Dargestellt sind die IPC-Werte der verbleibenden Transkriptionsfaktor-Sonden (218 Sonden, 107 Transkriptionsfaktoren) als log2 Ratios, bezogen auf die unbehandelte Probe. Die 22h IL-1α-stimulierte Probe wurde auf eine Kontrollprobe bezogen, die ohne IL-1α-Behandlung parallel kultiviert wurde. Sind zwei oder drei Sonden für ein Gen vorhanden, sind diese untereinander aufgelistet. Rote und grüne Punkte links der Sondennamen symbolisieren eine mindestens 1,5-fache Induktion bzw. Hemmung. Die der Intensität der Feldfärbungen entsprechende Genregulation ist der Farbskala zu entnehmen. Pfeile an der Skala verdeutlichen die maximal auftretende Regulation.

Die 19 Haushaltsgene des Transkriptionsfaktorarrays zeigen kaum Veränderungen (keine Daten gezeigt), so dass die sechs Arrays gut vergleichbar sind. Abbildung 23 verdeutlicht, dass der größte Teil der Transkriptionsfaktoren nicht auf eine Stimulation mit IL-1α reagiert. Von den 107 Transkriptionsfaktoren wurden 39 Gene auf mRNA-Ebene zu mindestens einem Zeitpunkt wenigstens 1,5-fach durch IL-1α induziert (Abbildung 23, rote Punkte). Eine IL-1α-abhängige Herunterregulation zu mindestens einem Zeitpunkt betrifft 22 mRNAs

(Abbildung 23, grüne Punkte). Sie lässt sich hauptsächlich bei den Stimulationszeitpunkten 4h und 22h erkennen. Die IL-1 $\alpha$ -induzierten mRNAs sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Ab dem Stimulationszeitpunkt	Mindestens 1,5-fache IL-1 $\alpha$ -Induktion von
0,25h IL-1 $\alpha$	c-JUN, NFAT5-1
0,5h IL-1 $\alpha$	JUNB, cFOS, FRA-1, ETS2, IRF1, CEBPD
1h IL-1 $\alpha$	c-REL, NFKB1, STAT5A, NFE2L2, ATF4-2
4h IL-1 $\alpha$	XBP1, IRF7A, DDIT3, NFIL3
22h IL-1 $\alpha$	ATF7, BACH2, CREB3, CREB3L2, CREBL2, GATA2, IRF2, IRF4, MADH1, MADH4, MADH5, MAFA, MAFF-1, MYOG, NFAT5-2, NFATC3-1, RELA, RELB, SNFT, STAT1B

**Tabelle 9: IL-1 $\alpha$ -induzierte Transkriptionsfaktor-mRNAs des Experimentes aus Abbildung 23**

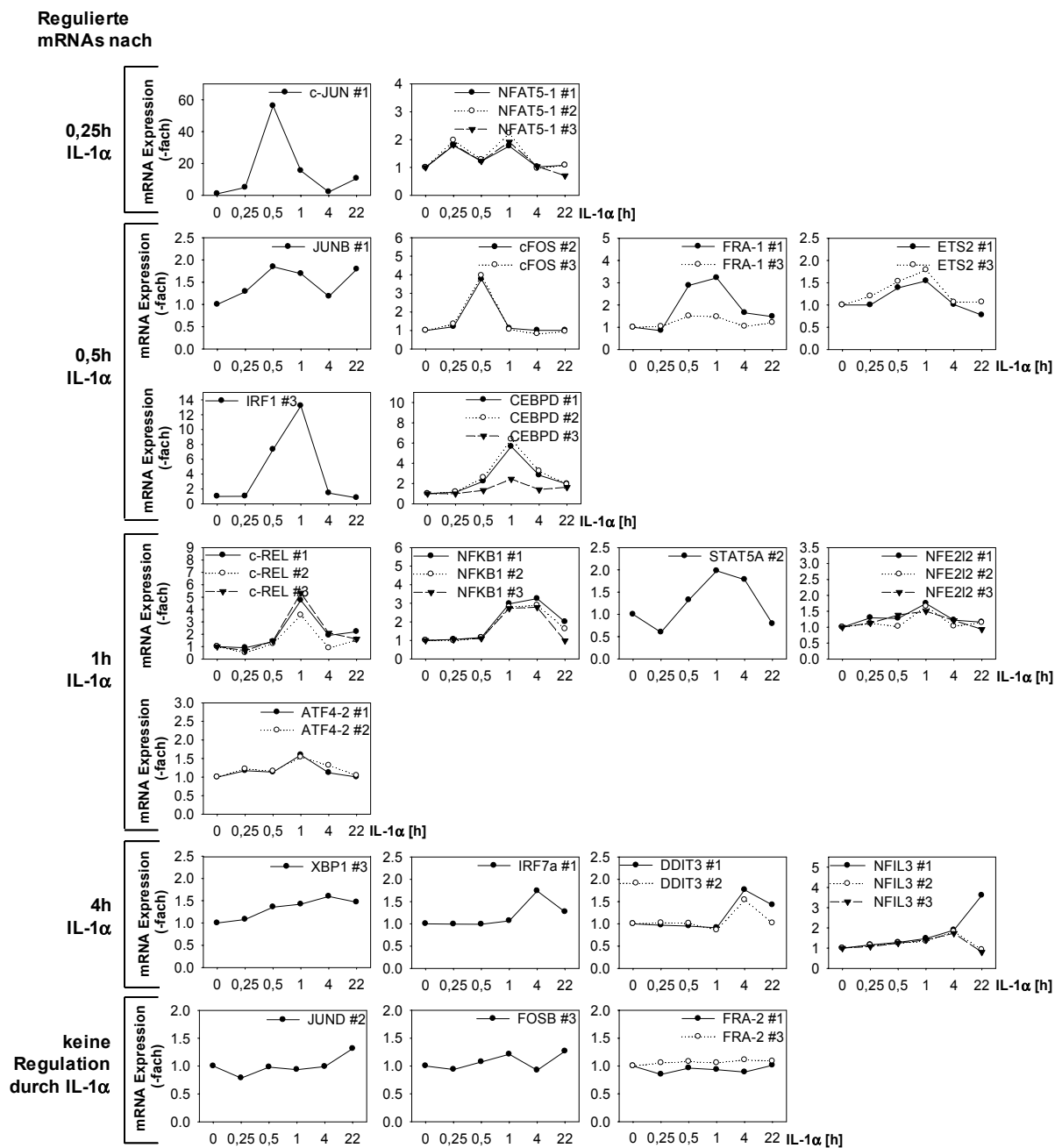
Aufgeführt sind die 37 Transkriptionsfaktoren, die zu mindestens einem Zeitpunkt der IL-1 $\alpha$ -Kinetik wenigstens 1,5-fach induziert sind. Die Gene sind dem Zeitpunkt zugeordnet, ab dem sie eine Hochregulation zeigen.

Abbildung 24 zeigt das Profil der 17 zu den frühen Zeitpunkten 0,25-4h IL-1 $\alpha$  regulierten Transkriptionsfaktoren als Liniengraphen. Die vom Entzündungsarray gemessene Induktion der drei Transkriptionsfaktoren (c-JUN, JUNB und cFOS) der JUN/ FOS-Familie innerhalb von 30 Minuten nach Stimulation (Abbildung 22) wird durch den Transkriptionsfaktorarray bestätigt. Zusätzlich wird FRA-1 als weitere AP-1-Komponente mit einer frühen IL-1 $\alpha$ -Induzierbarkeit identifiziert. Die drei weiteren AP-1-Untereinheiten JUND, FOSB und FRA-2 zeigen, wie Abbildung 24 (unten) verdeutlicht, auch in der höher auflösenden Darstellung in Form von Liniengraphen keine Tendenz einer Regulation im Entzündungszustand.

Durch diese Befunde wird deutlich, dass mindestens vier Transkriptionsfaktoren der JUN/ FOS-Familie eine Schlüsselfunktion im Entzündungssignalweg haben.

Die in Abbildung 24 zusammengestellten Daten zeigen, dass c-JUN und IRF1 die mit Abstand am stärksten (über 50- bzw. über 13-fach) induzierten mRNAs sind. cFOS, CEBPD und c-REL können durch IL-1 $\alpha$  ebenfalls bedeutend induziert werden (über vierfach), jedoch nicht in dem Maße wie c-JUN und IRF1. Eine etwa dreifache Hochregulation zeigen FRA-1 und NFKB1, während alle anderen IL-1 $\alpha$ -induzierten mRNAs, wie z.B. JUNB, schwache Induktionen zwischen 1,5- und zweifach aufweisen.

Ein Vergleich der Profile der vier regulierten JUN/ FOS-Familienmitglieder verdeutlicht, dass c-JUN, JUNB, cFOS und FRA-1 zu den frühen Zeitpunkten der IL-1 $\alpha$  Stimulation (0,25 und 0,5h IL-1 $\alpha$ ) induziert sind, wobei nur c-JUN schon nach 15 Minuten IL-1 $\alpha$  deutlich hochreguliert ist. JUNB, cFOS und FRA-1 werden innerhalb von 30 Minuten durch IL-1 $\alpha$  induziert. Dabei hat cFOS auch bei 30 Minuten das Induktionsmaximum, während JUNB sowie FRA-1 einen leicht verzögerten *peak* zu 1h IL-1 $\alpha$ -Stimulation hin aufweisen. Im Gegensatz zur cFOS mRNA, die zum 1h-Stimulationszeitpunkt bereits wieder auf Basalniveau abgesunken ist, benötigen c-JUN, JUNB und FRA-1 länger als vier Stunden, um mRNA-Konzentrationen vergleichbar derer vor der Induktion des Entzündungszustandes zu erreichen.



**Abbildung 24: Kinetik von IL-1α-induzierten Transkriptionsfaktoren und den Mitgliedern der JUN/ FOS-Familie JUND, FOSB und FRA-2 zu den Zeitpunkten 0,25-4h aus Experiment der Abbildung 23**

Die Ratios der IPC-Werte der regulierten Gene wurden als Liniengraphen dargestellt.

Neben c-JUN ist auch NFAT5-1 schon nach 15 Minuten induziert. Für NFAT5-1 lässt sich ein zweiter *peak* nach einer Stunde IL-1α-Behandlung beobachten. Sie ist damit die einzige mRNA dieser Auswahl, die ein solches Profil aufweist.

Wie FRA-1 erlangen auch ETS2, IRF1 und CEBPD ihr Induktionsmaximum innerhalb einer Stunde nach der IL-1α-Stimulation, sind aber auch schon zum Zeitpunkt 0,5h IL-1α über 1,5-fach induziert. Die IL-1α-Induktion von ETS2 und IRF1 ist nach 4h Stimulation beendet; die mRNAs sind zu diesem Zeitpunkt wieder auf Basalniveau abgesunken. Obwohl CEBPD ein Transkriptionsfaktor ist, folgt dessen IL-1α-induzierte Kinetik eher der der Entzündungsgene aus Abbildung 22 A-C und nicht dem transienten Induktionsmuster der JUN/ FOS-Familien-



mitglieder. Je nach Sonde ist die mRNA bei 22h IL-1 $\alpha$ -Stimulation immer noch zwischen 1,6- und zweifach induziert. Neben CEBPD zeigen auch c-REL und NF $\kappa$ B1 eine verlängerte Induktion nach einer IL-1 $\alpha$ -Stimulation. Zudem ähneln sich c-REL und CEBPD auch in ihren scharfen *peaks* bei einer Stunde, während NF $\kappa$ B1 ein Plateau zwischen einer und vier Stunden IL-1 $\alpha$  hat.

Die mRNAs von STAT5A, NFE2L2 und ATF4-2 zeigen innerhalb einer Stunde nach Entzündungsinduktion ihr schwaches Expressionsmaximum, wobei NFE2L2 und ATF4-2 symmetrische *peaks* haben und STAT5A ein Plateau zwischen einer und vier Stunden hat.

Zum Zeitpunkt von vier Stunden IL-1 $\alpha$  sind die Genexpressionsprofile von XBP1, IRF7, DDIT3 und NFIL3 maximal induziert. Wie Abbildung 24 verdeutlicht, sind die *peaks* nur schwache Auslenkungen.

Die Anzahl der Transkriptionsfaktoren, die in humanen epithelialen Zellen zu frühen Zeitpunkten bis zu einer Stunde als Reaktion auf das Entzündungszytokin IL-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene hauptsächlich transient hochreguliert werden, umfasst 13 Gene. Diese Anzahl ist im Kontext der Komplexität einer Entzündungsantwort überraschend wenig. Auch wenn ein Teil der Transkriptionsfaktoren aufgrund begrenzter Sensitivität der Arraymethodik nicht identifiziert wurden, scheint trotzdem eine geringe Anzahl an Transkriptionsfaktoren die Regulation vieler Substrate während des Entzündungsprozesses vermitteln. Die an der initialen Phase der Genexpression am stärksten beteiligte Familie ist die JUN/ FOS-Familie, gemessen sowohl an der Anzahl als auch an der Induktionsstärke durch IL-1 $\alpha$ .

### **3.2.1.3 Identifizierung von vier ERK-sensitiven, drei ERK-insensitiven und einem ERK-, p38 MAPK- und JNK-insensitiven IL-1 $\alpha$ -Transkriptionsfaktor(en)**

Da AP-1-Proteine durch MAPK-Signalwege reguliert werden, wurde im Folgenden untersucht, welche der IL-1 $\alpha$ -induzierten Transkriptionsfaktoren bei der frühen Induktion der Entzündung durch einen der drei klassischen MAPK-Signalwege aktiviert werden.

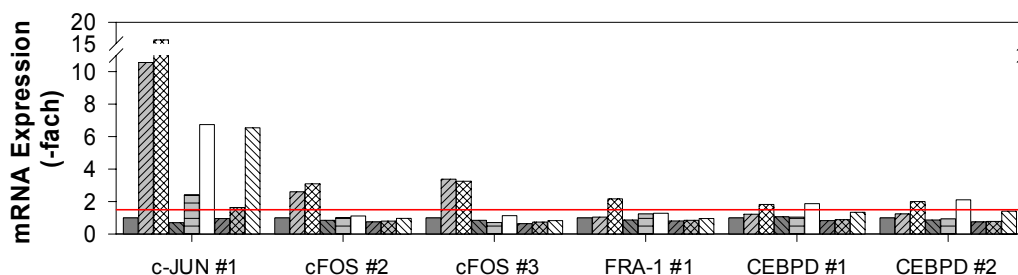
Für dieses Experiment wurden unbehandelte und IL-1 $\alpha$ -stimulierte KB-Zellen mit einer Kombination an den Inhibitoren PD98059, SP600125 und SB203580 behandelt oder unbehandelt gelassen. Zusätzlich sind in Abbildung 25 Daten dargestellt, bei denen der ERK-Signalweg durch alleinige Verwendung des MEK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase*)-Inhibitors PD98059 gehemmt wurde. Dieses Telexperiment wurde durchgeführt, da der hochspezifische Hemmstoff PD98059 die größte Inhibition der Entzündungsgene bewirkt.

Für die Untersuchung der initialen Genexpression durch IL-1 $\alpha$  wurden die frühen Stimulationszeitpunkte von 0,5h und 1h IL-1 $\alpha$  gewählt. Als Analysemethode diente erneut der Transkriptionsfaktorarray TFhum. Abbildung 25 zeigt die Auswahl an Genen, die durch IL-1 $\alpha$  zu mindestens einem Zeitpunkt der Stimulation eine mindestens 1,5-fache Induktion aufweisen. Im Gegensatz zum Experiment der IL-1 $\alpha$ -Kinetik ohne Inhibitoren (Abbildung 23 und Abbildung 24) weisen hier acht statt 13 Genen eine IL-1 $\alpha$ -Induktion (bis 1h IL-1 $\alpha$ ) auf, während zwei Faktoren (ATF3 und CREBL2) dort nicht als IL-1 $\alpha$ -induzierte Zielgene

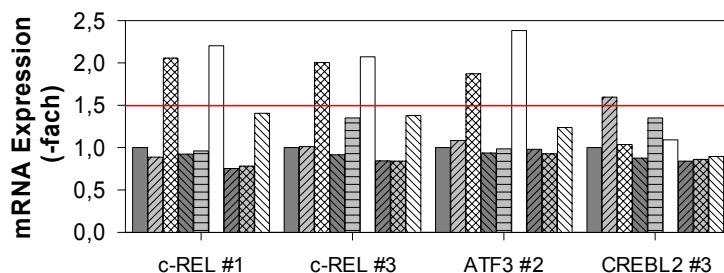
identifiziert werden konnten. Diese Unterschiede sind dadurch zu erklären, dass Intensitäten unter einem Wert von 100 nicht berücksichtigt wurden.

An der Induktionsstärke von c-JUN durch IL-1 $\alpha$  lässt sich erkennen, dass die Hybridisierung der Proben auf den Arrays schwächer ausgefallen ist als bei dem Experiment, das Abbildung 23 und Abbildung 24 zugrunde liegt. Eine ineffektive Stimulation mit IL-1 $\alpha$  als Grund wird jedoch für diese Beobachtung ausgeschlossen.

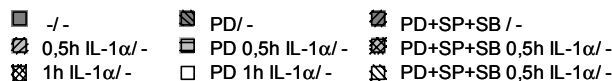
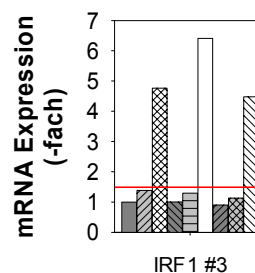
**Gruppe 1: IL-1 $\alpha$ -induzierte, PD-sensitive und PD+SP+SB-sensitive Gene**



**Gruppe 2: IL-1 $\alpha$ -induzierte, PD-insensitive Gene**



**Gruppe 3: IL-1 $\alpha$ -induziertes, PD+SP+SB-insensitives Gen**



**Abbildung 25: Einfluss der MAPK-Hemmstoffe PD98059 (PD), SP600125 (SP) und SB203580 (SB) auf IL-1 $\alpha$ -Zieltranskriptionsfaktoren, die an der initialen Entzündungsgenexpression (bis 1h IL-1 $\alpha$ ) beteiligt sind**

Die Ratios der IPC-Werte der regulierten Transkriptionsfaktoren wurden, bezogen auf die unbehandelte Probe (-), als Balkengraphen dargestellt und sind in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe eins beinhaltet Transkriptionsfaktoren, die IL-1 $\alpha$ -induziert, PD98059-sensitiv und durch das Inhibitorengemisch PD98059, SP600125 und SB203580 hemmbar sind. Gruppe zwei gehören IL-1 $\alpha$ -induzierte Gene an, die nicht PD98059-sensitiv sind und Gruppe drei besteht aus einem Genprodukt, bei denen die IL-1 $\alpha$ -Induktion durch keinen Inhibitor blockiert werden kann. Die rote Markierung zeigt eine 1,5-fache Regulation an.

Die durch IL-1 $\alpha$  mindestens 1,5-fach hochregulierten mRNAs lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- IL-1 $\alpha$ -induzierte mRNAs, die durch PD98059 und folglich auch durch das Inhibitorengemisch an PD98059, SP600125 und SB203580 hemmbar sind,
- IL-1 $\alpha$ -induzierte mRNAs, die durch die Inhibitorenkombination aus PD98059, SP600125 und SB203580 eine Hemmung der mRNA-Spiegel zeigen, aber nicht PD98059-sensitiv sind und
- IL-1 $\alpha$ -induzierte mRNA, bei der kein Hemmstoff einen inhibitorischen Effekt aufzeigt.

Gen-sonden	Hemmung [%] unter Einfluss von					
	PD	PD 0,5h IL-1 $\alpha$	PD 1h IL-1 $\alpha$	PD+SP+SB	PD+SP+SB 0,5h IL-1 $\alpha$	PD+SP+SB 1h IL-1 $\alpha$
c-JUN #1	31	77	57	5	85	59
cFOS #2	16	61	64	26	69	69
cFOS #3	15	79	65	36	78	75
FRA-1 #1	13	-	41	19	19	56
CEBPD #1	-	14	-	17	28	27
CEBPD #2	13	25	-	26	37	30
c-REL #1	8	-	-	25	12	32
c-REL #3	11	10	-	18	15	26
ATF3 #2	6	9	-	2	14	34
CREBL2 #3	12	15	-	16	46	14
IRF1 #3	-	7	-	10	18	6

**Tabelle 10: Vergleich der Hemmungen der Transkriptionsfaktoren durch PD98059 (PD), SP600125 (SP) und SB203580 (SB) im basalen und Entzündungszustand**

Die Tabelle stellt die PD98059- und Inhibitorengemisch-bedingten Hemmungen der acht IL-1 $\alpha$ -induzierten Gene gegenüber. Der Hemmeffekt berechnet sich aus den Ratios der Abbildung 25. Dabei wurden die mit Inhibitoren behandelten Proben in Beziehung zu den Proben ohne Hemmstoff (-, 0,5h und 1h IL-1 $\alpha$ ) gesetzt und von 100 subtrahiert. Hemmeffekte ab 20% sind fett gedruckt.

Wie in Abbildung 25 und Tabelle 10 dargestellt, gehören c-JUN, cFOS und FRA-1 der ersten Gruppe an. Sie zeigen eine mehr als 40%ige Hemmung durch PD98059 unter IL-1 $\alpha$ -Einfluss, wobei c-JUN und cFOS deutlicher stärker inhibiert werden als FRA-1. Ein Vergleich der PD98059-Hemmeffekte mit denen der Kombination der drei MAPK-Hemmstoffe verdeutlicht den großen Anteil des ERK-Signalweges an der Weiterleitung des Entzündungssignals zu den AP-1-Untereinheiten c-JUN, cFOS und FRA-1 in KB-Zellen. Die anderen beiden MAPK-Signalwege leisten keinen großen Beitrag zur Weiterleitung des Entzündungssignals in der Zelle.

Der Transkriptionsfaktor CEBPD wurde ebenfalls der ersten Gruppe zugeordnet, obwohl nur eine der zwei Sonden für CEBPD eine 25%ige Hemmung durch PD98059 misst. Der zwischen 30 und 37%ige Hemmeffekt durch PD98059, SP600125 und SB203580 lässt auf einen wenn auch geringen Beitrag der Kinasen p38 MAPK und/ oder JNK an der IL-1 $\alpha$ -induzierten Aktivierung von CEBPD schließen.

Zu der zweiten Gruppe zählen c-REL, ATF3 und CREBL2, bei denen die IL-1 $\alpha$ -Aktivierung der Transkriptionsfaktoren unter PD98059-Einfluss nicht gehemmt werden kann. Der ERK-Signalweg leistet keinen Beitrag zur Weiterleitung des IL-1 $\alpha$ -Signals über diese Transkriptionsfaktoren.

Das einzige IL-1 $\alpha$ -induzierte Gen, bei dem keine Blockade durch einen Inhibitor gemessen werden konnte, ist IRF1. Demzufolge ist keiner der klassischen MAPK-Signalwege entscheidend an der IL-1 $\alpha$ -abhängigen Induktion von IRF1 beteiligt.

Die Blockade der klassischen MAPK konnte zeigen, dass diese wichtige proximal gelegene Regulatoren der IL-1 $\alpha$ -induzierten Transkriptionsfaktoren der JUN/ FOS-Familie (c-JUN, cFOS und FRA-1) bei der Weiterleitung des Entzündungssignals IL-1 $\alpha$  sind. Die Inhibitoren beeinträchtigen Signalwege, die für die IL-1 $\alpha$ -induzierte Expression nicht essentiell, aber

nötig sind, um eine maximale Genexpression zu erreichen. Bei Analyse der Daten fällt auf, dass Transkriptionsfaktoren, die nicht zur JUN/ FOS-Familie gehören auch nicht sensitiv gegenüber dem ERK-Signalweg-Inhibitor PD98059 (c-REL, ATF3 und CREBL2) sowie den Inhibitoren für p38 MAPK und JNK (IRF1) im IL-1 $\alpha$ -stimulierten Zustand sind. Eine Ausnahme bildet CEBPD. Dieser Transkriptionsfaktor gehört nicht zur JUN/ FOS-Familie, wird aber trotzdem durch den Inhibitor PD98059 blockiert. Die Hemmeffekte auf CEBPD sind jedoch deutlich geringer bei einem Vergleich zu denen der Mitgliedern der JUN/ FOS-Familie.

### 3.2.2 RNAi-vermittelte Suppression auf Ebene der AP-1-Transkriptionsfaktoren

#### 3.2.2.1 Etablierung und Validierung der siRNA-vermittelten Hemmung von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf Proteinebene

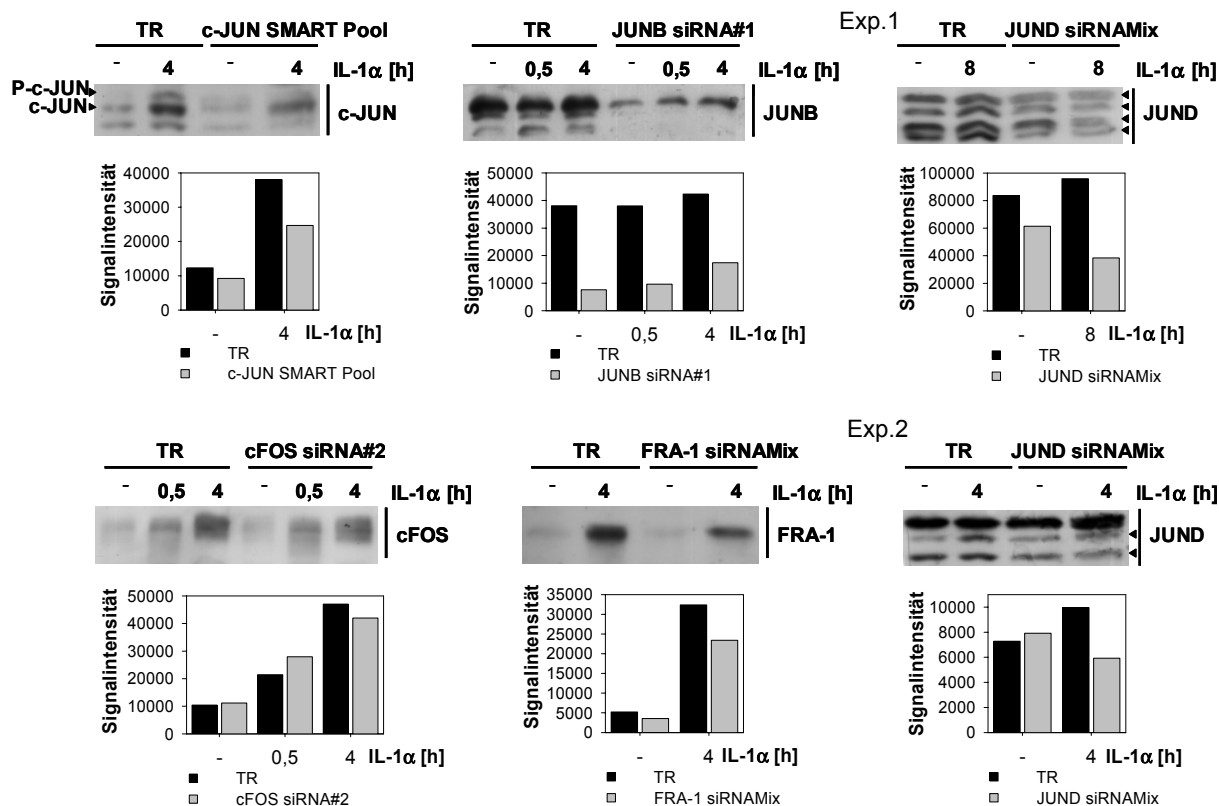
Es konnte durch Microarray-Analysen gezeigt werden, dass die AP-1-Transkriptionsfaktor-Familie am stärksten am initialen Entzündungsprozess beteiligt ist und das Entzündungssignal zum großen Teil über die MAPK-Kaskaden weitergeleitet wird. Im Folgenden wurde nun untersucht, inwieweit diese Transkriptionsfaktoren zentrale Stellen bei der Antwort der IL-1 $\alpha$ -vermittelten Entzündung sind und welche Substrate unter den gewählten Bedingungen von diesen Faktoren reguliert werden.

Um spezifisch in den Entzündungssignalweg einzugreifen und Substrate von MAPK zu hemmen, wurden die IL-1 $\alpha$ -regulierten AP-1-Familienmitglieder c-JUN, JUNB, cFOS und FRA-1 ausgewählt, um mit Hilfe von chemisch synthetisierten siRNA-Molekülen spezifische *knock down*-Zellen zu erzeugen. Zusätzlich sollte neben den IL-1 $\alpha$ -induzierten Mitgliedern der JUN/ FOS-Familie auch JUND durch siRNA-Moleküle supprimiert werden. In den bisher gezeigten Ergebnissen wird JUND nicht durch IL-1 $\alpha$  reguliert, jedoch zeigen unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Kracht (Abbildung 32 D), dass JUND nach achtstündiger IL-1 $\alpha$ -Stimulation an den IL-8-Promotor rekrutiert wird und somit potentiell über posttranslationale Mechanismen einen Einfluss auf entzündungsrelevante Gene haben kann.

Ziel war es, unter Verwendung von siRNA-Molekülen, die Effekte einer RNAi-vermittelten Repression von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 in epithelialen KB-Zellen zu untersuchen. Um *loss of function*-Untersuchungen an den fünf AP-1-Untereinheiten durchführen zu können, wurden im Vorfeld die entsprechenden *knock down*-Zellen etabliert. Wie im Folgenden noch erläutert wird, werden nicht alle JUN/ FOS-Familienmitglieder konstitutiv exprimiert. Dadurch unterscheiden sich diese Arbeiten wesentlich im Vergleich zu den siRNA-Untersuchungen für die ständig exprimierten Proteine TAB1 und TAK1.

Zur Auswahl von effizienten siRNA-Molekülen standen für die Transkriptionsfaktoren JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 je drei von der Firma Eurogentec entworfene und chemisch synthetisierte siRNA-Oligonukleotide zur Verfügung. Als vierte Möglichkeit wurden diese siRNAs zu gleichen Teilen als Gemisch (Mix) eingesetzt. Obwohl dies aufgrund von *off target*-Effekten problematisch sein kann, wurden mit den Gemischen aus drei verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen JUND und FRA-1 die besten *knock down*-Effekte erzielt. Für cFOS und JUNB wurde jeweils ein siRNA-Oligonukleotid ausgewählt. Das Auswahlkriterium für die

Oligonukleotide war ein möglichst effizienter *knock down*-Effekt auf Proteinebene. Zur Suppression von c-JUN stand ein Gemisch aus vier verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden (c-JUN siRNA SMART Pool) der Firma Dharmacon zur Verfügung.



**Abbildung 26: Supprimierte Proteinexpression von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 nach Applikation der entsprechenden siRNAs**

Humane KB-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/ 24-Loch) wurden 48h nach Aussaat für 24h (cFOS, FRA-1) oder für 48h (c-JUN, JUNB, JUND Exp.1, cFOS) oder 100nmol/l (c-JUN, JUND Exp.2, FRA-1) der angegebenen siRNA oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeitspannen mit IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen und lysiert. Die Expression der Transkriptionsfaktoren wurde mit spezifischen Antikörpern im Westernblot detektiert. Die Banden der Westernblots wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen und als Balkendiagramme dargestellt. P-c-JUN und c-JUN sind durch Pfeile am c-JUN-Westernblot gekennzeichnet. Es ist bekannt, dass es mehrere JUND Proteinisoformen gibt; die relevanten Banden sind mit Pfeilen an den beiden entsprechenden Westernblots markieren.

Eine sorgfältige Etablierung der Bedingungen der siRNA-Experimente machte es möglich die in Abbildung 26 dargestellten Hemmeffekte der Zielgene auf Proteinebene zu erhalten. Dafür wurden neben den unterschiedlichen siRNA-Sequenzen auch die Parameter siRNA-Konzentration, Zelldichte und Transfektionsdauer variiert, um möglichst große Hemmeffekte zu erreichen. Letztendlich wurden KB-Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *GeneSilencer*<sup>®</sup> mit 50 (JUNB, JUND Exp.1, cFOS) oder 100nmol/l (c-JUN, JUND Exp.2, FRA-1) der entsprechenden siRNAs transfiziert (Abbildung 26) und der Hemmeffekt anhand von Westernblots auf Proteinebene bestimmt. Bei einem Teil der Ansätze wurden die Zellen nach einem (cFOS, FRA-1) bzw. zwei (c-JUN, JUNB, JUND) Tagen nach der Transfektion für die angebenen Zeitpunkte mit IL-1 $\alpha$  stimuliert. Die Entscheidung, nach wie vielen Tagen nach der siRNA-Applikation die Zellernte stattfinden sollte, erfolgte anhand von Experimenten. Dabei wurde die Bedingung gewählt, die für den jeweiligen Transkriptions-

faktor den größten siRNA-Hemmeffekt erzielte. Da mit den *knock down*-Zellen die potentielle Veränderung der Expression von Entzündungsgenen untersucht werden sollte, wurden die Zellen für 4h mit IL-1 $\alpha$  behandelt. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich, wie die IL-1 $\alpha$ -Kinetik in Abbildung 22 zeigt, eine starke Induktion vieler Entzündungsgene messen.

Aufgrund der oben erwähnten Beobachtung der Rekrutierung von JUND an den IL-8-Promotor nach 8h IL-1 $\alpha$ -Behandlung (Abbildung 32 D), wurden JUND *knock down*-Zellen für die Expressionsuntersuchung der Entzündungsgene für diese Zeitspanne mit IL-1 $\alpha$  stimuliert (Exp.1). In Abbildung 26 ist ein zweites JUND siRNA-Experiment (Exp.2) gezeigt, bei dem die Zellen für 4h mit IL-1 $\alpha$  behandelt wurden. Dieses Experiment wurde für die Untersuchung zur Wechselwirkungen der AP-1-Komponenten untereinander verwendet.

Zwischen Aussaat der Zellen und Transfektion lagen jeweils zwei Tage, damit die durch den Stress der Aussaat induzierten AP-1-Faktoren zum Zeitpunkt der Transfektion wieder Basalniveau erreicht hatten. Mit Hilfe der Software ImageJ wurden die Proteinbanden der Westernblots densitometrisch ausgemessen und als Graphen dargestellt.

Die Westernblots zeigen deutlich, dass die AP-1-Untereinheiten c-JUN, cFOS und FRA-1 nicht konstitutiv exprimiert in der Zelle vorliegen, während JUNB und JUND im unstimulierten Zustand durch eine Immunodetektion gut nachzuweisen sind. Erst durch eine Stimulation mit IL-1 $\alpha$  werden c-JUN, cFOS und FRA-1 stark exprimiert. Auch JUND wird zum Zeitpunkt von 4h durch IL-1 $\alpha$  schwach induziert. Im Gegensatz dazu zeigt JUNB zu den gewählten Stimulationszeitpunkten keine IL-1 $\alpha$ -Abhängigkeit.

Von JUND existieren mehrere Isoformen, von denen nicht immer alle durch den verwendeten Antikörper detektiert werden, wie ein Vergleich der beiden  $\alpha$ -JUND-Westernblots (Abbildung 26) zeigt.

Bei allen fünf Proteinen ist in mindestes einem Zustand eine Hemmung zu beobachten. Die siRNA-Effekte der Proteine schwanken jedoch stark. Die JUNB siRNAs erzielten mit ungefähr 80% die beste Hemmung nach siRNA-Applikation. Bei cFOS fällt die mangelnde Inhibition auf, nur im 4h IL-1 $\alpha$ -stimulierten Zustand wird eine geringe Hemmung gemessen. Auch bei einem JUND siRNA-Experiment (Exp.2) ist im basalen Zustand keine Suppression zu beobachten. Durch Variation der Transfektionsbedingungen ist es nicht gelungen, eine stärkere Suppression von cFOS und JUND durch die zu Verfügung stehenden siRNAs zu erreichen.

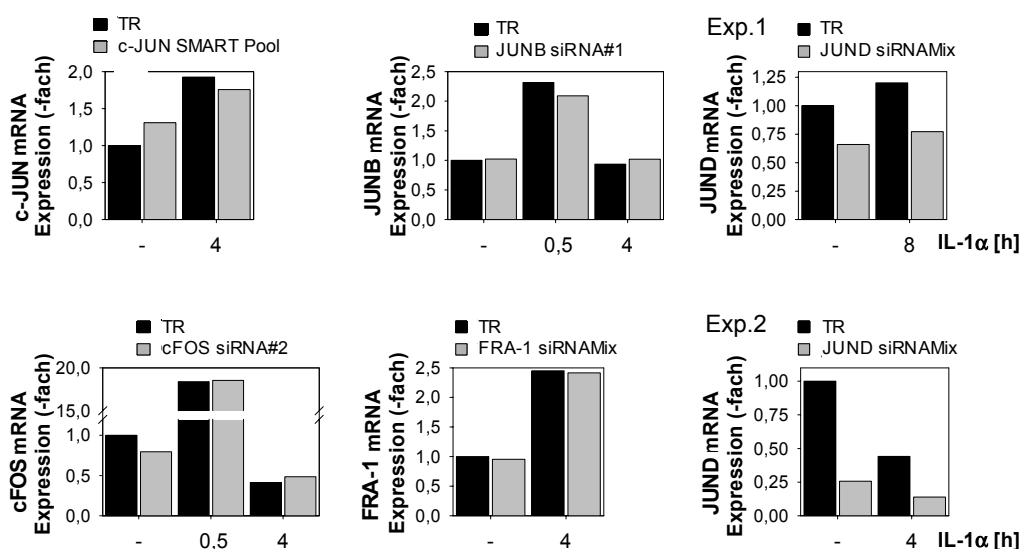
### **3.2.2.2 Etablierung und Validierung der siRNA-vermittelten Hemmung von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf mRNA-Ebene**

Die Suppression eines Proteins nach Applikation von siRNAs ist nicht zwangsläufig die Folge einer durch den RISC/ siRNA-Komplex geschnittenen mRNA. Bei einer partiellen Komplementarität zwischen siRNA und Ziel-mRNA können die siRNA-Moleküle auch eine translationale Repression des Proteins bewirken, indem sie sich wie miRNAs an die Ziel-mRNA anheften und diese so nicht mehr als Matrize zur Translation fungieren kann. Dass siRNAs als miRNAs wirken können, wurde 2003 von Doench et al. publiziert (Doench et al., 2003). Um zu prüfen, ob die *knock down*-Zellen aus Abbildung 26 auf mRNA-Ebene eine

Hemmung zeigen, wurden für die entsprechenden Zielstrukturen quantitative Real Time PCRs mit spezifischen *TaqMan-Assays on Demand* durchgeführt.

Nach dem Verständnis der RNA Interferenz zum Zeitpunkt dieser Experimente sollte die durch den RISC-Komplex innerhalb der siRNA-komplementären Sequenz geschnittene mRNA degradiert werden (zum Beispiel Agrawal et al., 2003). Demzufolge würde ein Ansatz mit transfizierten siRNAs eine Abnahme der spezifischen mRNA im Vergleich zu untransfizierten Ansätzen zeigen. Eine Bestimmung der mRNA-Level mit der Technik der *TaqMan-Assays on Demand* sollte möglich sein.

Abbildung 27 zeigt jedoch, dass von den fünf AP-1-Untereinheiten nur beim JUND *knock down* eine Abnahme der entsprechenden mRNA zu beobachten ist. Neben JUND wurde auch für die Chemokin- und Zytokin-mRNAs IL-8 und IL-6 eine Abnahme in den jeweiligen *knock down*-Zellen mit *Assays on Demand* gegen IL-8 und IL-6 detektiert. Die IL-8 und IL-6 *knock down*-Zellen werden in Kapitel 3.2.3.1 (Abbildung 36) beschrieben.



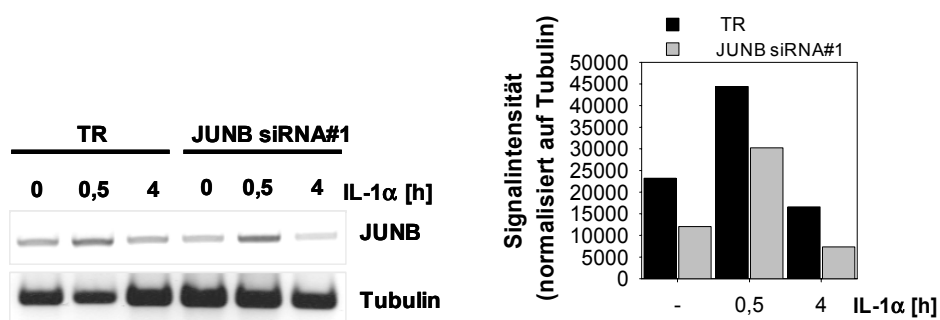
**Abbildung 27: Real Time PCR-Untersuchungen mit *TaqMan-Assays on Demand* zur Überprüfung der *knock down*-Zellen von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1**

Die RNA aus Vergleichs (TR)- und *knock down*-Zellen der Abbildung 26 wurde verwendet, um cDNA für eine Real Time PCR zu synthetisieren. Unter Verwendung von *TaqMan-Assays on Demand* gegen die siRNA-Zielstrukturen wurden relative Expressionsdaten für c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 generiert. Die dargestellten Daten sind auf  $\beta$ -Aktin normiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Nur für JUND kann eine Suppression der mRNA in den *knock down*-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden.

Der Befund kann zweierlei bedeuten. Zum einen könnte dieses Ergebnis dahingehend interpretiert werden, dass nur die siRNAs gegen JUND (Abbildung 27), IL-8 und IL-6 (Abbildung 36) eine Inaktivierung der Ziel-mRNA durch Spaltung bewirken, während die siRNAs gegen c-JUN, JUNB, cFOS und FRA-1 nur einen Translationsstopp der mRNA hervorrufen. Zum anderen ist es denkbar, dass die durch den RISC-Komplex geschnittenen mRNAs als Fragmente in der Zelle über einen längeren Zeitraum vorliegen ohne von RNasen abgebaut zu werden. In diesem Fall ist es der TaqMan-Sonde und den Primern möglich, an die komplementäre Sequenz innerhalb einer der zwei Fragmente der geschnittenen mRNA zu binden. Die entsprechende Matrize wird in der Real Time PCR amplifiziert. Auch wenn ein siRNA-Effekt auf mRNA-Ebene vorliegt, kann keine Abnahme der

entsprechenden mRNA gemessen werden. Eine Amplifikation ist jedoch nur dann möglich, wenn die TaqMan-Sonde und die Primer der PCR auf dem gleichen Fragment der mRNA lokalisiert sind.

Im letztgenannten Zusammenhang wäre die verwendete Real Time PCR-Technik mit *TaqMan-Assays on Demand* für die vorliegende Fragestellung nicht für alle *knock down*-Zellen das richtige Werkzeug. Mit einer herkömmlichen RT-PCR sollte jedoch eine vorhandene Hemmung auf mRNA-Ebene unter Verwendung von geeigneten Primern messbar sein. Diese mögliche Erklärung wurde an einem Beispiel überprüft. Der Transkriptionsfaktor JUNB weist den größten Hemmeffekt durch die siRNAs auf Proteinebene auf und wurde daher für die RT-PCR ausgewählt. Es wurden spezifische Primer verwendet, die in den 5'- und 3'-Regionen der cDNA von JUNB komplementäre Sequenzen aufweisen. Ein Produkt kann demzufolge nur amplifiziert werden, wenn die mRNA intakt ist. Eine durch RISC geschnittene, in zwei Fragmenten vorliegende, mRNA sollte geringer amplifiziert werden. Die siRNA-Moleküle erreichen in Säugerzellen keine hundertprozentigen Effekte, so dass auch in den siRNA-applizierten Ansätzen intakte mRNAs amplifiziert werden. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis. Zur Normierung der mRNA-Mengen wurde parallel eine RT-PCR mit den gleichen cDNAs unter Verwendung von spezifischen Tubulin-Primern durchgeführt. Die Banden des Agarosegels mit den PCR-Ergebnissen für JUNB und Tubulin wurden densitometrisch ausgemessen und die Signalintensität der JUNB-Banden auf die von Tubulin normiert. Im Gegensatz zur Real Time PCR mit *TaqMan-Assays on Demand* konnte durch die herkömmliche RT-PCR eine Hemmung der JUNB mRNA in den siRNA-Ansätzen gezeigt werden.



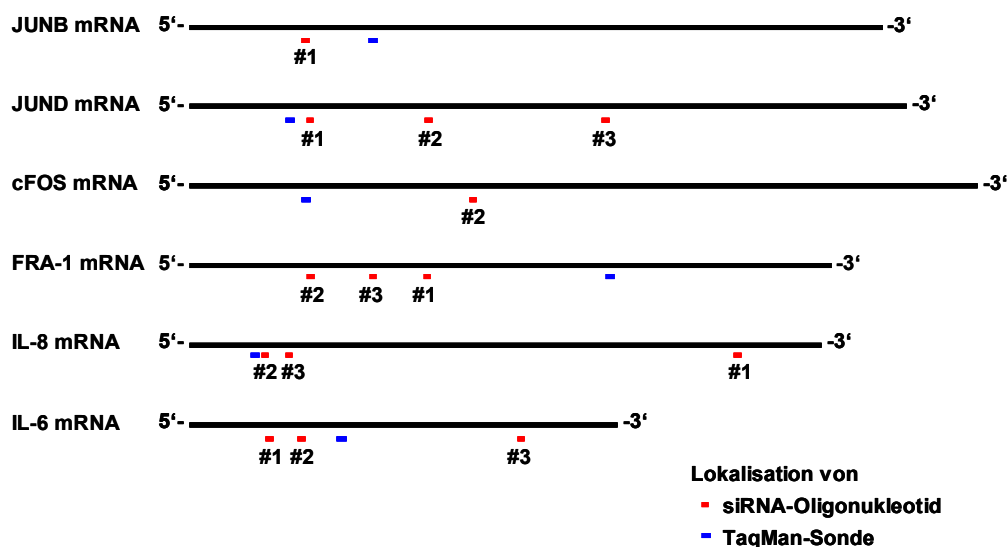
**Abbildung 28: Herkömmliche RT-PCR detektiert JUNB siRNA-bedingte Suppression in JUNB *knock down*-Zellen**

Die RNA des JUNB *knock downs*-Ansatzes mit Transfektionskontrollen (TR) aus Abbildung 26 wurde verwendet, um eine RT-PCR mit spezifischen JUNB-Primern durchzuführen. Parallel zu JUNB wurde aus den gleichen cDNAs Tubulin mit spezifischen Primern amplifiziert. Die mit Ethidiumbromid visualisierten Banden des Agarosegels wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen und die Signalintensität der JUNB-Expression auf die von Tubulin normiert.

Dieses Experiment ist ein starker Hinweis dafür, dass die durch RISC inaktivierte mRNA nicht unmittelbar danach abgebaut wird. Tatsächlich wurde kürzlich publiziert, dass die durch RISC einmal geschnittene Ziel-mRNA nicht sofort degradiert wird, sondern, wie in der Einleitung beschrieben, ein Abbau in den sogenannten P-Bodies stattfinden kann (Liu et al., 2005; Sen and Blau, 2005). P (*processing*)-Bodies sind mRNA-prozessierende Ribonukleoproteinpartikel im Zytoplasma in denen unter anderem die Abbauintermediate der Ziel-mRNAs akkumulieren.



Es bleibt offen, warum die Abnahme der JUNB, IL-8 und IL-6 mRNA mit Hilfe der spezifischen TaqMan-Sonden detektiert werden konnte, während bei den anderen AP-1-Faktoren in der Real Time PCR keine Abnahme der entsprechenden mRNA zu sehen ist. In Abbildung 29 sind maßstabsgetreu mRNAs, siRNAs und TaqMan-Sonden mit ihren jeweiligen Lokalisationen (für TaqMan-Sonden nur ungefährer Bereich der Lokalisation) dargestellt. Informationen zu der Primerlokalisierung der *TaqMan-Assays on Demand* sind nicht vorhanden. Die amplifizierten Produkte haben Größen von etwa 100bp, so dass eine RISC-Schnittstelle in einem 100bp-Bereich um die Lokalisation der Bindung der TaqMan-Sonde herum eine Amplifikation des Produktes verhindert. Dieser ist jedoch aufgrund der nicht verfügbaren Information nicht exakt bestimmbar.



**Abbildung 29: Lokalisation der TaqMan-Sonden und siRNAs auf den mRNAs JUNB, JUND, cFOS und FRA-1**

Die c-JUN mRNA ist nicht aufgeführt, da die Sequenzen der siRNAs des c-JUN SMART Pools nicht bekannt sind.

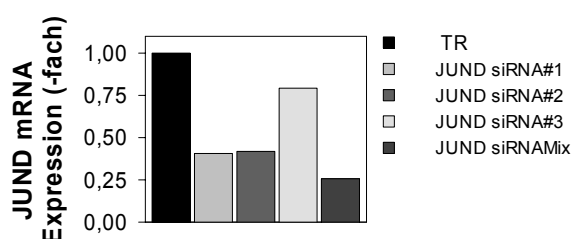
Die Illustration verdeutlicht, dass die TaqMan-Sonden gegen JUND, IL-6 und IL-8 in enger Nachbarschaft zu mindestens einer RISC-Schnittstelle auf der mRNA liegen. Im Falle einer siRNA-geschnittenen mRNA sind Sonde und beide PCR-Primer nicht auf einem mRNA-Fragment lokalisiert. Als Folge kann kein PCR-Produkt amplifiziert werden.

Die TaqMan-Sonden für eine Detektion der cFOS und FRA-1 mRNA sind offensichtlich mit über 400 Basen zu weit von der (nächsten) siRNA-Schnittstelle (cFOS siRNA#1, FRA-1 siRNA#1) entfernt, um eine Abnahme detektieren zu können.

Möglichst wenig Basen zwischen der Bindestelle der TaqMan-Sonde und der siRNA-Schnittstelle sind scheinbar nicht die einzige Bedingung für die Detektion einer Suppression durch diese PCR-Methode. Denn JUNB siRNA#2 und die entsprechende TaqMan-Sonde liegen näher beieinander als Sonde und siRNA#2 von JUND. Trotzdem wird eine Abnahme detektiert, wie Abbildung 30 zeigt. Ein Unterschied zwischen den Bedingungen bei JUNB und JUND ist jedoch, dass im Falle von JUNB die TaqMan-Sonde im längeren Fragment nach siRNA-vermittelterm Spalten der mRNA liegt. Denkbar ist, dass die kurzen Intermediate der abzubauenen mRNA in Folge größerer Instabilität viel schneller degradiert werden als die im Vergleich dazu längeren Fragmente.

Trifft diese Theorie zu, so kann eine siRNA-bedingte Suppression mit TaqMan-Sonden in einer Real Time PCR nur unter zwei Bedingungen gemessen werden. Erstens muss die Sonde in der Nähe der siRNA-Schnittstelle lokalisiert sein und zweitens begünstigt eine Sonden-Lokalisation im kürzeren mRNA-Fragment die Detektion einer Hemmung der Ziel-mRNA.

Abbildung 30 zeigt die relative JUND-Expression in normalen und vier unterschiedlichen JUND *knock down*-Zellen. Neben dem siRNAMix wurden auch die einzelnen siRNAs in KB-Zellen transfiziert. Dieses Ergebnis unterstützt obige Hypothese. Für die am weitesten von der TaqMan-Sonde entfernt liegende siRNA-Schnittstelle (JUND siRNA#3) detektiert die Real Time PCR im Vergleich zu den beiden anderen nur eine geringe Abnahme. Für die Oligonukleotide JUND siRNA#1 und #2 sowie den siRNAMix kann die Real Time PCR mit dem JUND *TaqMan-Assay on Demand* deutliche Suppressionen in der mRNA-Expression der Ziel mRNA detektieren.



**Abbildung 30: Hemmeffekte der JUND mRNA durch drei unterschiedliche siRNAs und deren Kombination**

KB-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/ 24-Loch) wurden 48h nach Aussaat für 48h mit 100nmol/l der angegebene siRNAs oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die RNA der Vergleichs- und JUND *knock down*-Zellen aus Abbildung 26 wurde verwendet, um cDNA für eine Real Time PCR zu synthetisieren. Unter Verwendung von JUND *TaqMan-Assay on Demand* wurde die relative Expression für JUND bestimmt. Die dargestellten Daten sind auf  $\beta$ -Aktin normiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet.

Im Gegensatz zur Real Time PCR wurden für die Microarray-Experimente nicht Zufalls-Hexamer-Primer sondern Oligo dT-Primer zur Synthese der cDNAs verwendet. Dennoch kann der Sachverhalt, der für die Messung der Suppression von *knock down*-Zellen durch *TaqMan-Assays on Demand* besteht, auch für die Oligonukleotidsonden der Microarrays zutreffen. Sie detektieren nicht die komplette mRNA. Ist die Sonde 3' von der Schnittstelle der siRNAs lokalisiert, kann es zur Detektion auch von RISC-gespaltenen mRNA-Fragmenten kommen. Liegen die Sonden im 5'-Fragment der gespaltenen mRNAs oder überlappen mit der Schnittstelle, so erkennen sie wie bei IL-8 und IL-6 eine Suppression der entsprechenden mRNAs (Abbildung 37).

### 3.2.2.3 Einfluss von siRNAs gegen c-JUN, JUNB, JUND, cFOS oder FRA-1 auf das Entzündungsprofil von humanen KB-Zellen

Nachdem für die fünf AP-1-Untereinheiten jeweils ein *knock down*-System mit unterschiedlicher Effizienz etabliert war, wurden mit diesen Proben weitere Untersuchungen durchgeführt. Ziel war es, den Einfluss der partiellen Hemmung von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS oder FRA-1 auf die jeweils anderen Mitglieder der JUN/ FOS-Familie aufzuklären. Die Wichtigkeit und Beteiligung von c-JUN, JUNB, cFOS und FRA-1 bei der Entzündungsantwort lässt vermuten, dass sich die einzelnen Mitglieder der JUN/ FOS-Familie gegenseitig

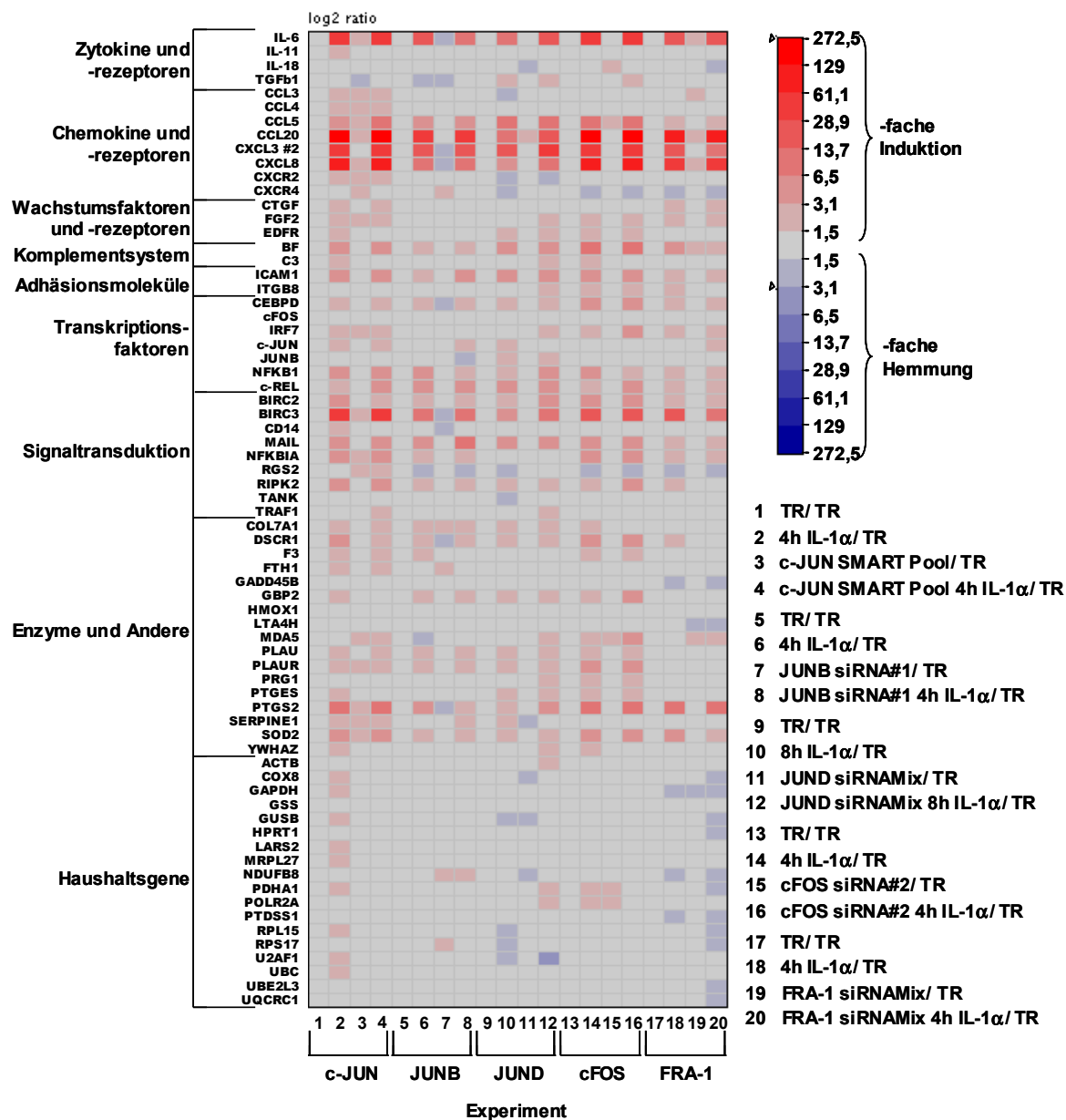
beeinflussen. Für einige andere Situationen sind Beispiele bekannt (Cuevas et al., 2005 und die darin angegebenen Literaturhinweise), bei denen eine wechselseitige Regulation dieser Transkriptionsfaktor-Familie stattfindet. Die Ergebnisse bezüglich dieser Fragestellung werden in Kapitel 3.2.2.5 vorgestellt. Zudem sind bisher keine Untersuchungen veröffentlicht, bei denen nach siRNA-Behandlung gegen c-JUN, JUNB, JUND, cFOS oder FRA-1 die Genexpressionsprofile der Entzündung analysiert wurden. Es ist davon auszugehen, dass der Einfluss der partiellen Inhibition Verschiebungen der mRNA-Expression zur Folge haben wird.

Für die folgenden Genexpressionsanalysen fanden mRNAs aus *knock down*-Zellen Verwendung, deren siRNA-Effekt durch die in Abbildung 26 gezeigten Westernblots überprüft wurde. Die Zellen wurden für eine RNA-Isolation und eine Proteinlyse geteilt, die RNA der überprüften *knock down*-Zellen in cDNA und anschließend in fluoreszenzmarkierte cRNA umgeschrieben. Letztere wurde auf den Entzündungsarrays Inflamm hybridisiert. Die Genexpressionsanalyse umfasste fünf Arraygruppen zu je vier Entzündungsarrays. Die Auswertung der Arrays erfolgte unter Verwendung der im Methodenteil angegebenen Programme und Parameter.

Um die Frage zu beantworten, welche Unterschiede im Entzündungsprofil im Vergleich zwischen den einzelnen fünf *knock down*-Experimenten auftreten, wurde die Schnittmenge der Gensonden mit Intensitätswerten ab 100 in allen vier Proben der fünf Arraygruppen ausgewählt. Für jede Gensonde der Schnittmenge wurde für alle Ansätze eine Ratio berechnet. Die fünf Arraygruppen wurden auf ihre jeweilige unstimulierte Transfektionsreagenz-Kontrolle normiert und nicht auf die Mittelwerte der unstimulierten und stimulierten Transfektionsreagenz-Kontrollen, da für die 20 Array-Experimente unterschiedliche Microarray-Chargen mit zum Teil unterschiedlicher Spotgröße verwendet werden mussten. Die Ratios im Logarithmus zur Basis 2 wurden nach Gengruppen sortiert in Form einer Heatmap dargestellt (Abbildung 31).

Die in Abbildung 31 mit dargestellten Haushaltsgene zeigen vereinzelt eine negativ maximale 3,3-fache und positiv zweifache Regulation. Ansonsten sind die Intensitäten der Haushaltsgene gut vergleichbar. Die Heatmap mit den 20 Microarray-Einzelexperimenten verdeutlicht, dass die Ergebnisse der Transfektionsreagenz-Kontrollen der fünf *knock down*-Systeme stark reproduzierbar sind. Es lassen sich die charakteristischen Merkmale der Entzündungsprofile erkennen.

Deutlich wird, dass durch die IL-1 $\alpha$ -Stimulation nur vereinzelte Gene reprimiert sind und die Gruppe der Zytokine und Chemokine am stärksten durch IL-1 $\alpha$  induziert wird. Trotz des großen Regulationsbereichs, den die Heatmap abdeckt (positive und negative 273-fache Regulation), sind Unterschiede in den Entzündungsmustern der einzelnen *knock down*-Ansätzen zu erkennen. Durch eine detaillierte Auswertung der Genexpressionsanalyse lassen sich AP-1-abhängige Gene identifizieren.



**Abbildung 31: Expressionsprofile von Entzündungsgenen der c-JUN, JUNB, JUND (Exp.1), cFOS und FRA-1 knock down-Experimente**

Synthetisierte cRNAs der *knock down*-Experimente aus Abbildung 26 wurden auf Entzündungsarrays hybridisiert. Die Schnittmenge der Gensonden mit Intensitäten ab 100 über alle 20 Arrays wurden nach Gengruppen sortiert in einer Heatmap im log2 Ratio dargestellt. Die Berechnung der Ratios erfolgte auf die jeweilige unstimulierte Transfektionsreagenz-Kontrolle (TR). Die der Intensität der Feldfärbungen entsprechende Genregulation ist der Farbskala zu entnehmen. Pfeile an der Skala verdeutlichen die maximal auftretende Regulation.

Tabelle 11 zeigt die durch Transfektion der AP-1 siRNAs hervorgerufenen Effekte auf Entzündungsgene in unstimulierten und/ oder in stimulierten *knock down*-Zellen. Dabei lassen sich die Gene in drei Gruppen einteilen: Gene, die über die fünf Arraygruppen hinweg in Kontrollzellen (Spalte: IL-1α-Induktion, IL-1α/ TR) keine Induktion, teilweise eine mindestens 1,5-fache Induktion oder alle mindestens eine 1,5-fache Induktion durch IL-1α zeigen.

Experiment →		IL-1 $\alpha$ -Induktion					siRNA-Effekt im unstimulierten Zustand					siRNA-Effekt im stimulierten Zustand				
		IL-1 $\alpha$ / TR					siRNA/ TR					siRNA IL-1 $\alpha$ / IL-1 $\alpha$				
Gruppen	Gensonden	c-JUN	JUNB	JUND Exp.1	cFOS	FRA-1	c-JUN	JUNB	JUND Exp.1	cFOS	FRA-1	c-JUN	JUNB	JUND Exp.1	cFOS	FRA-1
		keine Induktion durch IL-1 $\alpha$	RPS17	1,4	1,4	0,7	1,1	1,0	1,3	1,8	0,8	1,3	0,9	0,9	0,7	1,1
NDUFB8	1,2		1,5	0,8	1,3	0,7	1,1	1,5	0,4	1,2	0,8	0,9	1,1	0,8	1,0	0,6
IL-18	1,3		0,8	0,8	1,0	0,8	1,1	0,9	0,7	1,7	0,9	1,1	1,1	1,3	1,4	0,8
CXCR4	1,4		0,7	0,6	0,6	0,6	1,6	1,5	0,7	0,9	0,8	0,7	1,3	1,4	0,7	0,8
RGS2	1,1		0,4	0,6	0,5	0,6	1,8	0,8	1,1	1,0	1,1	1,5	1,4	1,3	0,9	1,0
TANK	1,3		1,0	0,7	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8	1,0	0,7	0,9	1,1	1,8	1,1	0,8
LTA4H	1,5		0,9	0,7	0,9	0,8	1,2	1,0	0,9	1,0	0,7	0,7	1,0	1,1	1,2	0,6
in einem Teil der Experimente mindestens 1,5-fache Induktion durch IL-1 $\alpha$	MDA5	1,4	0,7	1,2	1,7	1,3	1,7	1,2	1,0	1,6	1,7	2,0	2,1	2,6	2,2	1,3
	IRF7	1,6	0,7	1,3	2,5	1,6	1,5	0,9	1,0	1,4	1,5	1,6	2,0	2,0	1,5	1,1
	SER-PINE1	1,9	1,2	1,5	1,3	0,8	2,1	0,9	0,6	1,0	0,7	1,0	1,3	1,0	0,9	0,9
	CCL3	2,8	1,3	0,7	0,8	1,0	2,0	1,1	1,1	0,8	1,5	1,0	0,7	1,3	1,4	1,4
	CD14	1,6	0,9	0,9	1,1	0,9	1,1	0,6	0,9	1,0	1,0	0,6	0,9	1,2	1,2	0,9
	PDHA1	1,6	0,8	1,4	1,5	0,9	1,3	0,7	1,1	1,8	0,8	0,8	1,1	1,2	0,8	0,6
	COL7A1	1,9	2,2	1,8	2,4	1,3	1,0	2,3	1,1	1,1	1,1	0,8	0,9	1,3	0,6	0,8
	GAPDH	1,7	1,1	1,2	1,2	0,7	1,4	1,3	0,8	1,3	0,7	0,7	0,8	1,0	1,0	0,6
	GUSB	1,7	1,1	0,6	1,2	0,8	1,4	1,2	0,7	1,2	0,8	0,7	1,1	1,5	1,1	0,8
	CXCR2	2,5	1,1	0,5	1,1	1,0	1,7	0,8	0,8	1,0	1,1	0,8	0,9	1,4	1,3	0,9
	PLAUR	2,9	1,9	2,0	3,2	1,5	1,7	1,2	1,0	1,1	0,9	0,9	1,1	1,0	1,2	0,8
	FGF2	2,5	1,4	1,2	2,0	2,5	1,6	0,9	0,9	1,2	1,2	1,2	1,0	1,3	1,4	0,9
	TGFb1	0,7	0,6	1,7	1,5	1,1	0,7	0,6	0,9	1,4	0,8	1,1	1,1	1,2	1,0	0,7
	FTH1	1,7	0,9	0,8	1,2	0,9	0,8	1,5	0,8	1,2	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0	1,2
	ITGB8	1,2	1,1	1,2	1,9	1,5	1,0	0,8	1,0	0,8	1,0	1,1	1,1	1,8	1,0	0,9
	POLR2A	1,5	0,9	1,1	1,5	0,7	1,1	0,8	1,0	1,5	1,0	0,8	0,8	1,6	0,8	1,1
	U2AF1	1,6	0,9	0,7	1,2	1,1	1,3	1,1	0,8	1,2	1,0	0,9	1,0	0,5	1,1	0,7
F3	2,5	2,1	1,4	2,0	1,3	1,1	1,1	0,9	0,8	0,9	0,7	0,7	0,6	0,8	0,9	
C3	2,0	1,2	1,4	1,7	1,0	1,3	1,1	0,8	0,8	0,7	0,7	1,2	1,9	0,7	0,7	
c-JUN	2,1	1,3	1,7	0,8	1,4	1,4	1,3	1,1	0,9	1,3	1,0	1,4	0,7	1,8	1,1	
mindestens 1,5-fache Induktion durch IL-1 $\alpha$	IL-6	38	15	12	37	22	1,7	0,4	1,3	1,4	1,5	1,3	0,7	1,6	1,3	1,0
	CXCL8	79	12	5,1	73	32	2,9	0,3	1,4	0,9	1,5	0,9	1,0	1,6	1,0	1,0
	PTGS2	13	3,8	2,6	11	11	1,6	0,5	1,1	0,9	1,0	0,9	0,7	1,7	1,1	0,7
	BIRC3	31	9,3	4,1	15,9	15,4	1,7	0,4	1,4	1,2	1,4	1,0	1,0	1,7	1,3	0,8
	CCL20	190	54	13	185	110	1,7	0,9	1,9	1,2	1,6	0,8	0,7	1,6	1,5	0,8
	CCL5	6,6	3,7	9,4	7,8	2,5	2,1	1,4	0,8	2,6	1,5	1,1	1,2	1,1	1,2	0,9
	DSCR1	3,9	2,2	1,8	5,3	1,9	1,1	0,6	1,0	1,1	1,0	0,5	0,8	1,4	1,2	0,7
	SOD2	4,1	1,7	1,9	3,7	3,4	1,8	1,0	1,2	1,1	1,2	1,1	1,0	1,3	1,2	0,8
	CXCL3	38	26	23	44	17	1,5	0,6	1,4	1,0	1,1	0,9	0,8	1,4	0,9	0,8
	BF	5,8	2,3	3,8	9,1	3,5	1,5	0,7	0,8	1,2	1,5	1,0	1,0	1,2	1,5	0,8
	BIRC2	3,4	2,5	1,5	3,6	2,4	1,1	0,8	1,0	1,3	0,9	0,8	0,9	2,1	1,2	0,8
	NFKB1	6,5	3,9	2,5	3,8	2,6	1,3	0,9	0,9	0,8	0,9	0,8	0,7	1,4	0,6	0,8
RIPK2	3,5	2,3	1,6	2,6	1,6	1,4	0,9	0,8	1,2	0,9	0,9	1,1	1,1	1,6	0,9	

Tabelle 11: siRNA-Effekte auf Entzündungsgene in unstimulierten und stimulierten (4h IL-1 $\alpha$ ) c-JUN, JUNB, JUND Exp.1 (8h IL-1 $\alpha$ ), cFOS und FRA-1 *knock down*-Zellen

Auswahl aus der Schnittmenge der Gensonden von Abbildung 31, die in mindestens einem *knock down* eine mindestens 1,5-fache Regulation aufweisen. Es sind die Ratios, bezogen auf die jeweilige unstimulierte

Transfektionsreagenz-Kontrolle (TR), dargestellt. Die Genprodukte sind sortiert nach ihrer IL-1 $\alpha$ -Induktion (IL-1 $\alpha$ / TR) in den Kontrollzellen aller fünf Arraygruppen: Oben stehen die nicht regulierten Gene, in der Mitte diejenigen, die nur in einem Teil der Experimente eine mindestens 1,5-fache Induktion zeigen. Unten sind die Gene aufgeführt, die in allen Arrays eine mindestens 1,5-fache Induktion durch IL-1 $\alpha$  zeigen. Rote und grüne Schrift symbolisiert eine mindestens 1,5-fache Regulation des entsprechenden Gens. Blaue Kästen umrahmen Genprodukte, die untereinander gleiche Regulationsmuster in mehr als einem *knock down*-Ansätze aufweisen.

In der ersten Gruppe sind sieben Gene zusammengefasst, die durch eine vierstündige Stimulation mit IL-1 $\alpha$  nicht induzierbar sind aber eine AP-1-Abhängigkeit von mindestens einem Transkriptionsfaktor zeigen. Die zweite Gruppe umfasst 20 Gene, die nicht in allen Vergleichszellen der Arraygruppen induziert sind, jedoch wiederum mindestens von einem Mitglied der JUN/ FOS-Familie reguliert werden. 13 Entzündungsgene bilden Gruppe drei. Sie sind in den Kontrollzellen jeder Arraygruppe wenigstens 1,5-fach hochreguliert und zeigen zusätzlich eine AP-1-Abhängigkeit. Diese kann sowohl eine Induktion oder eine Repression durch die Applikation der siRNAs bedeuten.

Es gibt nur drei Fälle, in denen mRNAs untereinander gleiche Regulationsmuster in mehr als einem *knock down*-Experiment aufweisen. Diese sind in der Tabelle 11 blau umrahmt. Die Tabelle enthält eine große Anzahl an Genprodukten, die nur in einem *knock down*-Ansatz AP-1-abhängig reguliert werden und die deshalb keiner weiteren Analyse unterzogen wurden.

Die umrahmten mRNAs MDA5 und IRF7 gehören zu einer funktionellen Gengruppe, die durch Interferone, dsRNAs und virale Infektion induziert werden kann. In Tabelle 12 wurden alle Gene des Entzündungsarrays, die im Zusammenhang mit einer Interferonantwort stehen, zusammengefasst. Auch Ratios, gebildet aus Intensitäten mit einem Wert unter 100, wurden in die Tabelle mit aufgenommen, jedoch in Klammern gesetzt.

Gen-sonden	siRNA-Effekt im unstimulierten Zustand					siRNA-Effekt im stimulierten Zustand (4h/ 8h IL-1 $\alpha$ )				
	c-JUN	JUNB	JUND Exp.1	cFOS	FRA-1	c-JUN	JUNB	JUND Exp.1	cFOS	FRA-1
CXCL10	1,0	(1,0)	(1,1)	(1,0)	1,1	<b>1,5</b>	<b>(1,8)</b>	<b>(2,2)</b>	<b>(2,8)</b>	1,2
IRF1	1,1	(0,8)	(1,0)	1,1	0,7	1,0	(1,1)	(1,0)	1,2	0,9
IRF7	<b>1,5</b>	0,9	1,0	1,4	1,5	<b>1,6</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>1,5</b>	1,1
TNFSF13b	1,0	(1,1)	(1,1)	(0,7)	(1,2)	1,0	(1,2)	(1,2)	(1,5)	(1,0)
GBP1	1,0	(0,9)	(1,0)	(1,2)	1,0	1,0	(1,0)	(1,5)	<b>(2,1)</b>	1,2
IFIT1	<b>2,5</b>	<b>1,9</b>	(1,3)	<b>2,0</b>	<b>2,3</b>	<b>3,1</b>	<b>2,9</b>	<b>(4,9)</b>	<b>2,8</b>	<b>1,7</b>
MDA5	<b>1,7</b>	1,2	1,0	<b>1,6</b>	<b>1,7</b>	<b>2,0</b>	2,1	<b>2,6</b>	<b>2,2</b>	1,3
MX1	1,1	(0,8)	(1,1)	1,3	1,5	1,1	<b>(1,6)</b>	<b>(2,8)</b>	<b>1,8</b>	1,3
GAPDH	1,4	1,3	0,8	1,3	0,7	0,7	0,8	1,0	1,0	0,6

**Tabelle 12: Induktion von Interferon-, dsRNA- und viralen Infektion-induzierbaren Genen durch siRNAs gegen AP-1-Untereinheiten**

Die Tabelle zeigt neun Interferon-, dsRNA- und virale Infektion-induzierbare Gene und deren Regulation in *knock down*-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Unstimulierte *knock down*-Zellen wurden auf die unstimulierte Transfektionsreagenz-Kontrolle bezogen und die stimulierten *knock down*-Zellen (4h IL-1 $\alpha$ , bei JUND siRNA-Exp.1 8h IL-1 $\alpha$ ) auf die stimulierte Transfektionsreagenz-Kontrolle. Für diesen Vergleich wurden auch Intensitäten von Sonden mit Werten unter 100 verwendet. Diese Ratios wurden in Klammern gesetzt. Fett gedruckt sind die Ratios, die eine mindestens 1,5-fache Induktion zeigen.

Basal sind nur ein Drittel der neun aufgelisteten Gene mindestens 1,5-fach in mindestens einem *knock down*-Ansatz hochreguliert, wobei die maximale Induktion bei einem Faktor von 2,5 liegt. Es kann folglich in diesen siRNA-Experimenten nicht von einer Induktion der gesamten Interferonantwort ausgegangen werden. Im Vergleich zu der verhaltenen Induktion im basalen Zustand der Zelle zeigt sich nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  eine deutlich breitere und auch intensivere Antwort der Gene. Dabei lässt sich bezüglich der unspezifischen Interferonantwort kein Unterschied zwischen der Verwendung einzelner siRNAs (JUNB, cFOS) und siRNA-Gemische (c-JUN, JUND, FRA-1) erkennen. Diese Ergebnisse bestätigen den Vorteil der Verwendung von chemisch synthetisierten siRNAs gegenüber den anderen Methoden.

IL-8 (CXCL8) und IL-6 sowie BIRC3 und PTGS2 haben in der unstimulierten und auch in der IL-1 $\alpha$ -induzierten Situation gleiche AP-1-abhängige Regulationsmuster. Sie sind ebenfalls in Tabelle 11 mit einem blauen Rahmen gekennzeichnet.

Die beiden Interleukine IL-8 und IL-6 zeigen bei partieller Hemmung von c-JUN und FRA-1 im basalen Zustand eine mindestens 1,5-fache Hochregulation, während in den JUNB *knock down*-Zellen die mRNA-Expression reprimiert wird. Nach achtstündiger IL-1 $\alpha$ -Stimulation hat die Applikation von JUND siRNAs eine induzierende Wirkung auf die IL-8 und IL-6 mRNAs. Folglich haben in der intakten Zelle c-JUN, FRA-1 und JUND im Gegensatz zu JUNB keine induzierende Funktion, sondern wirken als Repressoren auf die IL-8 und IL-6 mRNA-Expression.

Das Zytokin IL-6 wird durch den Interferonsignalweg induziert. Bei unspezifischer Induktion der Interferonzielgene durch die siRNAs kann es zur interferonabhängigen Genregulation kommen und damit zur falschen Interpretation der siRNA-Effekte. Im vorliegenden Fall wird IL-6 jedoch unterschiedlich in den fünf *knock down*-Zellen reguliert, was darauf schließen lässt, dass hier spezifische siRNA-Effekte beobachtet werden.

BIRC3 und PTGS2 werden wie IL-8 und IL-6 mit Ausnahme der Wirkung des FRA-1 *knock down*-Ansatzes in gleicher Weise AP-1-abhängig reguliert. Eine partielle FRA-1-Deletion hat offensichtlich keine regulatorische Bedeutung für die Expression von BIRC3 und PTGS2.

Durch die sorgfältige Analyse des Entzündungsprofils in den einzelnen AP-1 *knock down*-Systemen konnten somit vier interessante Kandidatengene identifiziert werden, deren Regulation durch mehrere AP-1-Komponenten beeinflusst ist. Die mRNAs von IL-8 und IL-6 sind am stärksten durch siRNAs gegen AP-1-Untereinheiten beeinträchtigt und wurden daher für weitere funktionelle Studien ausgewählt.

#### **3.2.2.4 Validierung der Effekte der c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 *knock down*-Ansätze auf die Entzündungsgene IL-8 und IL-6**

Die Befunde der Microarray-Analysen bezüglich IL-8 und IL-6 wurden unter Verwendung der TaqMan-Technik mit Real Time PCR validiert. Dabei wurden die für die Microarrays verwendeten Proben der siRNA-Experimente eingesetzt. Neben den vier *knock down*-Ansätze (c-JUN, JUNB, JUND und FRA-1), die in der Genexpressionsuntersuchung einen Effekt auf IL-8 und IL-6 gezeigt haben, wurde auch der cFOS *knock down* in diesem Zusammenhang untersucht. Die Daten wurden auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin normiert und

anhand der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Hierbei wurden die Bedingungen so optimiert, dass die  $C_T$ -Werte der Haushaltsgene gut vergleichbar waren.

Die Effekte der fünf *knock down*-Experimente durch die siRNAs gegen c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf die mRNAs des Chemokins IL-8 und des Zytokins IL-6 sind in Abbildung 32 dargestellt. Die Daten der Real Time PCRs bestätigen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse durch die Entzündungsarrays. Zudem konnten, durch die sensitivere Messmethode bedingt, weitere Abhängigkeiten in der AP-1-vermittelten Regulation von IL-8 und IL-6 identifiziert werden.

Abbildung 32 A zeigt die Real Time PCR-Ergebnisse und Abbildung 32 B veranschaulicht die aus den PCR-Daten resultierende Regulation der AP-1-Untereinheiten in intakten Zellen. Wie schon die IL-1 $\alpha$ -Kinetik aus Abbildung 22, zeigen auch diese Real Time PCR-Ergebnisse, dass die mRNAs von IL-8 und IL-6 stark durch IL-1 $\alpha$  induziert werden. Im unstimulierten Zustand haben die AP-1-Untereinheiten c-JUN, cFOS, FRA-1 und JUND in intakten Zellen einen hemmenden Effekt auf IL-6, während JUNB die IL-6 mRNA-Expression fördert. Die dargestellten Ratios des JUNB *knock down*-Experimentes sind im Vergleich zu den anderen niedrig, was an einem hohen Basalniveau von IL-8 und IL-6 liegen kann.

Ob es sich bei den beobachteten Effekten um direkte oder indirekte Mechanismen handelt, ist mit Hilfe dieser Ergebnisse nicht zu beantworten.

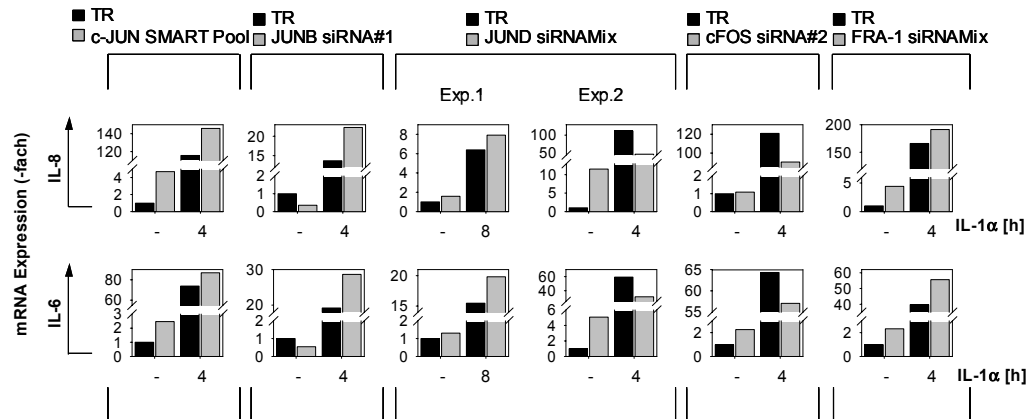
Bei den Transkriptionsfaktoren JUNB und JUND kehrt sich die Wirkung auf die IL-6-Regulation nach einer Stimulationsdauer von 4h um, während sich der Einfluss von c-JUN und FRA-1 auf IL-6 nicht verändert. Die AP-1-Komponente cFOS hat nach vierstündiger Stimulation mit IL-1 $\alpha$  keinen Effekt auf die mRNA-Expression von IL-6. Folglich wirken c-JUN, JUNB und FRA-1 zu diesem Zeitpunkt als Inhibitoren von IL-6, während JUND induzierenden Einfluss hat. JUND zeigt nach achtstündiger IL-1 $\alpha$ -Behandlung wieder inhibitorischen Einfluss auf IL-6. Untersuchungen mit zwei Stimulationszeitpunkten (4h und 8h IL-1 $\alpha$ ) liegen nur für ein Experiment mit JUND siRNAs (Exp.2) vor.

Den Daten zufolge ist JUND an der Regulation der beiden Entzündungsgene IL-8 und IL-6 beteiligt, obwohl der Transkriptionsfaktor auf mRNA-Ebene nicht merklich durch IL-1 $\alpha$  induziert wird (vgl. IL-1 $\alpha$ -Kinetik der Transkriptionsfaktoren, Abbildung 23).

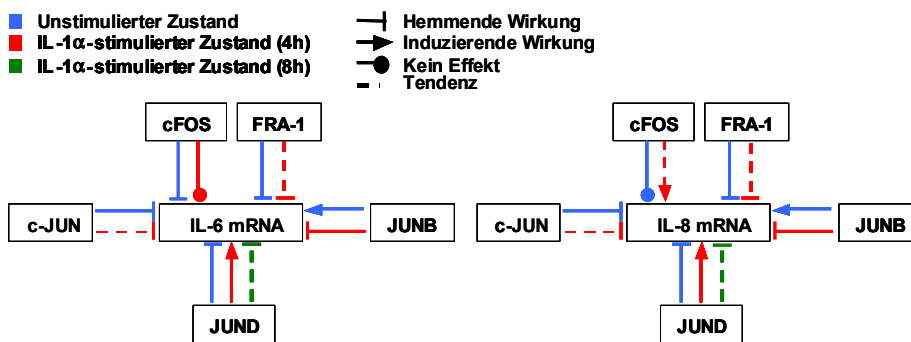
Bei einem Vergleich der Ergebnisse von IL-8 und IL-6 fällt auf, dass sich die Regulation der beiden Entzündungsgene durch die untersuchten fünf AP-1-Untereinheiten nur in der cFOS-abhängigen Regulation unterscheidet. Zum einen hat cFOS auf den basalen IL-8 mRNA-Spiegel im Vergleich zu der hemmenden Wirkung auf die IL-6 mRNA keinen Einfluss. Zum anderen unterscheidet sich der Effekt von cFOS bezüglich IL-8 und IL-6 auch im stimulierten Zustand. Die AP-1-Komponente cFOS zeigt eine induzierende Wirkung auf die Expression von IL-8 im Gegensatz zu der Expression von IL-6, die nicht beeinflusst wird.



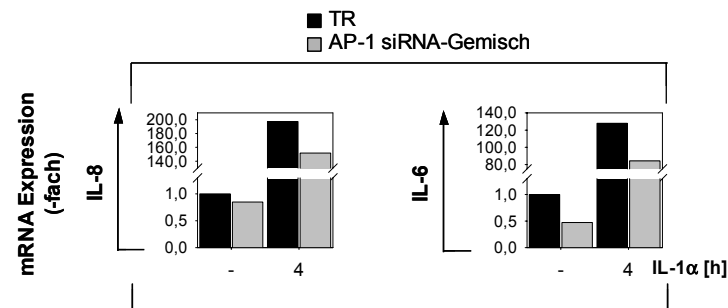
A



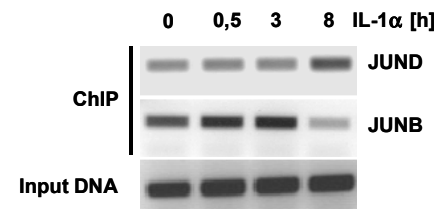
B



C



D



**Abbildung 32: Effekte von AP-1-Komponenten in Einzel- und kombinatorischen *knock down*-Ansätzen auf IL-8 und IL-6 und IL-1α-induzierte Rekrutierung von JUNB und JUND an den IL-8-Promotor**

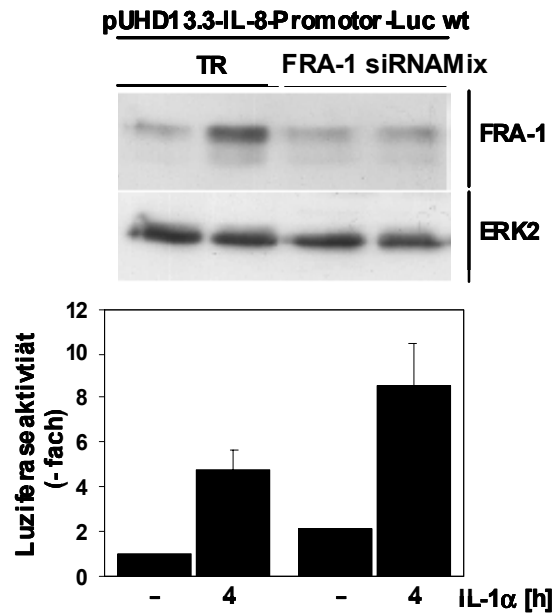
(A) Die RNA der Vergleichs- und *knock down*-Zellen aus Abbildung 26 wurde verwendet, um cDNA für eine Real Time PCR zu synthetisieren. Unter Verwendung von *TaqMan-Assays on Demand* gegen IL-8 und IL-6 wurde die relative Expression für IL-8 und IL-6 bestimmt. Die dargestellten Daten sind auf  $\beta$ -Aktin normiert, mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet und auf die jeweilige Transfektionsreagenz-Kontrolle (TR) bezogen. (B) Schematische Darstellung der aus den Real Time PCR-Ergebnissen resultierenden AP-1-abhängigen Regulation auf die IL-8- und IL-6-mRNA in intakten Zellen. Effekte ab einer 1,2-fachen Regulation wurden als gestrichelte Linien ins Schema mit aufgenommen. (C) Humane KB-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/ 24-Loch) wurden 48h nach Aussaat für 48h mit 200nmol/l siRNAs pro AP-1-Untereinheit (AP-1 siRNA-Gemisch: c-JUN SMART Pool, JUNB siRNA#1, JUND siRNAMix, cFOS siRNA#2, FRA-1 siRNAMix) oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 4h mit IL-1α (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die IL-8- und IL-6-mRNA-Expressionsdaten der Kontroll- und Mehrfach-*knock down*-Zellen wurden, wie unter (A) beschrieben, generiert und ausgewertet. (D) Humane KB-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit IL-1α (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach der Präparation von löslichem Chromatin wurde die Besetzung von JUNB und JUND am IL-8-Promotor durch Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) analysiert. Teile des Gesamt Chromatins (Input DNA) und mit immunpräzipitierten Proteinen assoziierte DNA wurden durch PCR mit Primern, die 200bp der regulatorischen Sequenz des IL-8-Promotors abdecken, amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert.

Die umfangreiche Genexpressionsanalyse der verschiedenen AP-1 *knock down*-Systeme hat zum einen IL-8 und IL-6 als Zielgene mehrerer AP-1-Untereinheiten identifiziert und zum anderen Unterschiede in der Regulation dieser Entzündungsgene in den einzelnen *knock down*-Experimente aufgezeigt. Diese nur schwachen Effekte auf die Expression von IL-8 und IL-6 können durch verschiedene Ansätze interpretiert werden. Ein möglicher Grund ist eine funktionelle Kompensation der supprimierten AP-1-Komponenten durch andere AP-1-Untereinheiten. Aus diesem Grund wurde in einem initialen Experiment ein kombinatorischer *knock down* mit den siRNA-Oligonukleotiden bzw. siRNA-Gemischen gegen c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 durchgeführt. Ziel war es, durch die parallele partielle Suppression der fünf AP-1-Komponenten eine größere Veränderung auf die Zielgene IL-8 und IL-6 zu erreichen. Zugleich wurde die Expression von IFIT1, dem in den Einzel-*knock downs* am stärksten unspezifisch induzierten Gens (Tabelle 12), mitbestimmt. In Abbildung 32 C ist die Expression von IL-8 und IL-6 in einem solchen Mehrfach-*knock down*-Ansatz gezeigt. Die Daten wurden unter Verwendung der *TaqMan-Assays on Demand* mit Real Time PCR generiert und auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin normiert.

Durch die Applikation der insgesamt zwölf siRNA-Oligonukleotide konnte für beide Entzündungsgene eine Expressionsveränderung gemessen werden. Diese zeigt im unstimulierten und stimulierten Zustand eine Hemmung der IL-8- bzw. IL-6-Expression, unter Bedingungen unter denen IFIT1 nicht durch die siRNAs induziert ist (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend tritt im Vergleich zu den Einzel-*knock down*-Experimenten in kombinatorischen *knock down*-Zellen ein deutlich anderes Expressionsmuster auf. Bei einer gleichzeitigen Suppression aller fünf AP-1-Untereinheiten wirken sich nur die Effekte der JUNB, JUND und cFOS Einzel-*knock down*-Ansätze aus. Diese weisen im unstimulierten (JUNB) bzw. im stimulierten (JUND, cFOS (nur bei IL-8)) eine Inhibition der IL-8- und IL-6-Expression auf. Unterstützend für diesen Befund konnte Dr. Elke Hoffmann die Bindung von JUNB und JUND an den endogenen IL-8-Promotor zeigen (Abbildung 32 D). Nach achtstündiger Stimulation mit IL-1 $\alpha$  kommt es zu einer veränderten Besetzung des Promotors: JUNB wird durch JUND ersetzt. Die Bindung von cFOS ist in Hoffmann et al. publiziert worden (Hoffmann et al., 2005). Die Intensität der Hemmung auf IL-8 und IL-6 entspricht denen der in Abbildung 32 A dargestellten Einzel-*knock down*-Ansätze.

Mit Hilfe dieses initialen Experimentes konnte in Übereinstimmung mit der Literatur (Zenz et al., 2005) eindeutig dargelegt werden, dass durch die Deletion von mehreren AP-1-Untereinheiten stärkere Phänotypen identifiziert werden können.

Der Effekt von FRA-1 im Einzel-*knock down*-Ansatz auf die IL-8 mRNA bestätigt eine frühere Veröffentlichung von Hoffmann et al., in der gezeigt wurde, dass sowohl FRA-1 als auch cFOS direkt an den IL-8-Promotor binden und die Gentranskription gegensätzlich regulieren (Hoffmann et al., 2005).



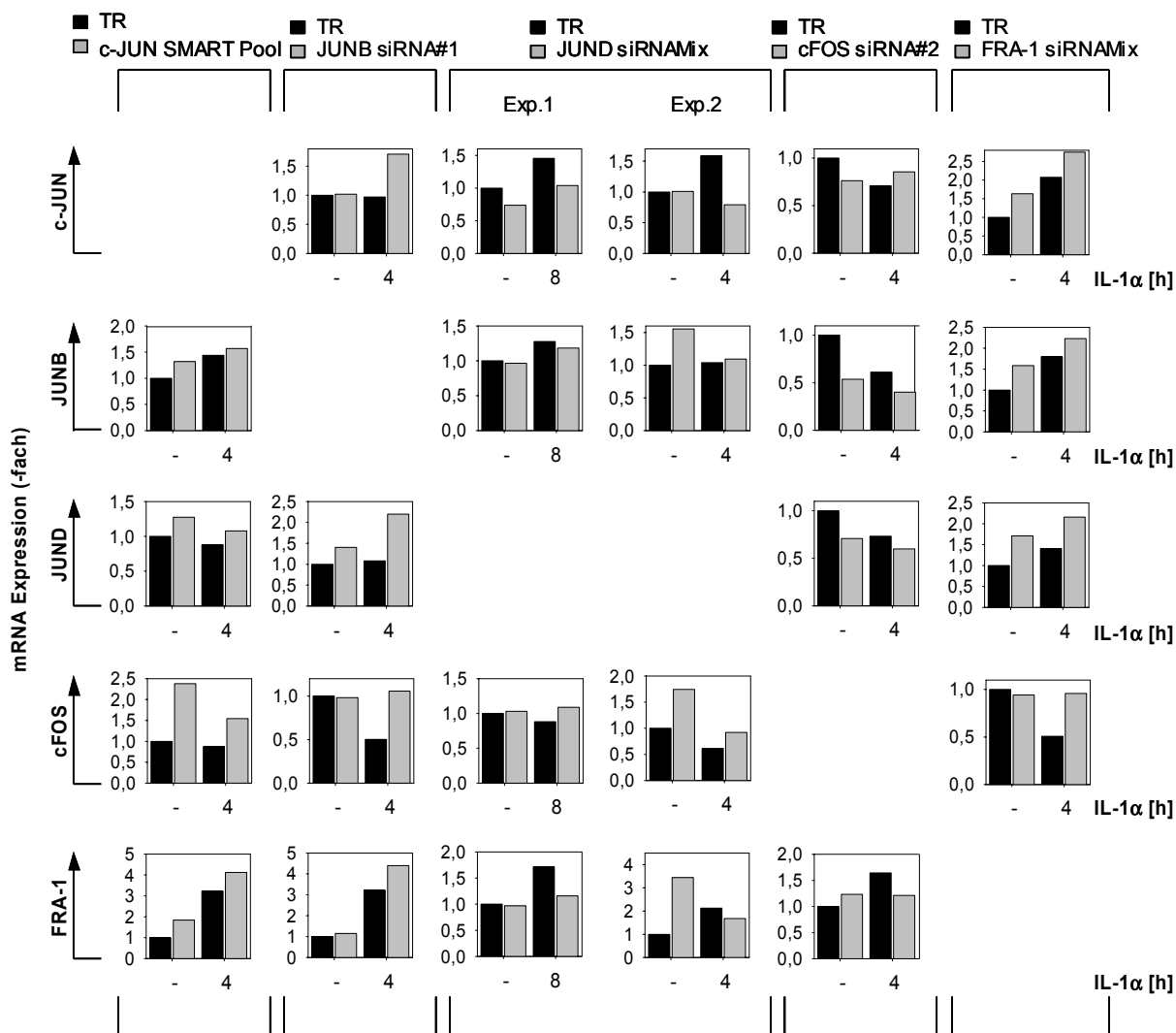
**Abbildung 33: Induktion des IL-8-Luziferasereporters in FRA-1 *knock down*-Zellen (aus: Hoffmann et al., 2005)**

Humane KB Zellen ( $6,5 \times 10^4$  Zellen/ 24-Loch) wurden mit 200nmol/l FRA-1 siRNAMix oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. 250ng des IL-8 Luziferasereporter-Plasmids (pUHD13.3-IL-8-Promotor-Luc wt) wurden kotransfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für 4h mit IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen und lysiert. Die Luziferaseaktivität wurde bestimmt und parallel dazu die Suppression von FRA-1 im Westernblot mit einem  $\alpha$ -FRA-1 Antikörper detektiert. Dargestellt ist der Mittelwert der Luziferaseaktivität  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 33 zeigt einen Reporter-genversuch, bei dem eine siRNA-vermittelte FRA-1-Suppression die Luziferaseaktivität um fast das Zweifache erhöht. Dieses Ergebnis wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Elke Hoffmann erzielt. Der zu den Microarrays und Real Time PCRs alternative Versuchsansatz für den FRA-1 *knock down* bestätigt die in Abbildung 32 dargestellten Resultate. Die Schlussfolgerung ist, dass die Ergebnisse trotz der kleinen Effekte in den fünf *knock down*-Systemen valide sind.

### 3.2.2.5 Gegenseitige Regulation der AP-1-Faktoren c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1

Um die wechselseitige Regulation der AP-1-Komponenten zu untersuchen, wurden *TaqMan-Assays on Demand* verwendet. Die Balkengraphen in Abbildung 34 zeigen die auf  $\beta$ -Aktin normierte mRNA-Expression der einzelnen AP-1-Untereinheiten, berechnet nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die zur Normierung verwendeten  $C_T$ -Werte von  $\beta$ -Aktin waren sehr gut vergleichbar. Dies ist eine wichtige Information für die Interpretation der dargestellten kleinen Effekte.



**Abbildung 34: Beeinflussung der mRNA-Expression von AP-1-Untereinheiten in den c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 knock downs**

Die RNA der Vergleichs- und *knock down*-Zellen aus Abbildung 26 wurde verwendet, um cDNA für eine Real Time PCR zu synthetisieren. Unter Verwendung von *TaqMan-Assays on Demand* gegen c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 wurden relative Expressionsdaten generiert. Die dargestellten Daten sind auf  $\beta$ -Aktin normiert, mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet und auf die jeweilige Transfektionsreagenz-Kontrolle (TR) bezogen.

Tabelle 13 verdeutlicht die Regulation von fünf AP-1-Komponenten durch JUN/ FOS-Familienmitglieder in intakten Zellen als Konsequenz der siRNA-Effekte in den *knock down*-Zellen. Dafür sind die Ergebnisse der *knock down*-Zellen (Abbildung 34) reziprok dargestellt. Induktion und Repression sind an der Richtung der Pfeile abzulesen. Es sind Effekte ab

einer 1,2-fachen Regulation eingetragen, wobei die Ratios zwischen 1,2 und 1,4 in Klammern gesetzt sind.

		Einfluss von						
		c-JUN	JUNB	JUND Exp.1	JUND Exp.2	cFOS	FRA-1	
Einfluss auf	c-JUN	█		(↑)		(↑)	↓	
	JUNB	(↓)	█		↓	↑	↓	
	JUND	(↓)	(↓)	█	█	(↑)	↓	
	cFOS	↓			↓	█		
	FRA-1	↓			↓	(↓)	█	

		Einfluss von						
		c-JUN	JUNB	JUND Exp.1	JUND Exp.2	cFOS	FRA-1	
Einfluss auf	c-JUN	█	↓	(↑)	↑	(↓)	(↓)	
	JUNB		█			↑	(↓)	
	JUND	(↓)	↓	█	█		↓	
	cFOS	↓	↓	(↓)	↓	█	↓	
	FRA-1	(↓)	(↓)	(↑)	(↑)	(↑)	█	

**Tabelle 13: Gegenseitige Effekte der AP-1-Komponenten c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf die mRNA-Expression dieser Transkriptionsfaktoren**

Die beiden Tabellen stellen die Regulation der AP-1-Untereinheiten untereinander in intakten Zellen dar, als Konsequenz der Effekte in den *knock down*-Zellen aus Abbildung 34. Die Richtung der Regulation lässt sich anhand der Pfeilrichtungen ablesen. Ratios zwischen 1,2 und 1,4 sind in Klammern gesetzt.

Im unstimulierten c-JUN *knock down*-Ansatz zeigen die vier untersuchten Transkriptionsfaktoren JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 eine Induktion, so dass c-JUN eine repressorische Wirkung auf diese mRNAs hat, wobei die stärkste Induktion nach Applikation des c-JUN SMART Pools bei der mRNA von cFOS zu verzeichnen ist. Damit ist c-JUN der einzige Transkriptionsfaktor, der im unstimulierten Zustand einen hemmenden Einfluss auf alle weiteren untersuchten Faktoren hat. Auch in der IL-1 $\alpha$ -stimulierten Situation inhibiert c-JUN die Transkriptionsfaktoren JUND, cFOS und FRA-1. Die mRNA von JUNB unterliegt keinem Einfluss durch c-JUN nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$ .

Als Einfluss von JUNB lässt sich nur eine schwache Hemmung der JUND mRNA erkennen; die anderen Faktoren werden von JUNB nicht reguliert. Im Gegensatz dazu werden alle vier AP-1-Untereinheiten unter IL-1 $\alpha$ -Einfluss von JUNB inhibiert.

Die beiden Ergebnisse des JUND *knock down*-Experimentes sind im unstimulierten Zustand nicht konsistent. Dies kann den Grund haben, dass bei Experiment 2 (4h IL-1 $\alpha$ ) die Proteinisofomen von JUND nur in der stimulierten Situation ausreichend durch die siRNAs supprimiert werden konnten (Abbildung 26, Spalte unstimulierte Probe). Im Experiment 1 jedoch ist JUND sowohl im basalen als auch im stimulierten Zustand reduziert. Bei Betrachtung des letzteren Versuchs in intakten Zellen ist nur eine Induktion der c-JUN mRNA durch JUND zu erkennen, während die anderen Transkriptionsfaktoren nicht beeinflusst werden. Im stimulierten Zustand sind die Datensätze qualitativ gleich, obwohl es sich um zwei unterschiedliche Stimulationszeiten handelt. Das Ausmaß der Regulation ist jedoch unterschiedlich, was durch die beiden verschiedenen Stimulationszeitpunkte bedingt sein kann. JUND hat nach vier- bzw. achtstündiger IL-1 $\alpha$ -Behandlung keinen Einfluss auf JUNB,

während c-JUN und FRA-1 positiv reguliert werden. Die cFOS mRNA zeigt eine repressorische Kontrolle durch JUND.

Im unstimulierten Zustand wird die mRNA-Expression von c-JUN, JUNB und JUND durch cFOS induziert und die von FRA-1 gehemmt. Unter IL-1 $\alpha$ -Einfluss antworten JUNB sowie FRA-1 mit einer verstärkten mRNA-Synthese und c-JUN wird durch cFOS repressorisch beeinflusst. Die JUND mRNA wird nach Behandlung mit IL-1 $\alpha$  nicht von cFOS reguliert.

Der Transkriptionsfaktor FRA-1 bewirkt basal eine Hemmung der mRNAs von c-JUN, JUNB und JUND und hat keinen Effekt auf cFOS. Unter Einfluss von IL-1 $\alpha$  supprimiert FRA-1 alle vier anderen untersuchten AP-1-Untereinheiten.

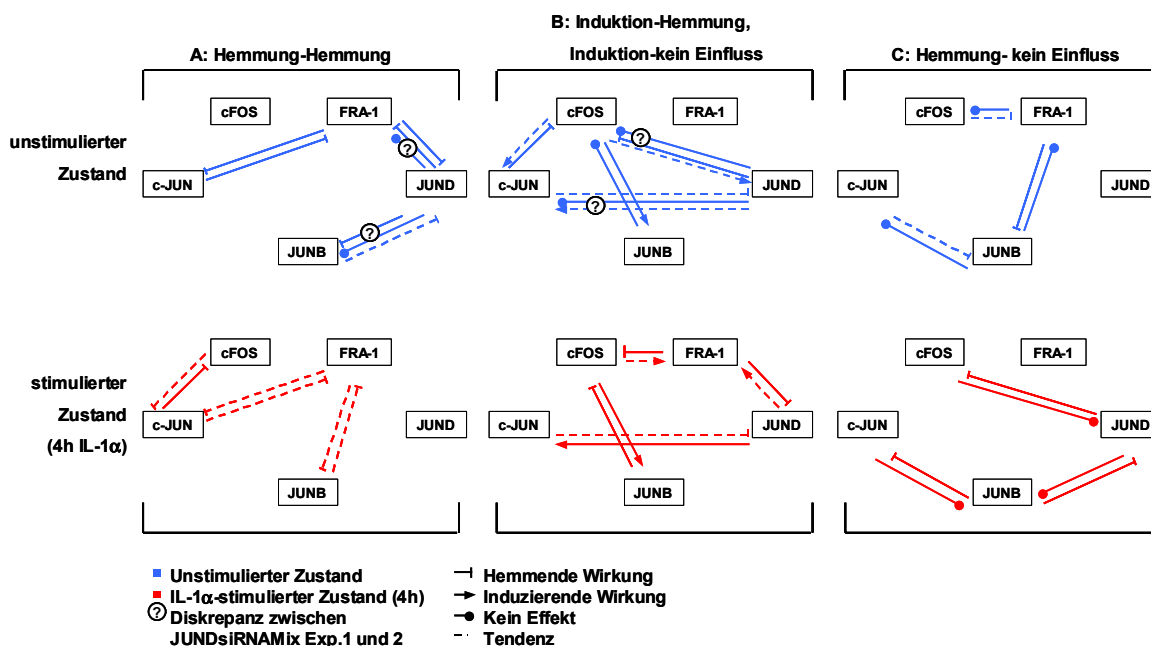
Die Abhängigkeiten in der gegenseitigen Regulation der AP-1-Komponenten werden in Abbildung 35 dargestellt. Dafür wurde die wechselseitige Beziehung in der Regulation von Transkriptionsfaktor-Paaren in drei Gruppen unterteilt:

Gruppe	Einfluss von Transkriptionsfaktor-Partner 1	Einfluss von Transkriptionsfaktor-Partner 2
A	Hemmung	Hemmung
B	Induktion	Hemmung oder kein Einfluss
C	Hemmung	kein Einfluss

Es fällt auf, dass sich die meisten Regulationsmuster der Transkriptionsfaktor-Paare durch eine Stimulation mit IL-1 $\alpha$  verändern. Nur bei maximal drei Paaren sind keine Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zustand zu erkennen: c-JUN – FRA-1, c-JUN – JUNB und unter Vorbehalt c-JUN – JUND. Die inkonsistenten Ergebnisse der zwei JUND siRNA-Experimente bezüglich ihrer regulatorischen Funktion auf die anderen vier JUN/ FOS-Familienmitglieder erlauben im unstimulierten Zustand keine eindeutige Aussage. Transkriptionsfaktor-Paare mit JUND in der basalen Situation sind im Folgenden eingeklammert und in Abbildung 35 mit einem Fragezeichen versehen.

Interessant ist weiterhin, dass zwischen den Transkriptionsfaktor-Paaren hauptsächlich hemmende Effekte beobachtet werden; kein Paar induziert seine gegenseitige Induktion. Wie Abbildung 35 B verdeutlicht, gibt es jedoch Rückkopplungshemmungen, bei denen ein Partner seine Repression durch Induktion eines zweiten Partners selbst induziert. Dazu gehören im unstimulierten Zustand die Paare cFOS – c-JUN, (cFOS – JUND) und (JUND – c-JUN) sowie in der IL-1 $\alpha$ -stimulierten Situation cFOS – FRA-1, cFOS – JUNB, JUND – c-JUN und JUND – FRA-1.

Neben diesem Rückkopplungsmechanismus zeigt Gruppe B auch Regulationsmuster, bei dem sich die Partner nicht bzw. positiv beeinflussen. Der ansonsten überwiegende repressorische Einfluss der Transkriptionsfaktor-Paare teilt sich auf in Gruppe A mit gegenseitiger Hemmung und Gruppe C mit hemmendem kombiniert mit keinem Einfluss.



**Abbildung 35: Regulation der AP-1-Untereinheiten c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 untereinander**

Schematische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 13. Es gilt für jedes Transkriptionsfaktor-Paar: Das Protein vermittelt den Effekt auf die mRNA-Expression des entsprechenden Partners. Die Regulation in intakten Zellen zwischen den einzelnen AP-1-Untereinheiten ist in drei Gruppen eingeteilt: Hemmung-Hemmung, Induktion-Hemmung oder Induktion-kein Einfluss und Hemmung-kein Einfluss. Ratios zwischen 1,2 und 1,4 wurden als gestrichelte Linien ins Schema mit aufgenommen.

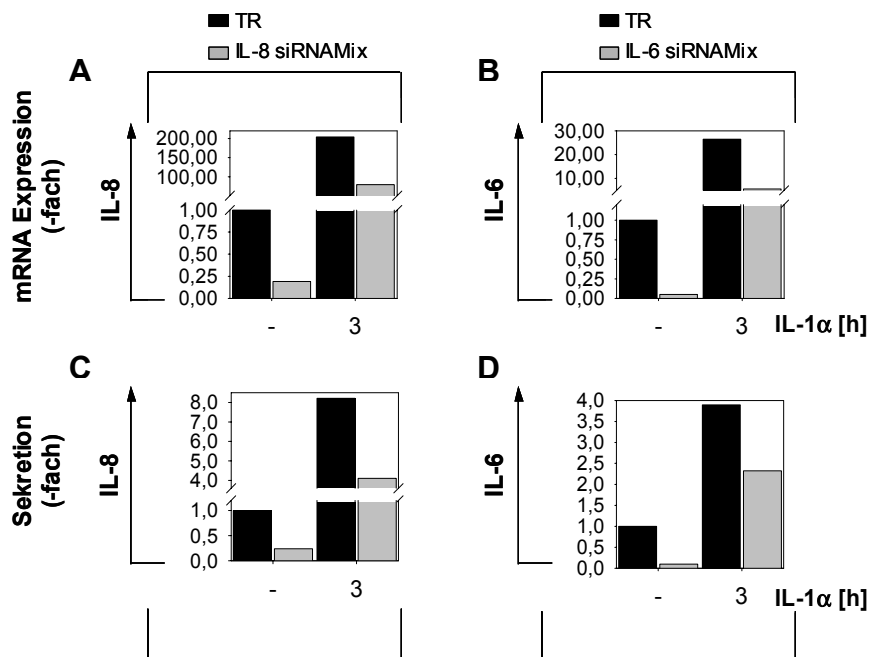
### 3.2.3 RNAi-vermittelte Suppression auf Ebene der Entzündungsgene

#### 3.2.3.1 Etablierung und Validierung der direkten siRNA-vermittelten Suppression der Entzündungsgene IL-8 und IL-6

Die Arrayanalysen haben gezeigt, dass IL-8 und IL-6 sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene stark induzierte Entzündungsgene sind, deren Expression sich durch MAPK-Hemmstoffe (Kapitel 3.2.1.1) und siRNAs gegen MAPK-regulierte AP-1-Transkriptionsfaktoren (Kapitel 3.2.2.4) partiell modulieren lässt. Neben der Möglichkeit der Veränderungen der Expression von Entzündungsgenen auf Signaltransduktionsebene könnten diese Gene auch selektiv direkt durch siRNA-Moleküle gehemmt werden. Daher wurden Experimente mit IL-8 und IL-6 siRNAs in KB-Zellen mit dem Ziel etabliert, die entzündliche Genregulation distal von MAPK und AP-1-Untereinheiten spezifisch zu beeinflussen. Ein Teil dieser Arbeiten wurden in Kooperation mit MWG Biotech durchgeführt (Kettner-Buhrow and Kracht, 2005).

Zur Herstellung von IL-8 und IL-6 *knock down*-Zellen wurden humane KB-Zellen für 24h mit den entsprechenden siRNA-Gemischen gegen IL-8 und IL-6 transfiziert oder nur mit Transfektionsreagenz behandelt. Die siRNA-Gemische bestanden aus je drei 21meren unterschiedlicher Sequenz. Die Chemokin-/ Zytokinsekretion in den Zellüberstand wurde durch spezifische ELISAs, nach dreistündiger IL-1α-Stimulation der Hälfte der Ansätze, quantifiziert. Abbildung 36 C und D zeigen das Ergebnis. Die Zellen dieser Transfektionen wurden geerntet und die synthetisierte cDNA für Real Time PCRs mit relativer

Quantifizierung unter Verwendung von IL-8 und IL-6 *TaqMan-Assays on Demand* eingesetzt (Abbildung 36 A, B).



**Abbildung 36: Hemmung der mRNA- (A, B) und Proteinexpression (C, D) von IL-8 und IL-6 in IL-8 und IL-6 knock down-Zellen**

Humane KB-Zellen wurden für 24h mit 200nmol/l siRNA-Oligonukleotid-Gemischen gegen IL-8 und IL-6 transfiziert oder nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3h mit IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die RNA der geernteten Zellen wurden für Real Time PCR- und der Überstand der Zellen für ELISA-Untersuchungen eingesetzt. Unter Verwendung von *TaqMan-Assays on Demand* gegen die siRNA-Zielstrukturen wurden relative Expressionsdaten für IL-8 und IL-6 (A, B) generiert. Die dargestellten Daten sind auf  $\beta$ -Aktin normiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Mit Hilfe eines ELISA wurde die IL-8- und IL-6-Sekretion (C, D) im Kulturüberstand quantifiziert. Die Balkendiagramme zeigen die auf die unstimulierte Transfektionskontrolle (TR) bezogenen IL-8- und IL-6-Mengen der Kulturüberstände.

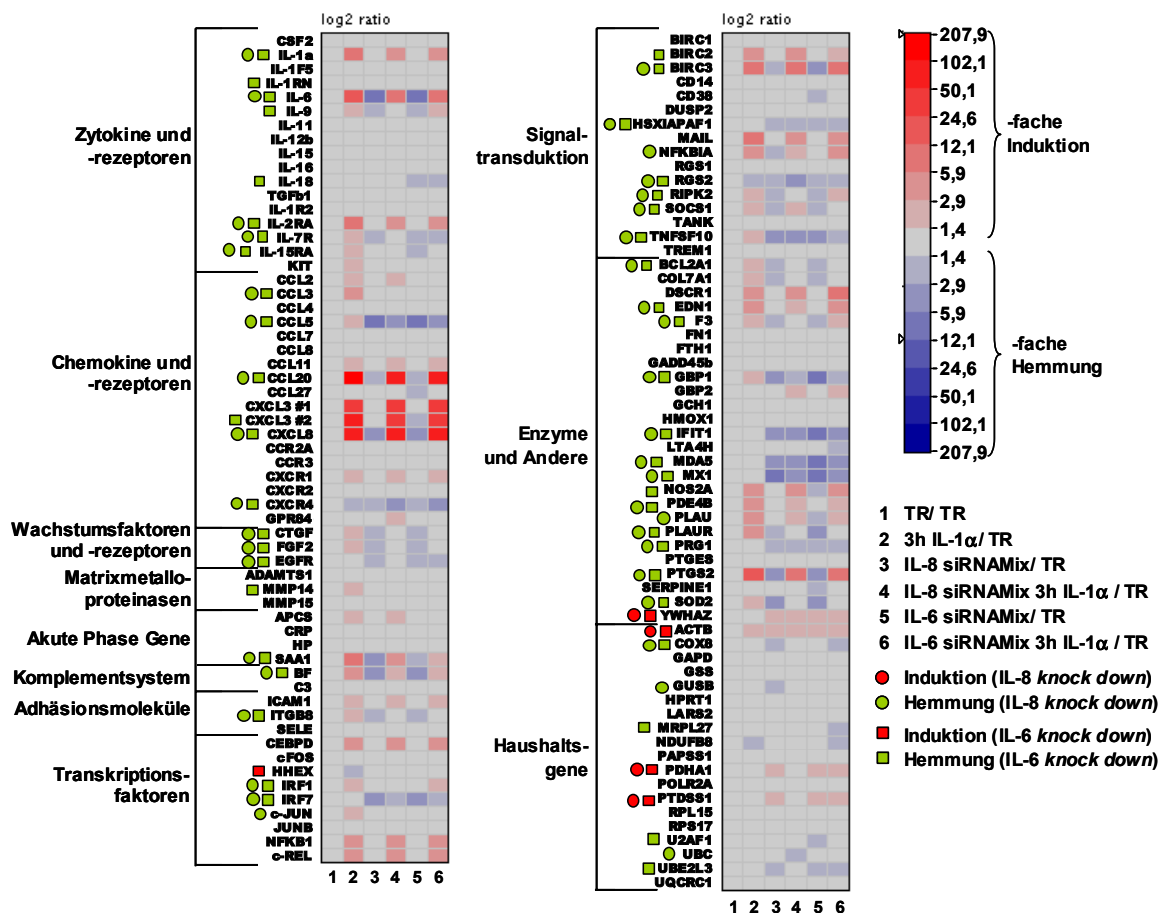
Die dargestellten *knock down*-Systeme zeigen eine starke Repression der Ziel-mRNAs bzw. der -Proteine. Bei einem Vergleich der Abnahmen der mRNA- und Proteinexpression (Abbildung 36) der beiden Interleukine fallen vor allem im stimulierten Zustand zwei Tatsachen auf. Zum einen wird sowohl bei IL-8 als auch bei IL-6 die mRNA-Expression durch die siRNA-Moleküle intensiver gehemmt als die Proteinexpression. Zum anderen zeigen beide mRNAs (und auch die sezernierten Proteine) im stimulierten Zustand im Vergleich zum Basalzustand viel geringere siRNA-Hemmeffekte. Denkbar ist, dass ein IL-1 $\alpha$ -vermittelter Stabilisierungsmechanismus diesen Effekt bedingt.

### 3.2.3.2 Untersuchungen der Genexpressionsprofile von IL-8 und IL-6 knock down-Zellen

Die Zellen des Experimentes mit den in Abbildung 36 gezeigten *knock down*-Effekten auf Protein- und mRNA-Ebene wurden zur Bestimmung des Genexpressionsprofils der Entzündung eingesetzt. Nach dem Ernten der Zellen wurde die RNA in fluoreszenzmarkierte cRNA umgeschrieben und diese auf den Entzündungsarrays Infilhum hybridisiert. Zu dieser Genexpressionsanalyse gehörten insgesamt sechs Arrays, deren Auswertung unter Verwendung der in Kapitel 2.16.1.4 angegebenen Programme und Parameter erfolgte. Um



die folgende Heatmap (Abbildung 37) zu generieren, wurden die sechs Arrays auf die unstimulierte Transfektionsreagenz-Kontrolle normiert.



**Abbildung 37: Effekte der IL-8 und IL-6 knock downs auf die Expression von Entzündungsgenen**

Gensonden mit Intensitäten ab einem Wert von 100 über alle sechs Arrays wurden nach Gengruppen sortiert als IPC-Werte in der Heatmap dargestellt. Die Berechnung der Ratios erfolgte auf die unstimulierte Transfektionsreagenz-Kontrolle (TR). Die der Intensität der Feldfärbungen entsprechende Genregulation ist der Farbskala zu entnehmen. Pfeile an der Skala verdeutlichen die maximal auftretende Regulation. Mit einem Symbol sind diejenigen Gene markiert, die in mindestens einem Zustand im IL-8 (Kreise) oder IL-6 (Quadrate) knock down mindestens eine 1,5-fache Regulation zeigen. Die Symbolfärbung zeigt an, ob es sich um eine Induktion (rot) oder Hemmung (grün) handelt.

Es ist deutlich das schon bekannte charakteristische IL-1 $\alpha$ -Induktionsmuster der Entzündungsgene zu erkennen. Im Gegensatz zu den Microarrays der AP-1 knock down-Experimente sind hier hauptsächlich IL-8- und IL-6-abhängige Herunterregulationen der Entzündungsgene zu beobachten. Die Profile der IL-8 und IL-6 knock down-Zellen überlappen stark. Zudem fällt auf, dass die Microarray-Sonden für IL-8 und IL-6 die jeweilige supprimierte Ziel-mRNA in den knock down-Zellen messen, was auf die Nähe zwischen Sondenlokalisation und siRNA-Schnittstellen zurückzuführen ist (Kapitel 3.2.2.2).

Die IL-6-Sonde weist jedoch auch eine Abnahme der IL-6 mRNA in den IL-8 knock down-Zellen nach. Auch in den IL-6 knock down-Zellen wird eine verringerte Expression von IL-8 gemessen. Es gibt wenige Gene, die nur IL-8-abhängig reguliert werden. Diese sind in Abbildung 37 mit einem runden Symbol gekennzeichnet. Die Färbung des Symbols gibt an, ob es sich um eine Induktion (rot) oder Hemmung (grün) handelt. Dazu gehören unter

anderem c-JUN, I $\kappa$ B $\alpha$  (NFKBIA) und Urokinase (PLAU). Im Vergleich zum IL-8 *knock down* sind im IL-6 *knock down* deutlich mehr mRNAs verändert. Diese sind mit einem quadratischen Zeichen markiert. Beispielsweise wird in den IL-6-deletierten Zellen HHEX induziert, während unter anderem die Expression von BIRC2, MMP14 (Metallothionein-1) oder CXCL3 (GRO $\gamma$ ) im IL-6 *knock down* unterdrückt wird.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Genexpressionsanalyse ist die starke Hemmung der mRNAs, die in vorliegender Arbeit als Indikatoren für eine unspezifische Induktion der Interferonantwort herangezogen werden (Tabelle 14). Diesen Daten zufolge kommt es nicht zu der sonst beobachteten (d)siRNA-abhängigen Induktion.

Gen-sonden	siRNA-Effekt im unstimulierten Zustand		siRNA-Effekt im stimulierten Zustand (3h IL-1 $\alpha$ )	
	IL-8	IL-6	IL-8	IL-6
CXCL10	<b>0,2</b>	<b>(0,1)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
IRF1	0,9	0,9	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>
IRF7	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>
TNFSF13b	<b>(0,5)</b>	<b>(0,4)</b>	<b>(0,4)</b>	<b>(0,5)</b>
GBP1	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
IFIT1	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
MDA5	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>
MX1	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>
GAPDH	1,3	1,3	1,2	1,5

**Tabelle 14: Hemmung von Interferon-, dsRNA- und virale Infektion-induzierbaren Genen durch IL-8 und IL-6 siRNAs**

Die Tabelle vergleicht die Regulation von neun Interferon-, dsRNA- und virale Infektion-induzierbaren Genen in Kontroll- und *knock down*-Zellen aus dem Experiment der Abbildung 37. Unstimulierte *knock down*-Ansätze wurden auf die unstimulierte Transfektionsreagenz-Kontrolle bezogen und die stimulierten *knock down*-Zellen auf die stimulierten Transfektionsreagenz-Kontrolle. Für diesen Vergleich wurden auch Intensitäten von Sonden mit Werten unter 100 verwendet. Diese Ratios wurden in Klammern gesetzt. Fett gedruckt sind die Ratios, die eine mindestens 1,5-fache Repression zeigen.

Die starke Veränderung des Profils der Entzündungsgene durch die IL-8 und IL-6 siRNA-Applikation in KB-Zellen kann durch zwei Möglichkeiten bedingt sein. Erstens kann es sich um unspezifische Effekte handeln, die nicht den bereits vorgestellten entsprechen. Aber aufgrund der starken Überlappung der Expressionsprofile der zwei Experimente kann dieser Punkt für das vorliegende Experiment nicht ausgeschlossen werden. Zweitens ist es möglich, dass IL-8 und IL-6 tatsächlich die große Anzahl an Entzündungsgenen regulieren, eventuell indirekt durch ein gemeinsames Zielgen. Dadurch wäre die große Übereinstimmung der beiden Profile erklärbar. Möglich ist, dass die beiden Proteine die Synthese der Entzündungsgene in intakten Zellen durch einen autokrinen Mechanismus vermitteln.

Um die Ergebnisse der Microarray-Analyse aus Abbildung 37 besser beurteilen zu können, wurden KB-Zellen mit rekombinantem IL-6 für drei Stunden stimuliert und die Veränderungen der Entzündungsgene mit dem Microarray Infflum bestimmt. Das Signal von IL-6 wird über einen Zelloberflächenrezeptor in die Zellen vermittelt, der aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt ist, dem IL-6-Rezeptor (IL-6 R, gp80) und dem Signaltransduktionsprotein gp130 (Hibi et al., 1990; Yamasaki et al., 1988). Die Bindung von IL-6 an den IL-6-Rezeptor

induziert eine Homodimerisierung von zwei gp130 Molekülen und transduziert so das Signal in die Zellen (Murakami et al., 1993). Der Komplex aus IL-6 und löslichem IL-6-Rezeptor (sIL-6 R) stimuliert verschiedene Zelltypen, die durch IL-6 alleine nicht responsiv sind (Peters et al., 1997).

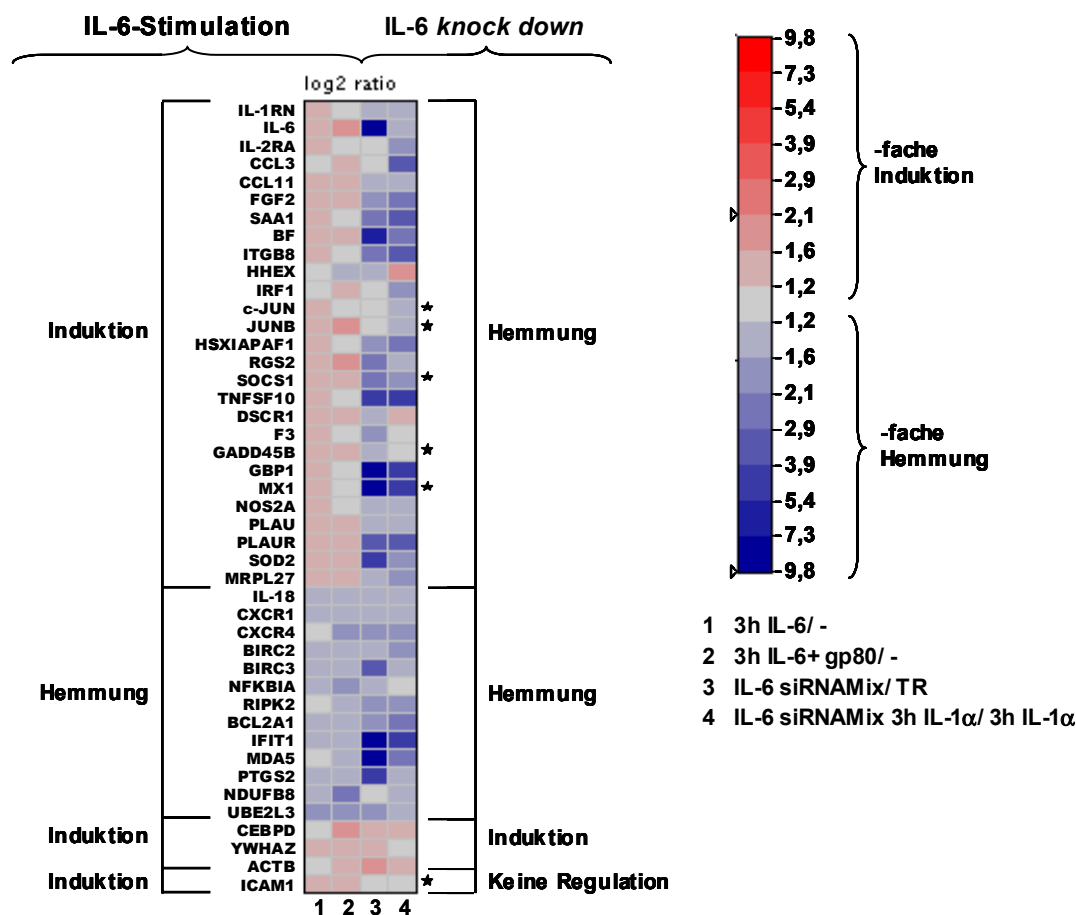
Für die IL-6-Stimulation wurden Zellen zum einen mit IL-6 alleine und zum anderen in einer Kombination mit dem IL-6-Rezeptor gp80 behandelt. Nach dem Ernten der Zellen und einer RNA-Isolation wurde die synthetisierte, fluoreszenzmarkierte cRNA auf den Entzündungsarrays hybridisiert. Die Auswertung der Genexpressionsstudie erfolgte unter Verwendung der im Kapitel 2.16.1.4 angegebenen Programme und Parameter. Durch die Stimulation mit IL-6 bzw. IL-6 und IL-6-Rezeptor wurden nur wenige Entzündungsgene über 1,5-fach reguliert. Die größte Induktion lag bei einem Faktor von zwei. Durch die parallele Bestimmung des bekannten IL-1 $\alpha$ -abhängigen Genmusters (Daten nicht gezeigt) lassen sich Schwächen bei der Microarray-Analyse und den Zellen ausschließen. Möglich ist, dass die rekombinanten Proteine keine ausreichende Aktivität hatten, um größere Expressionsveränderungen zu bewirken. Dies wurde nicht überprüft.

Werden neben den 1,5-fach induzierten Genen alle diejenigen betrachtet, die eine mindestens 1,2-fache Regulation aufweisen, so lassen sich siebenmal mehr Genprodukte für eine Gegenüberstellung (Abbildung 38) verwenden. Das ist gerechtfertigt, da sich unter diesen schwach regulierten Genen, solche befinden, die als IL-6-induzierte Gene bereits identifiziert sind (Abbildung 38, mit Sternchen markierte Gene) (zum Beispiel Brocke-Heidrich et al., 2004).

In Abbildung 38 sind mRNAs mit einem mindestens 1,2-fach veränderten Spiegel durch IL-6-Stimulation den Ergebnissen des IL-6 *knock down*s aus Abbildung 37 gegenübergestellt. Dabei fällt die große Gruppe der Gene auf (Induktion-Hemmung), die durch eine IL-6-Stimulation induziert und durch die Suppression von IL-6 stark reprimiert wurden. Dieses ist ein Hinweis für spezifische Effekte durch die IL-6 siRNAs, auch wenn es sich um schwache Regulation durch die IL-6-Behandlung handelt.

Neben den in der spezifischen Suppression der IL-6-abhängigen Entzündungsgene sind auch Genprodukte gezeigt, die unter den beiden Bedingungen (IL-6-Stimulation und IL-6-Suppression) gleich reguliert sind (Hemmung-Hemmung oder Induktion-Induktion). Dem Ergebnis der IL-6 *knock down*-Ansätze nach, wäre für diese Gruppe an Genen ebenfalls eine Induktion bzw. eine Repression durch IL-6 zu erwarten gewesen. Möglich ist, dass es sich bei der Regulation dieser Entzündungsgene im IL-6 *knock down*-Ansatz um unspezifische Effekte der IL-6 siRNAs handelt.

Die mRNA von ICAM-1 ist die einzige, die durch IL-6 induzierbar ist, jedoch keine Veränderung im Expressionsmuster in IL-6 *knock down* Zellen zeigt. Von den in Tabelle 14 dargestellten Interferon-, dsRNA- und virale Infektion-induzierbaren Genen zeigen die meisten die erwartete Induktion durch eine IL-6-Stimulation.



**Abbildung 38: Regulierte Entzündungsgene in IL-6 knock down- und IL-6-stimulierten Zellen**

Die Heatmap vergleicht IPC-Ratios als log<sub>2</sub> Ratios aus zwei Experimenten: IL-6-Stimulation und IL-6 knock down-Ansatz (Abbildung 37). Gegenübergestellt sind die Ratios von IL-6-regulierten Genen (3h IL-6/ - und 3h IL-6+ gp80/ -), identifiziert durch Stimulation von KB-Zellen mit 100ng/ml IL-6 (Spalte 1) bzw. IL-6 und 1 $\mu$ g/ml IL-6-Rezeptor gp80 (Spalte 2), mit den Effekten dieser Gene in unstimulierten (Spalte 3, IL-6 siRNAMix/ TR) und IL-1 $\alpha$ -behandelten (Spalte 4, IL-6 siRNAMix 3h IL-1 $\alpha$ / 3h IL-1 $\alpha$ ) IL-6 knock down-Zellen. In Übereinstimmung mit dem IL-6-Stimulationsexperiment wurden für das IL-6 knock down-Experiment im Gegensatz zur Abbildung 37 1,2-fache Veränderungen der Genexpression als Regulation definiert. Die der Intensität der Feldfärbungen entsprechende Genregulation ist der Farbskala zu entnehmen. Pfeile an der Skala verdeutlichen die maximal auftretende Regulation. Gene, die in (Brocke-Heidrich et al., 2004) als IL-6-regulierte Gene gezeigt sind, wurden mit einem Sternchen markiert.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei den knock down-Effekten der IL-6 supprimierten Zellen zumindest teilweise um spezifische Wirkungen handeln könnte. Um die Aussage zu verifizieren, sind Experimente mit rekombinantem IL-6/ IL-6-Rezeptorproteinen nötig, die eine höhere Bioaktivität zeigen. Weiterhin wäre es sinnvoll diese Ergebnisse mit einem für IL-8 entsprechendes Experiment zu vergleichen. Ein solches ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht durchgeführt worden, da kein biologisch aktives IL-8 zum Zeitpunkt der Beendigung der experimentellen Arbeiten verfügbar war.

## 4 Diskussion

Entsprechend der Manipulation auf drei Ebenen in der Zelle, die in dieser Arbeit zur Aufklärung entzündungsabhängiger Signaltransduktion verfolgt wurden, wird sich die Diskussion in drei Hauptabschnitte aufteilen. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Bewertung der Ergebnisse zum TAK1-/ TAB1-Signalkomplex. Im zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse und die Auswirkungen der AP-1-abhängigen Suppression bewertet. Der dritte Teil liefert eine Beurteilung der Ergebnisse, die für die sekretorischen Proteine IL-8 und IL-6 gewonnen wurden. Bewertungen der Möglichkeiten und Limitationen der RNA Interferenz, die bei den durchgeführten Experimenten bedeutsam sind, werden an den relevanten Stellen in den drei Kapiteln der Diskussion aufgezeigt.

### 4.1 RNAi-vermittelte Suppression von Proteinen des rezeptorproximalen TAK1-/ TAB1-Signalkomplexes

Seit Jahren wird der TAK1-/ TAB1-Signaltransduktionskomplex intensiv beforscht. Er stellt einen zentralen und zugleich sehr frühen Verzweigungspunkt bei der Signalweiterleitung proinflammatorischer Stimuli dar.

Bei Beginn der hier vorgestellten Arbeiten am TAK1-/ TAB1-Signaltransduktionskomplex waren Daten aus Überexpressionsexperimenten und in zellfreien Systemen (Sakurai et al., 2000) zu den Komponenten TAK1, TAB1 und TAB2 bekannt. Diesen Daten zufolge ist die MKKK TAK1 für ihre Aktivierung auf das Adapterprotein TAB1 angewiesen. Erst während und nach Fertigstellung der Arbeiten wurden *in vivo*-Daten zu den einzelnen drei Faktoren veröffentlicht. Die ektopische Überexpression von katalytisch inaktiven Mutanten von TAK1 oder von TAK1- und TAB1-Deletionsmutanten führt zur Hemmung TAK1-abhängiger Signaltransduktion (Thiefes et al., 2005; Holtmann et al., 2001). Bei diesen Experimenten besteht allerdings die Möglichkeit, dass durch die Überexpression unspezifische, hemmende Effekte auf andere MKKK auftreten.

Da TAB1 als Komponente des Signalkomplexes aus TAK1, TAB1 und TAB2 eine attraktive, spezifische und im Vergleich zu TAK1 verhältnismäßig wenig untersuchte Zielstruktur darstellte, sollte die Funktion von TAB1 mit siRNA-vermittelter Suppression untersucht werden. Um Erfahrungen in dem zu Beginn der Arbeiten noch recht neuen Themengebiet der Suppression von humanen Proteinen durch RNAi zu entwickeln, wurden hierbei auch drei RNAi-Methoden experimentell miteinander verglichen.

In den in Abbildung 8, Abbildung 10 und Abbildung 12 gezeigten Experimenten konnte durch eine siRNA-vermittelte Suppression von TAB1 entgegen den Erwartungen kein deutlicher inhibitorischer Effekt auf die Aktivierung von p38 MAPK, JNK und NF- $\kappa$ B zu frühen Zeitpunkten einer IL-1 $\alpha$ - (und TNF $\alpha$ -) Stimulation beobachtet werden. Dieses Ergebnis wurde mit drei unterschiedlichen siRNA-Methoden erzielt, wobei die chemisch synthetisierte und die *in vivo* exprimierte siRNA gegen die gleiche TAB1-Sequenz gerichtet waren. Die Gemische der d-siRNAs enthielten der etwa 850bp langen dsRNA entsprechend viele verschiedene Sequenzen. Aufgrund der verwendeten unterschiedlichen Methoden ist es

unwahrscheinlich, dass dieses Ergebnis ein Artefakt ist, der z.B. durch eine zu schwache Suppression des TAB1-Proteins verursacht wurde. Zudem kann das Experiment der d-siRNA-vermittelten TAK1-Suppression als Positivkontrolle gewertet werden. Es konnte die erwartete essentielle Bedeutung von TAK1 für die MAPK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung bestätigt werden, obwohl die Abnahme von TAK1 in dem in Abbildung 12 dargestellten Experiment vergleichsweise schwächer ist als die von TAB1. Die essentielle Funktion von TAK1 bei der TNF $\alpha$ -induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde inzwischen auch von Takaesu et al. und Sakurai et al. mittels synthetischer siRNA-bewirkter Suppression von TAK1 gezeigt (Takaesu et al., 2003; Sakurai et al., 2003). Eine mögliche Schlussfolgerung ist daher, dass TAB1 eine unbedeutendere Rolle bei der Aktivierung der MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalwege spielt als TAK1. Diese Schlüsse wurden kürzlich durch siRNA-vermittelte Suppression von TAB1 in humanen Zellen und vor allem durch Untersuchungen in TAB1-, TAK1- und TAB2-defizienten Fibroblasten gestützt (Singhirunnusorn et al., 2005; Shim et al., 2005). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen führt die genetische Ablation von *tab1* zu einem Verlust der TGF $\beta$ -induzierten Genexpression, so dass TAB1 mindestens im TGF $\beta$ -Signalweg eine nicht redundante, essentielle Funktion hat (Shim et al., 2005).

Neben der Erklärung, dass TAB1 nicht essentiell für die IL-1 $\alpha$ -induzierte MAPK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist, existiert auch noch die Möglichkeit, dass eine funktionelle Kompensation des supprimierten TAB1-Proteins durch eine TAB1-Spleißvariante oder durch ein anderes Protein dieses Ergebnis bedingen kann. Es gibt Studien, die zeigen, dass erst eine zeitgleiche RNAi-vermittelte Suppression von TAB2 und dem nah verwandtem Adapterprotein TAB3 eine Inhibition der IKK- und JNK-Aktivierung durch IL-1 und TNF $\alpha$  zeigen konnte (Ishitani et al., 2003). Ähnlich könnte es bei TAB1 sein, so dass eine noch nicht identifizierte TAB1-Spleißform das Fehlen von TAB1 kompensiert. Die einzige bisher identifizierte Spleißform von TAB1, TAB1 $\beta$  (Ge et al., 2003), kommt jedoch hierfür eher nicht in Betracht da ihr der C-terminale TAK-1-bindende und aktivierende Anteil fehlt (Sakurai et al., 2000). Möglich ist auch, dass in den TAB1 *knock down*-Zellen eine weitere mRNA exprimiert wird, die für ein trunkiertes TAB1-Protein kodiert.

Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurden d-siRNA-Gemische gegen TAB1 hergestellt. Während die beiden ersten Methoden nur ein Oligonukleotid mit einer Teilsequenz gegen TAB1 verwenden, besteht das d-siRNA-Gemisch aus unterschiedlich lokalisierten siRNA-Molekülen, welche einen großen Bereich der mRNA abdecken. Wenn die fehlende Änderung der Signalweiterleitung nach TAB1-Deletion durch Spleißvarianten von TAB1 bewirkt wird, so sollte das TAB1 d-siRNA-Gemisch diese Kompensation reduzieren bzw. verhindern. Die Verwendung von vielen siRNA-Sequenzen in einem Gemisch ist die einzige Methode, mit der potentielle Spleißvarianten effektiv reprimiert werden können. Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass gegen diese mRNAs gerichtete d-siRNAs im Gemisch vorhanden sind. Aber auch mit diesem experimentellen Ansatz war keine Veränderung auf die untersuchten Signalwege erkennbar.

Daher kann bei diesem Ansatz davon ausgegangen werden, dass die mangelnde Auswirkung einer TAB1 Suppression auf die MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalwege nicht methodenbedingt ist. Das Ergebnis bezüglich der d-siRNA-vermittelten Hemmung von TAK1 zeigt

weiterhin, dass die mit dieser Methode hergestellten d-siRNA-Moleküle effektiv Änderungen in der Zelle hervorrufen, die sich anhand der aktivierten Signalwege messen lassen.

Möglich ist, dass beim Protein TAB1 eine partielle Suppression nicht ausreicht, um einen Phänotyp zu beobachten. Im Gegensatz dazu bewirkt eine verminderte Menge der TAK1-mRNA mit im Vergleich zum TAB1 *knock down* ineffizienterem siRNA-Effekt eine Veränderung der biologischen Antwort auf Ebene der untersuchten Signaltransduktion. In diesem Fall wird es schwierig werden, Funktionsverlust-Studien für TAB1 in humanen Säugerzellen weiter durchzuführen, da sich bei RNAi-Experimenten in Säugerzellen keine vollständige Absenkung der Proteinexpression erreichen lässt; es handelt sich immer nur um partielle *knock down*-Effekte. Die generierten und publizierten Daten verdeutlichen, dass noch weitere Studien nötig sind, um die exakte Rolle von TAB1 im TAK1-/TAB1-Signaltransduktionskomplex zu charakterisieren.

Neben der von Ge et al. beschriebenen allosterischen Aktivierung von p38 MAPK als eine TAK1-unabhängige Funktion von TAB1 (Ge et al., 2002), geben auch die embryonal letalen Phänotypen Hinweise auf eigenständige Funktionen von TAB1 und TAK1 (und auch von TAB2) (Shim et al., 2005; Komatsu et al., 2002). In Tabelle 15 sind diese unterschiedlichen Phänotypen von TAB1-, TAK1- und TAB2-defizienten Embryos gegenübergestellt.

<i>tab1</i> <sup>-/-1</sup>	<i>tak1</i> <sup>-/-</sup>	<i>tab2</i> <sup>-/-3</sup>
Ubiquitäre Expression während der Embryogenese	Ubiquitäre Expression bei E14,5 (starke Expression im/ in Nervensystem, Niere, Darm, Hoden, Leber Lunge und Pankreas) <sup>2</sup>	Ubiquitäre Expression (starke Expression in Herz und Leber)
Embryonal letal	Embryonal letal ~ E10	Embryonal letal ~ E12,5
Herzkreislauf- und Lungen-Dysmorphogenese	Neuralwulst-Dysmorphogenese	Leberdegeneration und Apoptose

**Tabelle 15: Vergleich der Phänotypen von *tab1*-, *tak1*- und *tab2*-mutierten Embryos**

Verändert nach (Shim et al., 2005), <sup>1</sup>(Komatsu et al., 2002), <sup>2</sup> (Jadrich et al., 2003), <sup>3</sup>(Sanjo et al., 2003)

Eine Möglichkeit noch unbekannt Funktionen für Proteine zu charakterisieren ist eine Microarray-Analyse, bei der Zielstruktur-abhängig regulierte Gene identifiziert werden können. Unter Verwendung des Entzündungsarrays Inflamm wurde daher die Frage verfolgt, ob in der Entzündungssituation Gene TAB1-abhängig reguliert werden. Parallel zur Untersuchung der d-siRNA-vermittelten TAB1-defizienten Zellen wurden Experimente zur TAK1-abhängigen Genexpression in TAK1 *knock down*-Zellen durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich eine unspezifische Antwort der Zellen auf d-siRNA-Gemische, die potentielle spezifische Effekte überlagerte. Auch durch einen Vergleich mit Effekten einer Kontroll d-siRNA gegen die nicht in humanen Zellen exprimierte Luziferase war es nicht möglich, TAB1- und TAK1-abhängige Entzündungsgene zu identifizieren. Die Gene konnten anhand ihres Induktionsmusters in drei charakteristische Gruppen eingeteilt werden. Dabei wurde zwischen einer Geninduktion durch (a) eine Stimulation mit IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$ , (b) eine Stimulation mit IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  sowie Behandlung mit d-siRNA und (c) durch eine Behandlung mit d-siRNA unterschieden. Real Time PCR-Studien bestätigten diese Gruppeneinteilung.

Die Gene, die hauptsächlich durch d-siRNAs allein induziert wurden, gehören zur Klasse der Interferonantwort-auslösenden Gene. Das chemisch synthetisierte siRNA-Oligonukleotid gegen TAB1 zeigt demgegenüber kaum eine Induktion dieser Interferongene. Dies ist von großer Relevanz für die kontroverse Diskussion zur siRNA-induzierten Interferonantwort. Nach der wegweisenden Entdeckung von Tuschl und Mitarbeitern, wonach RNAi auch in Säugerzellen induzierbar ist, ohne eine unspezifische Interferonantwort zu aktivieren, war die Hoffnung groß, ein Werkzeug zu haben, mit dem spezifisch Gene auszuschalten sind. Doch es wurde schnell deutlich, dass sich die gewünschte Spezifität der siRNAs und die angeblich fehlende Interferonantwort nicht eindeutig bestätigten.

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, können die unspezifischen Interferoneffekte mit der Herstellungsart der siRNAs, wie z.B. dem *in vitro*-Verdau der dsRNAs mit Dicer, korrelieren (Kim et al., 2004). Dieser Befund wird auch in vorliegender Arbeit bei einem Vergleich der chemisch synthetisierten siRNAs versus *in vitro*-generierte d-siRNAs deutlich (Tabelle 3).

Eine sehr interessante Frage betrifft den Signalweg über den es zur beobachteten unspezifische Aktivierung des Entzündungsmusters kommt. Ein kritischer Schritt bei der Herstellung der d-siRNAs ist die Abtrennung der langen dsRNAs aus dem Gemisch der später transfizierten d-siRNAs. Ist dieser Prozess ineffektiv, so kommt es zu Induktion der Interferonantwort als Folge von dsRNA-induzierter PKR- und TLR3-Aktivierung (Alexopoulou et al., 2001; Stark et al., 1998). Dass die eingesetzten d-siRNA-Gemische noch mit Konzentrationen von dsRNA kontaminiert waren, welche für eine Aktivierung der Zellen ausreichen, ist unwahrscheinlich. Laut Literatur werden für eine extrazelluläre Aktivierung des TLR3 mit dsRNA Konzentrationen von 25µg/ml benötigt und für eine intrazelluläre Aktivierung der PKR Konzentrationen von 50µg/ml (Zhang et al., 2006; Alexopoulou et al., 2001). Da die in Abbildung 11 dargestellten zwei unterschiedlichen gelelektrophoretischen Methoden zeigen, dass keine nachweisbaren Mengen an dsRNA nach der Aufreinigung der d-siRNA-Gemische detektiert werden konnten, müsste die Konzentration weit unter dem oben beschriebenen Bedingungen liegen. Letztlich auszuschließen ist dieser Punkt jedoch nicht.

Eine TAK1- bzw. p38 MAPK-, JNK- oder NF-κB-vermittelte Aktivierung dieser induzierten Gene scheint auch kaum möglich. Wie auf Westernblotebene gezeigt, kommt es durch die d-siRNA-vermittelte Deletion von TAK1 nicht zur Aktivierung dieser Signalwege. Streng genommen gilt dies jedoch nur für die Stimuli IL-1α und TNFα.

Durch eine initiale Fokussierung auf das Protein TAB1 war es möglich, drei RNAi-Methoden experimentell zu vergleichen, Erfahrungen in diesem wichtigen Themengebiet zu erlangen und dieses Wissen für weitere Experimente in dieser Arbeit zu nutzen. Generell lässt sich sagen, dass durch Applikation der unterschiedlichsten siRNAs gegen den TAK1-/ TAB1-Proteinkomplex gute *knock down*-Effekte erzeugt werden konnten. Die vorgestellten Daten zeigen jedoch, dass es bei der Verwendung von siRNA-Expressionsplasmiden und d-siRNA-Gemischen Schwierigkeiten geben kann, die in diesem Ausmaß bei den chemisch synthetisierten siRNAs in dem verwendeten System nicht aufgetaucht sind. Da die Integrationsdauer des siRNA-Expressionsplasmids in das Genom bei den selektierten Zellen nicht hoch war, ist die Strategie der *in vivo*-Expression von shRNAs/ siRNAs unattraktiv. Der



Arbeitsaufwand steht in keinem vernünftigen Verhältnis zum Nutzen dieser stabilen Zelllinien. Auch der Einsatz von Gemischen mit vielen d-siRNAs führt zu unerwünschten Nebeneffekten. Diese genauer zu charakterisieren ist jedoch von großer Relevanz. In Tabelle 16 sind die Vor- und Nachteile der drei RNAi-Methoden zusammenfassend dargestellt. Unter Berücksichtigung aller Vor- und Nachteile sprechen die hier erhaltenen Ergebnisse in Übereinstimmung mit Rossi et al. für eine Verwendung von chemisch synthetisierten siRNAs (Amarzguioui et al., 2005). Diese Methode wurde daher ausschließlich in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

Methoden	Vorteile	Nachteile
Chemisch synthetisierte siRNAs	<ul style="list-style-type: none"> <li>hohe Reinheit</li> <li>große Mengen verfügbar</li> <li>Herstellung: geringen Arbeitsaufwand für den Anwender</li> <li>Markierung der siRNA möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>transiente Suppression der Ziel-mRNA</li> <li>geringe Applikation von siRNAs in schwer transfizierbare Zellen</li> <li>Auswahl der siRNA-Sequenz</li> <li><i>off target</i>-Effekte</li> <li>hohe Kosten</li> </ul>
<i>in vivo</i> -Expression von shRNAs/siRNAs	<ul style="list-style-type: none"> <li>transiente und stabile Expression möglich</li> <li>Untersuchung über längeren Zeitraum möglich</li> <li>geringe Kosten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>arbeitsintensive Vorarbeiten und Experimente (Klonierung, Selektion der stabilen Zelllinien und Sequenzierung)</li> <li>Auswahl der siRNA-Sequenz</li> <li>Störung des Sequenzierprozesses durch Ausbildung von Sekundärstrukturen</li> <li><i>off target</i>-Effekte</li> <li>geringe Integrationsdauer des Plasmids</li> </ul>
Verdau langer dsRNAs durch Dicer zu d-siRNAs	<ul style="list-style-type: none"> <li>effektive Suppression der Ziel-mRNA</li> <li>Suppression von Spleißvarianten der Ziel-mRNA</li> <li>keine Auswahl der siRNA-Sequenz nötig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>transiente Suppression der Ziel-mRNA</li> <li>zeitaufwendige Vorarbeiten</li> <li>Gefahr der Induktion eines unspezifischen Translationsstopp → Abtrennung der dsRNA aus d-siRNA-Gemisch unumgänglich</li> <li>potentiell mehr <i>off target</i>-Effekte</li> <li>hohe Kosten</li> </ul>

Tabelle 16: Vergleich der Vor- und Nachteile der drei verwendeten siRNA-Methoden

## 4.2 siRNA-abhängige Inhibition auf Ebene des AP-1-Transkriptionsfaktors

Durch eine Suppression von TAB1 konnten keine TAB1-abhängigen Entzündungsgene identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden distale Zielstrukturen des TAK1-/TAB1-Komplexes ausgewählt, um RNAi-vermittelt die IL-1 $\alpha$ -abhängige Expression von Entzündungsgenen zu untersuchen. Ziel war das Erreichen einer indirekten Suppression von Entzündungsgenen auf Ebene der Transkriptionsfaktoren. Therapeutische Ansätze auf Ebene der Rezeptoren und Proteinkinasen haben bisher die Phase III von klinischen Studien erreicht bzw. sind für erste Indikationen in verschiedenen Ländern zugelassen. Dabei kommt es bei Inhibitoren der Rezeptoren zu einer Blockade der gesamten Antwort, die über die entsprechenden Liganden und Rezeptoren ausgelöst werden. Eine Hemmung auf Ebene der Proteinkinasen bewirkt eine partielle Suppression einer großen Gruppe von Genen (Karin et al., 2004; Manning and Davis, 2003; Feldmann, 2002). Im Gegensatz dazu ist es gut

vorstellbar, dass bei einer Intervention auf Ebene der Transkriptionsfaktoren individuelle Gene oder spezifische Gengruppen supprimiert werden können. Derartige Ansätze sind jedoch noch nicht etabliert und erfordern die detaillierte Aufklärung der molekularen und biochemischen Abläufe der genregulatorischen Signaltransduktion, vor allem von Entzündungsgenen.

Einen ersten Hinweis auf die im verwendeten Zellsystem am stärksten an der IL-1 $\alpha$ -induzierten Entzündungsantwort beteiligten Transkriptionsfaktoren erbrachte eine kinetische Untersuchung dieser Faktoren auf mRNA-Ebene. An ihr ließ sich zum einen die lang anhaltende mRNA-Expression der Entzündungsgene und zum anderen die transiente Expression der Transkriptionsfaktoren erkennen. Letztere sind mit großer Wahrscheinlichkeit an der Aktivierung der Entzündungsgene beteiligt. Diese Analyse zeigte auch, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren als erstes angeschaltet wird. Eine ausführliche Untersuchung der mRNAs von insgesamt 138 Transkriptionsfaktoren mit einem eigens entwickelten Transkriptionsfaktorarray bestätigte die mittels des Entzündungsarrays gewonnenen Ergebnisse, nach denen hauptsächlich die mRNAs von AP-1-Untereinheiten die erste Welle der Genexpression während der zellulären Entzündungsreaktion bilden. Neben den AP-1-Transkriptionsfaktoren wurden unter anderem auch mRNAs der NF- $\kappa$ B-Familie als Antwort auf IL-1 $\alpha$  induziert. Ihre maximale Induktion wird im Vergleich zu den AP-1-Komponenten jedoch erst später erreicht.

Da die AP-1-Faktoren in diesem hohen Maße an der initialen IL-1 $\alpha$ -Antwort beteiligt sind, sind sie interessante Zielstrukturen, um ihren Beitrag im Entzündungssignalweg näher zu charakterisieren. Aufgrund der vielen beschriebenen und durch Sequenzmotiv-Suchprogramme vorhersagbaren AP-1-Bindungsstellen in den meisten Entzündungsgenen war es zu erwarten, dass die Mitglieder der JUN/ FOS-Familie entscheidend an der IL-1 $\alpha$ -induzierten Entzündungsantwort beteiligt sind. Wie in der Einleitung dargelegt, beschreibt die Literatur diverse Funktionen der AP-1-Komplexe in Immunantwort und Entzündung (Eferl and Wagner, 2003; Kracht and Saklatvala, 2002; Chinenov and Kerppola, 2001). Trotzdem, sind bisher nur wenige AP-1-Zielgene während der Entzündung präzise experimentell identifiziert worden. Außerdem ist die genaue Funktion der AP-1-Untereinheiten, ihre Wechselwirkungen untereinander und auf die Entzündungsgene in der Zelle im Basal- und Entzündungszustand noch weitgehend unbekannt (Hoffmann et al., 2005; Holzberg et al., 2003; Kracht and Saklatvala, 2002).

Der im Rahmen der Arbeit in Kooperation mit MWG Biotech etablierte Transkriptionsfaktorarray wurde weiterhin genutzt, um eine Abhängigkeit der AP-1-Komponenten von den drei klassischen MAPK, p38 MAPK, JNK und ERK, zu charakterisieren. Durch eine zeitgleiche spezifische Blockade dieser MAPK durch spezifische niedermolekulare Inhibitoren (PD98059, SP600125 und SB203580) konnte gezeigt werden, dass die IL-1 $\alpha$ -induzierten AP-1-Mitglieder c-JUN, cFOS und FRA-1 auf mRNA-Ebene von den gehemmten MAPK abhängig sind. Zusätzlich wurde dargelegt, dass bei einer Inhibition von ERK alleine durch PD98059 der größte Teil des IL-1 $\alpha$ -Signals zu c-JUN, cFOS und FRA-1 über die MAPK ERK läuft. Unter Vorbehalt gilt dies auch für JUNB. Die mRNA des Transkriptionsfaktors JUNB zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von den drei MAPK in beiden stimulierten

Zuständen, hat jedoch Signalintensitäten mit Werten unter 100 und wurde daher nicht in der Auswertung (Abbildung 25) berücksichtigt. Der Inhibitor PD98059 alleine bewirkt eine 19%ige Hemmung der JUNB mRNA.

Die funktionelle Deletion der AP-1-Familienmitglieder c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 erfolgte mit chemisch synthetisierten siRNA-Molekülen in humanen epithelialen KB-Zellen. In diesem Zellsystem lässt sich durch den Stimulus IL-1 $\alpha$  eine starke Entzündungsantwort induzieren, die auf mRNA-Ebene mit Microarrays gut messbar ist.

Die Etablierung der AP-1 *knock down*-Zellen war im Vergleich zu der des TAB1 *knock down*-Ansatzes aufwendiger und erforderte neben der Austestung verschiedener siRNA-Oligonukleotide und siRNA-Dosen auch unterschiedliche Stimulationszeitreihen. Es konnten partielle *knock down*-Effekte für alle fünf untersuchten AP-1-Komponenten erzielt werden. Durch die zeitabhängigen Expressionsdaten der mRNAs war die starke Regulation einiger AP-1-Untereinheiten bekannt. Diese präzise und transiente IL-1 $\alpha$ -abhängige Regulation der untersuchten AP-1-Untereinheiten trägt mit großer Wahrscheinlichkeit zu den hauptsächlich moderaten *knock down*-Effekten bei. Scheinbar korreliert der siRNA-Effekt mit der Regulation der mRNAs und Proteine, denn konstitutiv exprimiertes JUNB lässt sich sehr effizient supprimieren. Im Vergleich dazu zeigen die stark regulierten AP-1-Untereinheiten verhaltenere *knock down*-Effekte.

Die Tatsache, dass z.B. für FRA-1 in der Literatur ein *knock down*-Ansatz beschrieben ist, bei dem der Transkriptionsfaktor fast komplett deletiert ist (Belguise et al., 2005), suggeriert Ineffizienzen bei der Applikation der siRNAs in KB-Zellen. Bei solchen Vergleichen müssen jedoch zelltypspezifische Unterschiede berücksichtigt werden. So wurden bei dem oben beschriebenen FRA-1 *knock down*-Ansatz konstitutiv gebildetes FRA-1 supprimiert, während in den hier beschriebenen Versuchen vor allem die IL-1 $\alpha$ -induzierte FRA-1 mRNA-Expression supprimiert werden sollte. Es ist möglich, dass unter diesen Bedingungen exprimierte mRNAs vergleichsweise resistent gegenüber siRNA-vermittelter Degradation sind, da IL-1 $\alpha$  mRNAs stark stabilisieren kann (Kracht and Saklatvala, 2002). Möglich sind zudem ineffizientere siRNA-Sequenzen. Generell zeigt sich, dass die vorgestellten und publizierten AP-1 *knock down*-Experimente vergleichbare Repressionen der Zielstrukturen erreichen (Sreeramaneni et al., 2005; Hoffmann et al., 2005; Watanabe et al., 2003; Vial and Marshall, 2003; Holzberg et al., 2003), zum Teil jedoch auch stärkere Proteinabnahmen aufweisen (Sreeramaneni et al., 2005). Interessant ist, dass auch die funktionellen Effekte teilweise, wie für einen publizierten JUNB *knock down*-Ansatz gezeigt, moderat sind (1,5-fache Veränderung im Reporterassay) (Watanabe et al., 2003).

Die Validierung der Suppression für alle fünf untersuchten AP-1-Untereinheiten wurde sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene durchgeführt, da nur so die Summe aller möglichen RNAi-Effekte beurteilt werden konnte, das heißt zum einen der „klassische“ siRNA-Mechanismus mit Spaltung der Ziel-mRNA, und zum anderen eine translationale Blockade ohne Degradation der mRNA (Doench et al., 2003). Durch die Experimente auf mRNA-Ebene mittels Real Time PCR mit *TaqMan-Assays on Demand* und durch einen Vergleich dieser Ergebnisse mit einer klassischen RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die

von RISC/ siRNA-Komplexen degradierten Ziel-mRNAs nicht unmittelbar nach der Spaltung abgebaut werden. P-Bodies sind zelluläre Partikel, in denen z.B. gespaltene mRNAs akkumulieren (Sheth and Parker, 2003). Solche mRNA-Fragmente aus P-Bodies werden durch die RNA-Isolation mitaufgereinigt und in der Folge auch in Real Time PCRs eingesetzt.

Die Hybridisierung von TaqMan-Sonden an gespaltenen, aber noch nicht komplett degradierten mRNAs verhinderte z.B. für JUNB die Detektion der Suppression auf mRNA-Ebene. Diese Real Time PCR-Methodik kann daher zur Bestimmung der Abnahme nur für mRNAs eingesetzt werden, bei denen der zu amplifizierende Bereich und die siRNA-Schnittstelle überlappen. Zudem unterstützt eine Hybridisierung der Sonde im kürzeren mRNA-Spaltprodukt die Detektion der supprimierten Ziel-mRNA.

Die vergleichende Analyse von siRNA-vermittelten AP-1 *knock down*-Ansätzen mit der Analyse der Entzündungsprofile ermöglichte die Identifikation einer ganzen Reihe von Genen, die im unstimulierten oder stimulierten Zustand von mindestens einem AP-1-Mitglied abhängen. Außerdem wurden vier AP-1-Zielgene identifiziert, deren Expression von mehreren rupturierten AP-1-Untereinheiten abhängen. Zusätzlich wurde die Beeinflussung der AP-1-Komponenten untereinander charakterisiert.

Angesichts der eingangs diskutierten Anzahl an vorhergesagten Bindungsstellen für AP-1-Faktoren in den auf dem Entzündungsarray repräsentierten Genen, des starken Phänotyps von AP-1-*knock out*-Mäusen (Tabelle 1) und der erwarteten breiten Funktion von AP-1-Faktoren bei der Entzündungsreaktion (Schreiber et al., 2000; Schorpp-Kistner et al., 1999; Eferl et al., 1999; Hilberg et al., 1993), wurden jedoch recht wenige Zielgene gefunden, die in der Regel auch quantitativ nicht sehr stark dereguliert waren. Hierfür kommen eine Reihe von methodisch-technischen und biologischen Erklärungen in Betracht. Zum einen können sich bestimmte AP-1-Proteine gegenseitig sehr gut kompensieren, so kann z.B. ein cFOS-Verlust auf der Ebene des Organismus durch einen FRA-1 *knock in* kompensiert werden, obwohl Analysen in Zellen solcher Tiere zeigen, dass die Expression einzelner cFOS Zielgene nicht kompensiert werden kann (Passegue et al., 2002; Fleischmann et al., 2000).

Bei allen siRNA-Experimenten zu AP-1-Komponenten, sowohl den in dieser Arbeit gezeigten als auch bei den weiter oben zitierten, kommt es nicht zu einer vollständigen Suppression. In vielen Zellen werden geringe Mengen von AP-1-Proteinen konstitutiv exprimiert (siehe auch Abbildung 26), binden an Genpromotoren (vgl. konstitutive FRA-1 Bindung am IL-8-Promotor) und regulieren die Expression eines Zielgens. In einer IL-1 $\alpha$ -stimulierten Zelle steigt sodann z.B. die Menge an c-JUN, cFOS und FRA-1 stark an, so dass die Konzentration an einem gegebenen Genpromotor erhöht wird und beispielsweise weitere Bindungsstellen, welche eine niedrigere Affinität zu den Faktoren haben, ebenfalls besetzt werden können. Zusammen mit den posttranslationalen Modifikation, die durch IL-1 $\alpha$  über die MAPK-Signalwege induziert werden, kann sich die Funktion des AP-1-Faktors dann ändern und zur gesteigerten Genaktivität beitragen. Es ist wahrscheinlich, dass die siRNA-Experimente eher diesen induzierbaren Teil der AP-1-Funktion treffen, aber nicht die basale konstitutive Funktion. Da über die quantitativen Beiträge des induzierbaren Anteils der AP-1-Funktion zur Expression einzelner Gene oder auch ganzer Gengruppen nur sehr wenig

bekannt ist, zeigen die hier beobachteten schwachen Effekte der Suppression von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1 auf 136 Entzündungsgene ein sehr wichtiges biologisches Phänomen. Offensichtlich ist eine geringe Menge an AP-1-Proteinen für viele genregulatorische Vorgänge ausreichend. Unveröffentlichte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Kracht zeigen in Unterstützung dieser These, dass das Fehlen von c-JUN in *c-jun*<sup>-/-</sup> embryonalen Mausfibroblasten zu einem Verlust der Expression vieler IL-1 $\alpha$ -induzierter Gene führt und dass dieser weitgehend durch die Rekonstitution dieser *knock out*-Zellen mit einer phosphorylierungsdefizienten c-JUN-Mutante (c-JUN (SS63/73AA)) ausgeglichen wird. Die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-JUN trägt also weniger zur Genregulation bei, als der Faktor selbst und ist daher ein zusätzlicher modulierender Mechanismus der Genexpression.

Eine vergleichende Untersuchung von *knock out*- und humanen *knock down*-Systemen wäre daher eine Möglichkeit, diese Hypothese weiter zu untersuchen; außer für die AP-1-Komponente c-JUN standen jedoch keine weiteren *knock out*-Modelle zur Verfügung.

Beiden Systemen gemeinsam ist die mögliche Kompensation durch andere Proteine, wie es in Kapitel 4.1 ausführlich diskutiert wurde. Eine logische Konsequenz der schwachen Effekte in den Einzel-*knock down*-Ansätzen und der durch die Literatur belegten Hinweise, dass die AP-1-Untereinheiten durch andere Untereinheiten kompensiert werden können, war die Etablierung eines kombinatorischen *knock down*-Ansatzes mit der gleichzeitigen Suppression von c-JUN, JUNB, JUND, cFOS und FRA-1.

Im Jahr 2005 wurde die erste doppelte genetische Deletion von AP-1-Untereinheiten publiziert (Zenz et al., 2005). Es handelt sich dabei um einen konditional regulierbaren *junB*/*c-jun knock out* in der Epidermis. Diese Tiere entwickeln die entzündliche Hauterkrankung Psoriasis, welche gekennzeichnet ist durch eine starke Dysregulation von Zytokinen, Chemokinen und anderen Entzündungsgenen (Zenz et al., 2005). Dieser Phänotyp wird nur bei der doppelten, aber nicht bei der Einzeldelation der Gene beobachtet.

Die Generierung von Modellen mit doppelter genetischer Deletion für AP-1-Untereinheiten ist ein extrem aufwendiger Prozess, der derzeit nur von wenigen Laboren weltweit in Angriff genommen werden kann. Gut validierte RNAi-Ansätze mit mehreren supprimierten Zielgenen wären demgegenüber schneller, flexibler und für weitaus mehr Forscher zugänglich. Eine Hemmung von mehr als zwei AP-1-Untereinheiten ist zur Zeit wohl nur durch RNAi-Techniken denkbar (Kapitel 4.2.1).

#### **4.2.1 Identifizierung von IL-8 und IL-6 als AP-1-Zielgene**

Die Untersuchung von mRNA-Expressionsprofilen unter Verwendung des Entzündungsarrays zeigte, dass IL-8 und IL-6 zu den am stärksten durch AP-1 siRNAs beeinträchtigen Genen gehören. Diese Befunde wurden durch Real Time PCR mit spezifischen *TaqMan-Assays on Demand* validiert. Zusätzlich zu den AP-1 *knock down*-Zellen der Arrayanalyse wurde das zweite Experiment der JUND siRNAs (4h IL-1 $\alpha$ -Stimulation) mituntersucht. Die Validierung bestätigte zum einen die Array-Ergebnisse und zum anderen wurden weitere AP-1-abhängige Regulationen auf IL-8 und IL-6 gemessen. Ein Vergleich der AP-1-

Abhängigkeiten von IL-8 und IL-6 zeigte, dass die Regulation der zwei mRNAs sehr ähnlich ist. Bis auf zwei Teilergebnisse wurden IL-8 und IL-6 durch die AP-1-Untereinheiten gleich reguliert. Beide Promotoren weisen AP-1-Bindungsstellen auf, so dass eine Abhängigkeit von der wichtigen Transkriptionsfaktor-Familie erwartet war. Wie in der Einleitung dargelegt, verfügen beide Faktoren über viele gleiche Eigenschaften. Als Folge lässt sich die ähnliche Abhängigkeit von den AP-1-Untereinheiten beobachten. Zusätzlich zu den einleitend benannten verwandten Funktionen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mRNA-Expression und Proteinsekretion beider Faktoren MAPK-abhängig reguliert sind. Weiterhin weisen beide Gene mit die stärkste Regulation durch IL-1 $\alpha$  oder TNF $\alpha$  auf (siehe Kapitel 3.2.1).

Der Hauptunterschied bezüglich der Regulation durch AP-1-Untereinheiten besteht im cFOS-vermittelten Effekt auf IL-8 und IL-6. Die cFOS-Komponente wirkt unter IL-1 $\alpha$ -Einfluss tendenziell induzierend auf IL-8, hat jedoch keinen Effekt auf IL-6. Weiterhin zeigt im Gegensatz zu IL-6 die mRNA von IL-8 keine Abhängigkeit von cFOS im unstimulierten Zustand.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der RNAi-vermittelten Suppression auf mRNA-Ebene durch Microarrays und Real Time PCR konnte durch einen Reporterassay die Abhängigkeit der IL-8-Regulation von FRA-1 bestätigt werden. Dieses Teilergebnis ist wichtig und zeigt, dass trotz schwacher Effekte der Einzelerperimente valide Daten generiert wurden. Die FRA-1-vermittelte Unterdrückung der Reporteraktivität zeigt eine repressorische Funktion auf. Für IL-6 wurde ein vergleichbares Experiment nicht durchgeführt, jedoch ist es aufgrund des Effektes auf mRNA-Ebene wahrscheinlich, dass FRA-1 in diesem Fall über transaktivierendes Potential verfügt. In der Literatur existieren ebenfalls beschriebene repressorische und aktivierende Eigenschaften von FRA-1. Es gibt Veröffentlichungen wonach FRA-1 keine Transaktivierungsdomäne hat (Tkach et al., 2003). Da *in vivo* FRA-1 cFOS ersetzen konnte (Kapitel 1.1.2.2), ist es jedoch fraglich, ob FRA-1 eine Deletion von cFOS kompensieren könnte, wenn es ausschließlich negative genregulatorische Eigenschaften hätte (Hoffmann et al., 2005; Fleischmann et al., 2000).

Bei der Regulation der Zielgene haben die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 zum Teil gegensätzliche Funktionen. Dies wurde in der Literatur insbesondere für die zwei JUN-Proteine c-JUN und JUNB gezeigt. So wird z.B. die Transaktivierung von verschiedenen AP-1-Reportergenen von c-JUN und JUNB antagonistisch reguliert (Chiu et al., 1989). Auch hier zeigt sich, dass c-JUN und JUNB Antagonisten sind. Die AP-1-Komponente c-JUN inhibiert die IL-8-Expression, während JUNB diese aktiviert. Dieses Ergebnis gilt jedoch nur für den basalen Zustand. In der stimulierten Situation sind die beiden Proteine Antagonisten zum dritten JUN-Protein, JUND.

Bakiri et al. zeigten, dass JUNB Gentranskription in Abhängigkeit vom Promotor und Komplexpartner aktivieren oder reprimieren kann (Bakiri et al., 2000). Weiterhin konnte mit gekoppelten AP-1-Dimeren (Einzelstrangdimere) der JUN-, FOS- und ATF-Familie die transkriptionelle Spezifität der unterschiedlichen AP-1-Komplexe anhand von drei untersuchten Promotorkonstrukten dargelegt werden (Bakiri et al., 2002). Diese Selektivität mit der Dimere Promotoren regulieren, kann nicht durch eine differentielle Expression oder

durch die generelle Aktivität der Transaktivierung erklärt werden, sondern ist möglicherweise durch die Umgebung des Promotors und Interaktionen mit anderen transkriptionalen Regulatoren bedingt (Ameyar-Zazoua et al., 2005).

Durch den gewählten Ansatz der RNAi kann die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes am IL-8- und IL-6-Promotor nicht aufgeklärt werden. Ob die gemessenen Effekte direkte oder indirekte Abhängigkeiten darstellen kann nur vermutet werden. Jedoch zeigen Chromatin-Immünpräzipitationen, dass cFOS und FRA-1 an den IL-8-Promotor binden (Hoffmann et al., 2005). Zudem existieren in der Arbeitsgruppe Kracht Daten, wonach auch JUNB und JUND zu bestimmten Zeiten im Promotorbereich von IL-8 gebunden vorliegen (Abbildung 32). Es kann gefolgert werden, dass die gemessenen Effekte auf IL-8 für die vier Untereinheiten durch direkte Bindung an das *il8*-Gen verursacht werden. Für die Abhängigkeit von c-JUN kann keine Bindung am proximalen IL-8-Promotor gemessen werden (Hoffmann et al., 2005). Es ist möglich, dass c-JUN über andere Proteine z.B. weitere AP-1-Untereinheiten die IL-8-Expression beeinflusst, oder an Bereiche distal der in Hoffmann et al. mit Chromatin-Immünpräzipitationen untersuchten Region des *il8*-Gens bindet. Dass sich AP-1-Komponenten gegenseitig regulieren, konnte in der Arbeit ebenfalls gezeigt werden (Kapitel 1.1.2.2).

Wie in dem vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, ist es denkbar, dass die schwachen Effekte durch partielle Deletion der AP-1-Komponenten durch andere Proteine kompensiert werden. Aus diesem Grund wurde in einem initialen Experiment überprüft, ob die Expression der zwei Zielgene IL-8 und IL-6 durch eine Suppression aller fünf AP-1-Untereinheiten stärker beeinträchtigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Phänotyp als Hemmung darstellt. Sowohl im unstimulierten als auch in IL-1 $\alpha$ -stimulierten Zustand zeigen die fünffach-*knock down*-Zellen eine verminderte IL-8- und IL-6-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieses Muster der IL-8- und IL-6-Hemmung konnte durch keinen der Einzel-*knock downs* erzielt werden. Somit konnte ein Ansatz aufgezeigt werden, mit dem es im Gegensatz zu Tierversuchen möglich ist, Mehrfach-*knock down*-Ansätze zu etablieren.

Bei der Applikation von zum Teil drei oder vier siRNAs pro Gen bedeutet dieses eine große Anzahl an applizierten siRNAs. Als Folge könnten stärkere unspezifische Effekte auftreten, analog zu den d-siRNA-Experimenten. Entgegen den Erwartungen kam es nicht zu einer Induktion von dem in AP-1 Einzel-*knock downs* (Tabelle 12) am stärksten induzierten Gen, IFIT1 (Daten nicht gezeigt). Um eine fundierte Aussage über eine Induktion von unspezifischen Effekten zu treffen, müssen jedoch noch weitere Genexpressionsuntersuchungen durchgeführt werden.

Die in Abbildung 31 gezeigte Heatmap der Microarray-Untersuchung für die Einzel-*knock downs* zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in den Transfektionsreagenz-Kontrollen, sowohl im unstimulierten als auch stimulierten Zustand. Die Kombination aus dem validen Microarray-System mit der Verwendung kontrollierter *knock down*-Ansätze – das heißt Überprüfung der Suppressionen auf Protein und mRNA-Ebene – sind wichtige Voraussetzungen, um verlässliche Daten bei der Genexpressionsstudie mit Einzelexperimenten zu gewinnen. Trotz schwacher Effekte durch die einzelnen Suppressionen der AP-1-Untereinheiten in der Genexpressionsstudie werden diese durch Real Time PCR bestätigt. Zudem bedingen die untersuchten AP-1-Untereinheiten die Regulation der IL-8-

und IL-6-Expression unterschiedlich, was ein Hinweis für spezifische Effekte dieser *knock down*-Zellen auf die Zielgene ist. Trotz der genannten Evidenzen für die Spezifität der Daten, ist es aufgrund der möglichen, beschriebenen Nebeneffekte nötig, die Ergebnisse durch unabhängige Experimente und andere Methoden zu bestätigen.

#### 4.2.2 Regulation der AP-1-Faktoren untereinander

Die Zusammensetzung der AP-1-Komplexe variiert je nach Zelltyp und Stimulus und ist zudem zeitabhängig (Chinenov and Kerppola, 2001; Kovary and Bravo, 1991). Durch eine präzise Regulation werden die benötigten AP-1-Komponenten in der Zelle exprimiert. Dabei hängt die Transkription einiger AP-1-Untereinheiten selbst von einer AP-1-Komplex-Bindung im Promotor ab. So werden z.B. c-JUN, FRA-1 und JUND AP-1-vermittelt transkribiert.

Durch Real Time PCR-Studien konnte die Abhängigkeit der AP-1-Faktoren voneinander näher charakterisiert werden. In Übereinstimmung mit der Literatur wird z.B. gezeigt, dass FRA-1 von cFOS transkriptionell aktiviert wird (Matsuo et al., 2000). Dieser Befund wurde auch im IL-1 $\alpha$ -stimulierten System beobachtet. Dadurch kommt es zur Induktion einer *feedback* Regulation, die die cFOS-Aktivität wiederum hemmt. Derartige Hemmmechanismen treten unter IL-1 $\alpha$ -Einfluss nicht nur zwischen cFOS und FRA-1 auf, sondern auch zwischen FRA-1 und JUND, cFOS und JUNB sowie c-JUN und JUND. Durch eine *feedback* Hemmung wirkt das Endprodukt selbst als Effektor und seine Zunahme verstärkt das Ausmaß der Hemmung. Das System reguliert sich dadurch selbst.

Generell lässt sich festhalten, dass sich die untersuchten AP-1-Untereinheiten in größerem Ausmaß negativ beeinflussen, als dass sie sich induzieren.

### 4.3 Hemmung durch RNAi auf der Ebene der sezernierten Entzündungsproteine IL-8 und IL-6

Das Chemokin IL-8 und das Zytokin IL-6 haben neben vielfältigen Funktionen in der Zelle auch regulatorische Aufgaben während der Entzündungsreaktion. IL-8 und IL-6 werden, wie durch den Zytokinarray (Kapitel 3.2.1.1) in Übereinstimmung mit der Literatur gezeigt werden konnte, stark sezerniert (Krause et al., 1998). Mehrere Experimente mit der Real Time PCR-Methodik und Arraytechnologie verdeutlichten, dass auch ihre mRNAs nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation eine massive Induktion aufweisen. Die starke Regulation von IL-8 und IL-6 als Antwort auf den proinflammatorischen Stimulus IL-1 $\alpha$  erfordert unter anderem das Zusammenspiel von Faktoren, die in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurden: AP-1-Untereinheiten und der TAK1-/ TAB1-Signalkomplex.

IL-8 und IL-6 stellen als direkte Effektoren der Entzündungsantwort interessante Zielstrukturen für eine Manipulation dar. Um Funktionen von IL-8 zu charakterisieren, stehen keine Mausmodelle zur Verfügung. Wie einleitend erwähnt; ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein murines Homolog zu IL-8 identifiziert worden.

Um über Deletionsexperimente Informationen über die umfangreiche Funktion des Chemokins IL-8 und des Zytokins IL-6 zu erarbeiten, stehen in humanen Zellsystemen z.B. *antisense*- oder RNAi-Techniken zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit sollten durch



siRNAs in Kooperation mit MWG Biotech (MWG Biotech: Auswahl und Synthese der siRNA-Sequenzen) am Entzündungsprozess direkt beteiligte Faktoren supprimiert werden. Wie dargelegt, ist der Einsatz von RNAi zur direkten Hemmung der sekretorischen Proteine IL-8 und IL-6 möglich. Dabei wurden starke *knock down*-Effizienzen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erreicht. Auch die in der Literatur beschriebenen Experimente mit siRNA-Molekülen gegen IL-8 oder IL-6 zeigen entsprechend starke Hemmeffekte, die je nach Veröffentlichung auf mRNA oder/ und Proteinebene gemessen wurden (Kim et al., 2005; Zhang et al., 2005; Baeza-Raja and Munoz-Canoves, 2004). Zum Teil sind die, aus den Suppressionen resultierenden, biologischen Effekte zu den hier dargestellten Daten vergleichbar groß. Für Myoblasten konnte z.B. durch siRNA-vermittelte Suppression eine essentielle Funktion von IL-6 bei der Differenzierung gezeigt werden (Baeza-Raja and Munoz-Canoves, 2004).

Die siRNA-Einflüsse in beiden Ansätzen zeigten konsistent über mehrere Experimente eine Beeinträchtigung der Effizienz in den IL-1 $\alpha$ -stimulierten Zuständen (Abbildung 36). Möglich, und durch weitere Experimente zu überprüfen, ist eine Beeinflussung von RNAi-Effekten durch die IL-1 $\alpha$ -induzierte p38 MAPK-abhängige mRNA-Stabilisierung von IL-8 und IL-6 (Holtmann et al., 2001; Holtmann et al., 1999; Winzen et al., 1999). Jing et al. zeigten vor kurzem (Jing et al., 2005), dass miRNAs über ein ARE Element RNAi-Effekte übertragen können.

Die starken Effekte mit den IL-8 und IL-6 siRNA ermöglichten es zudem, potentielle IL-8- bzw. IL-6-regulierte Zielgene zu analysieren. Daher wurden Genexpressionsexperimente mit dem Entzündungsarray Inflamm durchgeföhrt. Dabei konnte eine starke Veränderung der Expression vieler Gene in den *knock down*-Zellen festgestellt werden. Charakteristisch für diese Analyse war, dass beide Ansätze mehrheitlich zu einer Inhibition von Entzündungsgenen führten, von denen die meisten in beiden Ansätzen eine gleichartige Regulation aufwiesen.

Allgemein betrachtet ähnelt die starke Hemmung der Entzündungsgene in den beiden *knock down*-Systemen dem Effekt von Glukokortikoiden. Glukokortikoide wie Dexamethason inhibieren die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Einer Hypothese entsprechend, erreichen Glukokortikoide ihre breite antiinflammatorische Wirksamkeit über eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Barnes and Karin, 1997). In einigen Zellmodellen ist diese Hypothese bestätigt worden. Für andere war dies nicht möglich (Newton et al., 1998).

Seit langem ist bekannt, dass IL-8 ein Zielgen von NF- $\kappa$ B ist und damit distal von NF- $\kappa$ B liegt (Brasier et al., 1998). Kürzlich wurde zudem publiziert, dass IL-8 selbst den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B über einen TRAF6-abhängigen Signalweg aktiviert. Dieser ist daher im Gegenzug auch ein distal gelegener Effektor von IL-8 (Manna and Ramesh, 2005). Folglich, wie in dieser Veröffentlichung gezeigt, kann IL-8 auch NF- $\kappa$ B-abhängige Zielgene induziert, wie z.B. ICAM-1, VCAM-1 und COX2. Im Übereinstimmung mit diesem Befund wurde in den IL-8 *knock down*-Zellen die Expression von COX2 (ptgs2) gehemmt (Abbildung 37). Der mRNA-Spiegel von ICAM-1 ist in den Microarrays der IL-8 *knock down*-Zellen marginal verringert. Die Intensitäten weisen eine tendenzielle Hemmung durch die Suppression von

IL-8 auf. Die Signale von VCAM-1 wurden herausgefiltert, da die Intensitäten Werte kleiner 100 aufwiesen. Die Microarray-Sonde für das NF- $\kappa$ B-Vorläuferprotein p105 zeigt keine Veränderung an.

Abbildung 37 verdeutlicht, dass sich die Veränderung des Expressionsmusters in den untersuchten *knock down*-Systemen nicht auf eine Gengruppe konzentriert, sondern alle auf dem Entzündungsarray vorhandenen Gruppen an Genen betroffen sind. So gehören z.B. SOCS1 und ITGB8 mit zu den am stärksten herunterregulierten mRNAs im stimulierten Zustand in beiden *knock down*-Systemen.

In der Literatur ist für SOCS1-Proteine beschrieben, dass sie als *feedback* Inhibitoren den IL-6-Signalweg beeinflussen. Sie werden durch IL-6 schnell induziert und ihre Expression hemmt die IL-6-vermittelte Signaltransduktion (Heinrich et al., 2003).

Korrespondierend mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten für den IL-6 *knock down*-Ansatz konnten Brocke-Heidrich et al. in IL-6-abhängigen Myelomazellen eine IL-6-bedingte Induktion von SOCS1, c-JUN und MX1 zeigen (Brocke-Heidrich et al., 2004).

Die Beispiele aus der Literatur lassen die Hypothese zu, dass es sich bei den durch IL-8 und IL-6 siRNAs-bedingten Genexpressionsveränderungen um tatsächliche IL-8- und IL-6-abhängige Zielgene handelt.

In diesem Fall könnte ein autokrines Modell die Ergebnisse erklären. Für IL-8 und IL-6 aber auch für weitere Zytokine sind derartige Mechanismen beschrieben worden (Wang et al., 2006; Ikeda et al., 2006; Szlosarek et al., 2006; Yamamoto et al., 2000). Die Veränderung der Entzündungsexpression würde in einem durch die Deletion der Interleukine bedingten sekundären Prozess erfolgen. Handelt es sich um IL-8- und IL-6-vermittelte Induktionen so werden diese Zielgene supprimiert und bei einer Hemmung induziert. Möglich ist, dass beide Proteine ein gleiches Zielgen regulieren, dass mit diese ähnlichen Profile der Entzündungsgene beeinflusst.

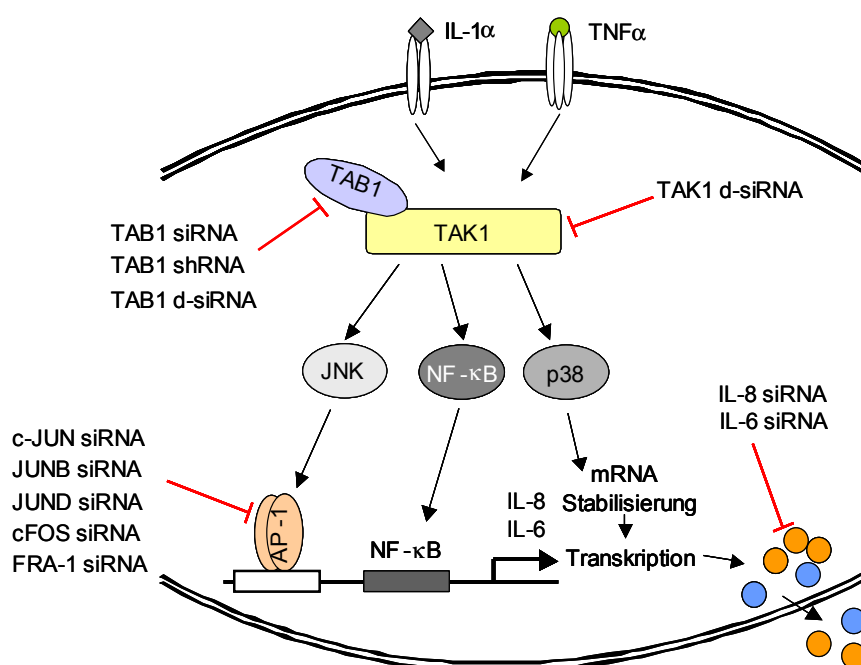
Die starke Überlappung der Expressionsprofile beider Interleukine könnte ein Hinweis auf unspezifische Einflüsse durch die Applikation der siRNAs sein. Jedoch äußerten sich Nebenwirkungen durch chemisch synthetisierte siRNAs in eigenen Studien bislang nur durch eine marginale Induktion von Genen (Tabelle 3 und Tabelle 11). Es sind allerdings in der Literatur auch reprimierte Gene als Antwort auf die Applikation einer Kontroll siRNA gemessen worden (Persengiev et al., 2004).

Wird der obig beschriebene autokrine Mechanismus postuliert, so sollte eine Stimulation von KB-Zellen mit IL-8 und IL-6 ein dem *knock down*-Experiment entgegengesetztes Genexpressionsprofil liefern. Dies wurde auch für IL-6 überprüft. Da die IL-6-Signaltransduktion über einen IL-6-Rezeptor (IL-6 R, gp80) und ein Signaltransduktionsprotein gp130 vermittelt wird (Hibi et al., 1990; Yamasaki et al., 1988) und es für KB-Zellen nicht bekannt war, ob diese den IL-6-Rezeptor exprimieren, wurden sie in einem initialen Experiment parallel mit IL-6 allein und zusammen mit dem IL-6-Rezeptor stimuliert. Durch Microarray-Analyse wurde die Expression der Entzündungsgene bestimmt.

Es lässt sich bei Betrachtung auch der schwachen Veränderungen im Expressionsprofil der IL-6-stimulierten Zellen eine große reziproke Übereinstimmung mit den Effekten der IL-6 *knock down*-Zellen erkennen. Dieses Ergebnis ist ein Anhaltspunkt für einen autokrinen Mechanismus. Weitere Experimente in dieser Richtung z.B. mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-8 oder IL-6 sind nötig, um die aus den siRNA-Experimenten gewonnene interessante Hypothese IL-1 $\alpha$ -vermittelter IL-8- oder IL-6-abhängiger autoregulatorischer Amplifikationsmechanismen zu bestätigen.

#### 4.4 Ausblick

Aus den in Abbildung 39 zusammenfassend dargestellten Modulationen der charakteristischen Positionen in der proinflammatorischen Signaltransduktion und der in der Arbeit dazu präsentierten Ergebnisse ergeben sich weitere mögliche Fragestellungen.



**Abbildung 39:** Zusammenfassende schematische Darstellung durchgeführter RNAi-vermittelter Modulationen auf drei Ebenen des Entzündungsprozesses

Im Kontext der Diskussion über Nebeneffekte bei RNAi-vermittelten Ansätzen ist es wichtig, die Signalweiterleitung, über die die d-siRNA-bedingte unspezifische Induktion einiger Entzündungsgene resultiert, näher zu charakterisieren. Möglich sind Experimente in PKR- oder IRF3-defizienten Zellen, um auszuschließen, dass dieser Effekt über einen TLR- bzw. PKR-Signalweg verläuft.

Ausgehend von dem Befund des kombinatorischen AP-1 *knock down*-Ansatzes kann eine Untersuchung des Entzündungsgenprofils Aufklärung über weitere Funktionen der AP-1-Faktoren im Entzündungsprozesses liefern. Weiterhin könnte durch Chromatin-Immünpräzipitations-Versuche systematisch die Besetzung der bekannten AP-1-Stellen mit den AP-1-Faktoren im Vergleich zu den Effekten in AP-1-supprimierten Zellen für ausgewählte Promotoren untersucht werden.

Weiterhin sollte, wie bereits in der Diskussion erwähnt, die Suppression weiterer inflammatorischer Gene in IL-8 und IL-6 *knock down*-Zellen mit zusätzlichen experimentellen Ansätzen (neutralisierende Antikörper gegen IL-8/ IL-6 und Stimulation der Zellen mit IL-8 und IL-6 mit hoher biologischer Aktivität) verifiziert werden. Dadurch könnte ein IL-8- und IL-6-abhängiger autokriner Mechanismus während des IL-1 $\alpha$ -induzierten Entzündungsprozesses bestätigt werden.

## 5 Literatur

- Abate,C., Luk,D., and Curran,T. (1991). Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol. Cell Biol.* *11*, 3624-3632.
- Acquaviva,C., Bossis,G., Ferrara,P., Brockly,F., Jariel-Encontre,I., and Piechaczyk,M. (2002). Multiple degradation pathways for Fos family proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *973*, 426-434.
- Acquaviva,C., Ferrara,P., Bossis,G., Brockly,F., Salvat,C., Jariel-Encontre,I., and Piechaczyk,M. (2001). Degradation of cellular and viral Fos proteins. *Biochimie* *83*, 357-362.
- Agrawal,N., Dasaradhi,P.V., Mohmmmed,A., Malhotra,P., Bhatnagar,R.K., and Mukherjee,S.K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *67*, 657-685.
- Aihara,M., Tsuchimoto,D., Takizawa,H., Azuma,A., Wakebe,H., Ohmoto,Y., Imagawa,K., Kikuchi,M., Mukaida,N., and Matsushima,K. (1997). Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect. Immun.* *65*, 3218-3224.
- Alcamo,E., Mizgerd,J.P., Horwitz,B.H., Bronson,R., Beg,A.A., Scott,M., Doerschuk,C.M., Hynes,R.O., and Baltimore,D. (2001). Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J. Immunol.* *167*, 1592-1600.
- Alessi,D.R., Cuenda,A., Cohen,P., Dudley,D.T., and Saltiel,A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* *270*, 27489-27494.
- Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., and Flavell,R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.
- Alvarez,E., Northwood,I.C., Gonzalez,F.A., Latour,D.A., Seth,A., Abate,C., Curran,T., and Davis,R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J. Biol. Chem.* *266*, 15277-15285.
- Amarzguioui,M., Holen,T., Babaie,E., and Prydz,H. (2003). Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* *31*, 589-595.
- Amarzguioui,M., Rossi,J.J., and Kim,D. (2005). Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett.* *579*, 5974-5981.
- Ameyar-Zazoua,M., Wisniewska,M.B., Bakiri,L., Wagner,E.F., Yaniv,M., and Weitzman,J.B. (2005). AP-1 dimers regulate transcription of the p14/p19ARF tumor suppressor gene. *Oncogene* *24*, 2298-2306.
- Angel,P., Hattori,K., Smeal,T., and Karin,M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* *55*, 875-885.
- Angel,P., Imagawa,M., Chiu,R., Stein,B., Imbra,R.J., Rahmsdorf,H.J., Jonat,C., Herrlich,P., and Karin,M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* *49*, 729-739.
- Angel,P. and Karin,M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* *1072*, 129-157.
- Arias,J., Alberts,A.S., Brindle,P., Claret,F.X., Smeal,T., Karin,M., Feramisco,J., and Montminy,M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* *370*, 226-229.

- Ashburner, B.P., Westerheide, S.D., and Baldwin, A.S., Jr. (2001). The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7065-7077.
- Baeza-Raja, B. and Munoz-Canoves, P. (2004). p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2013-2026.
- Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* **250**, 91-104.
- Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**, 97-101.
- Baggiolini, M., Loetscher, P., and Moser, B. (1995). Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**, 103-108.
- Baglioni, C. and Nilsen, T.W. (1983). Mechanisms of antiviral action of interferon. *Interferon* **5**, 23-42.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., and Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.* **19**, 2056-2068.
- Bakiri, L., Matsuo, K., Wisniewska, M., Wagner, E.F., and Yaniv, M. (2002). Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4952-4964.
- Barlow, D.P., Randle, B.J., and Burke, D.C. (1984). Interferon synthesis in the early post-implantation mouse embryo. *Differentiation* **27**, 229-235.
- Barnes, P.J. and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066-1071.
- Bass, B.L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* **101**, 235-238.
- Behrens, A., Sibilio, M., and Wagner, E.F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* **21**, 326-329.
- Belguise, K., Kersual, N., Galtier, F., and Chalbos, D. (2005). FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene* **24**, 1434-1444.
- Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M., and Anderson, D.W. (2001). SP600125, an anthranyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13681-13686.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J.C., Haegeman, G., Cohen, P., and Fiers, W. (1996). The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* **15**, 1914-1923.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U., and Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 14428-14433.
- Bosher, J.M. and Labouesse, M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.* **2**, E31-E36.
- Boutla, A., Delidakis, C., Livadaras, I., Tsagris, M., and Tabler, M. (2001). Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **11**, 1776-1780.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- Brasier,A.R., Jamaluddin,M., Casola,A., Duan,W., Shen,Q., and Garofalo,R.P. (1998). A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 3551-3561.
- Bregues,M., Teixeira,D., and Parker,R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486-489.
- Bridge,A.J., Pebernard,S., Ducraux,A., Nicoulaz,A.L., and Iggo,R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* **34**, 263-264.
- Brivanlou,A.H. and Darnell,J.E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* **295**, 813-818.
- Brocke-Heidrich,K., Kretzschmar,A.K., Pfeifer,G., Henze,C., Loffler,D., Koczan,D., Thiesen,H.J., Burger,R., Gramatzki,M., and Horn,F. (2004). Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* **103**, 242-251.
- Brown,J.R., Ye,H., Bronson,R.T., Dikkes,P., and Greenberg,M.E. (1996). A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell* **86**, 297-309.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R., and Agami,R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553.
- Canagarajah,B.J., Khokhlatchev,A., Cobb,M.H., and Goldsmith,E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869.
- Carmell,M.A. and Hannon,G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 214-218.
- Carmell,M.A., Xuan,Z., Zhang,M.Q., and Hannon,G.J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* **16**, 2733-2742.
- Catalanotto,C., Azzalin,G., Macino,G., and Cogoni,C. (2002). Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes Dev.* **16**, 790-795.
- Caudy,A.A., Ketting,R.F., Hammond,S.M., Denli,A.M., Bathorn,A.M., Tops,B.B., Silva,J.M., Myers,M.M., Hannon,G.J., and Plasterk,R.H. (2003). A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**, 411-414.
- Caudy,A.A., Myers,M., Hannon,G.J., and Hammond,S.M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* **16**, 2491-2496.
- Cerutti,L., Mian,N., and Bateman,A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 481-482.
- Chalk,A.M., Wahlestedt,C., and Sonhammer,E.L. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 264-274.
- Chang,L. and Karin,M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chapados,B.R., Chai,Q., Hosfield,D.J., Qiu,J., Shen,B., and Tainer,J.A. (2001). Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication. *J. Mol. Biol.* **307**, 541-556.
- Chen,B., Tsui,S., and Smith,T.J. (2005). IL-1 beta induces IL-6 expression in human orbital fibroblasts: identification of an anatomic-site specific phenotypic attribute relevant to thyroid-associated ophthalmopathy. *J. Immunol.* **175**, 1310-1319.

- Chen, Y.Q., Ghosh, S., and Ghosh, G. (1998). A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 67-73.
- Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* *103*, 263-271.
- Cheung, P.C., Campbell, D.G., Nebreda, A.R., and Cohen, P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J.* *22*, 5793-5805.
- Cheung, P.C., Nebreda, A.R., and Cohen, P. (2004). TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem. J.* *378*, 27-34.
- Chi, J.T., Chang, H.Y., Wang, N.N., Chang, D.S., Dunphy, N., and Brown, P.O. (2003). Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 6343-6346.
- Chida, K., Nagamori, S., and Kuroki, T. (1999). Nuclear translocation of Fos is stimulated by interaction with Jun through the leucine zipper. *Cell Mol. Life Sci.* *55*, 297-302.
- Chida, K. and Vogt, P.K. (1992). Nuclear translocation of viral Jun but not of cellular Jun is cell cycle dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 4290-4294.
- Chinenov, Y. and Kerppola, T.K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* *20*, 2438-2452.
- Chiu, R., Angel, P., and Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* *59*, 979-986.
- Chu, W.M., Ostertag, D., Li, Z.W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J., and Karin, M. (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* *11*, 721-731.
- Conrad, C. and Rauhut, R. (2002). Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *34*, 116-129.
- Coso, O.A., Montaner, S., Fromm, C., Lacal, J.C., Prywes, R., Teramoto, H., and Gutkind, J.S. (1997). Signaling from G protein-coupled receptors to the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor. Evidence for a novel c-jun amino-terminal kinase-independent pathway. *J. Biol. Chem.* *272*, 20691-20697.
- Couzin, J. (2002). Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* *298*, 2296-2297.
- Cuevas, B.D., Uhlik, M.T., Garrington, T.P., and Johnson, G.L. (2005). MEK1 regulates the AP-1 dimer repertoire via control of JunB transcription and Fra-2 protein stability. *Oncogene* *24*, 801-809.
- Curran, T. and Morgan, J.I. (1995). Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J. Neurobiol.* *26*, 403-412.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* *264*, 1415-1421.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* *351*, 95-105.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* *24*, 488-522.
- Deng, T. and Karin, M. (1994). c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* *371*, 171-175.



- Devary, Y., Gottlieb, R.A., Smeal, T., and Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71, 1081-1091.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Shen, S., and Ullu, E. (2003). An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 9, 802-808.
- Doench, J.G., Petersen, C.P., and Sharp, P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17, 438-442.
- Donze, O. and Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 30, e46.
- Dorsey, M.J., Tae, H.J., Sollenberger, K.G., Mascarenhas, N.T., Johansen, L.M., and Taparowsky, E.J. (1995). B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene* 11, 2255-2265.
- Eferl, R., Sibilio, M., Hilberg, F., Fuchsbichler, A., Kufferath, I., Guertl, B., Zenz, R., Wagner, E.F., and Zatloukal, K. (1999). Functions of c-Jun in liver and heart development. *J. Cell Biol.* 145, 1049-1061.
- Eferl, R. and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859-868.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K., and Harrison, S.C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71, 1223-1237.
- Feldmann, M. (2002). Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2, 364-371.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fleischmann, A., Hafezi, F., Elliott, C., Reme, C.E., Ruther, U., and Wagner, E.F. (2000). Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev.* 14, 2695-2700.
- Fuchs, S.Y., Dolan, L., Davis, R.J., and Ronai, Z. (1996). Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* 13, 1531-1535.
- Fuchs, S.Y., Xie, B., Adler, V., Fried, V.A., Davis, R.J., and Ronai, Z. (1997). c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J. Biol. Chem.* 272, 32163-32168.
- Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y.C., and Karin, M. (2004). Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 306, 271-275.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., and Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291-1294.
- Ge, B., Xiong, X., Jing, Q., Mosley, J.L., Filose, A., Bian, D., Huang, S., and Han, J. (2003). TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1. *J. Biol. Chem.* 278, 2286-2293.

Georganas,C., Liu,H., Perlman,H., Hoffmann,A., Thimmapaya,B., and Pope,R.M. (2000). Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J. Immunol.* **165**, 7199-7206.

Ghosh,S. and Karin,M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-S96.

Glover,J.N. and Harrison,S.C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* **373**, 257-261.

Gossen,M. and Bujard,H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5547-5551.

Gupta,S., Campbell,D., Derijard,B., and Davis,R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**, 389-393.

Haegeman,G., Content,J., Volckaert,G., Derynck,R., Tavernier,J., and Fiers,W. (1986). Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* **159**, 625-632.

Hai,T. and Curran,T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 3720-3724.

Haley,B. and Zamore,P.D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 599-606.

Hamilton,A.J. and Baulcombe,D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.

Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D., and Hannon,G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.

Hammond,S.M., Boettcher,S., Caudy,A.A., Kobayashi,R., and Hannon,G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146-1150.

Han,J., Jiang,Y., Li,Z., Kravchenko,V.V., and Ulevitch,R.J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**, 296-299.

Harada,H., Willison,K., Sakakibara,J., Miyamoto,M., Fujita,T., and Taniguchi,T. (1990). Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* **63**, 303-312.

Harant,H., de Martin,R., Andrew,P.J., Foglar,E., Dittrich,C., and Lindley,I.J. (1996). Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor-alpha involves the transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **271**, 26954-26961.

Heinrich,P.C., Behrmann,I., Haan,S., Hermanns,H.M., Muller-Newen,G., and Schaper,F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* **374**, 1-20.

Herdegen,T. and Leah,J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **28**, 370-490.

Hibi,M., Murakami,M., Saito,M., Hirano,T., Taga,T., and Kishimoto,T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149-1157.

Hilberg,F., Aguzzi,A., Howells,N., and Wagner,E.F. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365**, 179-181.

Hoffmann,E., Dittrich-Breiholz,O., Holtmann,H., and Kracht,M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 847-855.

- Hoffmann,E., Thiefes,A., Buhrow,D., Dittrich-Breiholz,O., Schneider,H., Resch,K., and Kracht,M. (2005). MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *J. Biol. Chem.* **280**, 9706-9718.
- Holtmann,H., Enninga,J., Kalble,S., Thiefes,A., Dorrie,A., Broemer,M., Winzen,R., Wilhelm,A., Ninomiya-Tsuji,J., Matsumoto,K., Resch,K., and Kracht,M. (2001). The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 3508-3516.
- Holtmann,H., Winzen,R., Holland,P., Eickemeier,S., Hoffmann,E., Wallach,D., Malinin,N.L., Cooper,J.A., Resch,K., and Kracht,M. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.* **19**, 6742-6753.
- Holzberg,D., Knight,C.G., Dittrich-Breiholz,O., Schneider,H., Dorrie,A., Hoffmann,E., Resch,K., and Kracht,M. (2003). Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of interleukin-1-induced inflammatory genes. *J. Biol. Chem.* **278**, 40213-40223.
- Hutvagner,G. and Zamore,P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-2060.
- Ikeda,O., Egami,H., Ishiko,T., Ishikawa,S., Kamohara,H., Hidaka,H., Takahashi,M., and Ogawa,M. (2006). Signal of proteinase-activated receptor-2 contributes to highly malignant potential of human pancreatic cancer by up-regulation of interleukin-8 release. *Int. J. Oncol.* **28**, 939-946.
- Ishitani,T., Takaesu,G., Ninomiya-Tsuji,J., Shibuya,H., Gaynor,R.B., and Matsumoto,K. (2003). Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J.* **22**, 6277-6288.
- Ishizuka,A., Siomi,M.C., and Siomi,H. (2002). A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* **16**, 2497-2508.
- Jackson,A.L., Bartz,S.R., Schelter,J., Kobayashi,S.V., Burchard,J., Mao,M., Li,B., Cavet,G., and Linsley,P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635-637.
- Jackson,A.L. and Linsley,P.S. (2004). Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* **20**, 521-524.
- Jadrich,J.L., O'Connor,M.B., and Coucouvanis,E. (2003). Expression of TAK1, a mediator of TGF-beta and BMP signaling, during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns.* **3**, 131-134.
- Janknecht,R. and Hunter,T. (1996). Transcription. A growing coactivator network. *Nature* **383**, 22-23.
- Jiang,Z., Ninomiya-Tsuji,J., Qian,Y., Matsumoto,K., and Li,X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7158-7167.
- Jing,Q., Huang,S., Guth,S., Zarubin,T., Motoyama,A., Chen,J., Di Padova,F., Lin,S.C., Gram,H., and Han,J. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* **120**, 623-634.
- Jochum,W., Passegue,E., and Wagner,E.F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**, 2401-2412.
- Kaminska,B., Pyrzynska,B., Ciechomska,I., and Wisniewska,M. (2000). Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* **60**, 395-402.
- Kanakaraj,P., Schafer,P.H., Cavender,D.E., Wu,Y., Ngo,K., Grealish,P.F., Wadsworth,S.A., Peterson,P.A., Siekierka,J.J., Harris,C.A., and Fung-Leung,W.P. (1998). Interleukin (IL)-1 receptor-

associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J. Exp. Med.* **187**, 2073-2079.

Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486.

Karin, M. and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221-227.

Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240-246.

Karin, M., Yamamoto, Y., and Wang, Q.M. (2004). The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 17-26.

Kasahara, T., Mukaida, N., Yamashita, K., Yagisawa, H., Akahoshi, T., and Matsushima, K. (1991). IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* **74**, 60-67.

Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D.R. (1998). DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol. Cell* **1**, 543-551.

Keller, E.T., Wanagat, J., and Ershler, W.B. (1996). Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* **1**, d340-d357.

Kettner-Buhrow, D., and Kracht, M. (November 2005). Suppression of stable cytokine mRNAs using siRNA oligonucleotides. Application Note. MWG Biotech. Internet: [http://www.mwgdna.de/docs/upload\\_doc\\_app\\_notes\\_s/AN053\\_Valid\\_of\\_siRNA\\_21\\_12.pdf](http://www.mwgdna.de/docs/upload_doc_app_notes_s/AN053_Valid_of_siRNA_21_12.pdf), 26.03.2006.

Khvorov, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216.

Kim, D.H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E., and Rossi, J.J. (2004). Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat. Biotechnol.* **22**, 321-325.

Kim, S.W., Hayashi, M., Lo, J.F., Fearn, C., Xiang, R., Lazennec, G., Yang, Y., and Lee, J.D. (2005). Tid1 negatively regulates the migratory potential of cancer cells by inhibiting the production of interleukin-8. *Cancer Res.* **65**, 8784-8791.

Kim, V.N. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells* **19**, 1-15.

Kishimoto, K., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2000). TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J. Biol. Chem.* **275**, 7359-7364.

Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* **258**, 593-597.

Komatsu, Y., Shibuya, H., Takeda, N., Ninomiya-Tsuji, J., Yasui, T., Miyado, K., Sekimoto, T.,

Komatsu, Y., Shibuya, H., Takeda, N., Ninomiya-Tsuji, J., Yasui, T., Miyado, K., Sekimoto, T., Ueno, N., Matsumoto, K., and Yamada, G. (2002). Targeted disruption of the Tab1 gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis. *Mech. Dev.* **119**, 239-249.

Kovary, K. and Bravo, R. (1991). Expression of different Jun and Fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol. Cell Biol.* **11**, 2451-2459.

Kracht, M. and Saklatvala, J. (2002). Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* **20**, 91-106.

Krause, A., Holtmann, H., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., and Kracht, M. (1998). 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**, 23681-23689.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.
- Lee, L.F., Haskill, J.S., Mukaida, N., Matsushima, K., and Ting, J.P. (1997). Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5097-5105.
- Lee, S.B. and Esteban, M. (1994). The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* **199**, 491-496.
- Li, Q. and Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725-734.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 576-577.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 719-723.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P., and Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science* **301**, 1921-1925.
- Lu, G., Kang, Y.J., Han, J., Herschman, H.R., Stefani, E., and Wang, Y. (2005). TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *J. Biol. Chem.*
- Luo, K.Q. and Chang, D.C. (2004). The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 303-310.
- Ma, J.B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* **429**, 318-322.
- Manna, S.K. and Ramesh, G.T. (2005). Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 7010-7021.
- Manning, A.M. and Davis, R.J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* **2**, 554-565.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-574.
- Martinez, J. and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* **18**, 975-980.
- Mastrorade, J.G., Monick, M.M., Mukaida, N., Matsushima, K., and Hunninghake, G.W. (1998). Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J. Infect. Dis.* **177**, 1275-1281.
- Matsuo, K., Owens, J.M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T.J., and Wagner, E.F. (2000). Fos1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat. Genet.* **24**, 184-187.

- Matsusaka,T., Fujikawa,K., Nishio,Y., Mukaida,N., Matsushima,K., Kishimoto,T., and Akira,S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10193-10197.
- McBride,K. and Nemer,M. (1998). The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol. Cell Biol.* 18, 5073-5081.
- Meister,G., Landthaler,M., Patkaniowska,A., Dorsett,Y., Teng,G., and Tuschl,T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185-197.
- Meister,G. and Tuschl,T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Meixner,A., Karreth,F., Kenner,L., and Wagner,E.F. (2004). JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. *EMBO J.* 23, 1325-1335.
- Mittal,V. (2004). Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 5, 355-365.
- Miyagishi,M. and Taira,K. (2002). U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 497-500.
- Mochida,Y., Takeda,K., Saitoh,M., Nishitoh,H., Amagasa,T., Ninomiya-Tsuji,J., Matsumoto,K., and Ichijo,H. (2000). ASK1 inhibits interleukin-1-induced NF-kappa B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 32747-32752.
- Moriguchi,T., Kuroyanagi,N., Yamaguchi,K., Gotoh,Y., Irie,K., Kano,T., Shirakabe,K., Muro,Y., Shibuya,H., Matsumoto,K., Nishida,E., and Hagiwara,M. (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* 271, 13675-13679.
- Mourelatos,Z., Dostie,J., Paushkin,S., Sharma,A., Charroux,B., Abel,L., Rappsilber,J., Mann,M., and Dreyfuss,G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16, 720-728.
- Mukaida,N., Okamoto,S., Ishikawa,Y., and Matsushima,K. (1994). Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 56, 554-558.
- Munoz-Sanjuan,I., Bell,E., Altmann,C.R., Vonica,A., and Brivanlou,A.H. (2002). Gene profiling during neural induction in *Xenopus laevis*: regulation of BMP signaling by post-transcriptional mechanisms and TAB3, a novel TAK1-binding protein. *Development* 129, 5529-5540.
- Murakami,M., Hibi,M., Nakagawa,N., Nakagawa,T., Yasukawa,K., Yamanishi,K., Taga,T., and Kishimoto,T. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-1810.
- Murphy,L.O., Smith,S., Chen,R.H., Fingar,D.C., and Blenis,J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* 4, 556-564.
- Musti,A.M., Treier,M., and Bohmann,D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275, 400-402.
- Myers,J.W., Jones,J.T., Meyer,T., and Ferrell,J.E., Jr. (2003). Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat. Biotechnol.* 21, 324-328.
- Nagpal,S., Athanikar,J., and Chandraratna,R.A. (1995). Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 270, 923-927.
- Natarajan,R., Gupta,S., Fisher,B.J., Ghosh,S., and Fowler,A.A., III (2001). Nitric oxide suppresses IL-8 transcription by inhibiting c-Jun N-terminal kinase-induced AP-1 activation. *Exp. Cell Res.* 266, 203-212.

- Newton,R., Hart,L.A., Stevens,D.A., Bergmann,M., Donnelly,L.E., Adcock,I.M., and Barnes,P.J. (1998). Effect of dexamethasone on interleukin-1beta-(IL-1bet)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* **254**, 81-89.
- Nicholson,R.H. and Nicholson,A.W. (2002). Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm. Genome* **13**, 67-73.
- Nissen,R.M. and Yamamoto,K.R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* **14**, 2314-2329.
- Nourbakhsh,M., Kalble,S., Dorrie,A., Hauser,H., Resch,K., and Kracht,M. (2001). The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. *J. Biol. Chem.* **276**, 4501-4508.
- Nykanen,A., Haley,B., and Zamore,P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**, 309-321.
- Ono,K., Ohtomo,T., Sato,S., Sugamata,Y., Suzuki,M., Hisamoto,N., Ninomiya-Tsuji,J., Tsuchiya,M., and Matsumoto,K. (2001). An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK. *J. Biol. Chem.* **276**, 24396-24400.
- Paddison,P.J., Caudy,A.A., and Hannon,G.J. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 1443-1448.
- Passegue,E., Jochum,W., Behrens,A., Ricci,R., and Wagner,E.F. (2002). JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat. Genet.* **30**, 158-166.
- Passegue,E., Jochum,W., Schorpp-Kistner,M., Mohle-Steinlein,U., and Wagner,E.F. (2001). Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell* **104**, 21-32.
- Patil,C., Zhu,X., Rossa,C., Jr., Kim,Y.J., and Kirkwood,K.L. (2004). p38 MAPK regulates IL-1beta induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol. Invest* **33**, 213-233.
- Paul,C.P., Good,P.D., Winer,I., and Engelke,D.R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* **20**, 505-508.
- Paul,W.E. and Seder,R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241-251.
- Payne,D.M., Rossomando,A.J., Martino,P., Erickson,A.K., Her,J.H., Shabanowitz,J., Hunt,D.F., Weber,M.J., and Sturgill,T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**, 885-892.
- Persengiev,S.P., Zhu,X., and Green,M.R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*. **10**, 12-18.
- Peters,M., Odenthal,M., Schirmacher,P., Blessing,M., Fattori,E., Ciliberto,G., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Rose-John,S. (1997). Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of the IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice. *J. Immunol* **159**, 1474-1481.
- Pham,J.W., Pellino,J.L., Lee,Y.S., Carthew,R.W., and Sontheimer,E.J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* **117**, 83-94.
- Platenik,J., Kuramoto,N., and Yoneda,Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* **67**, 335-364.

- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995). 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.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996). *Mol. Cell Biol.* 16, 1247-1255.
- Rand, T.A., Ginalski, K., Grishin, N.V., and Wang, X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 14385-14389.
- Ray, A., Sassone-Corsi, P., and Sehgal, P.B. (1989). A multiple cytokine- and second messenger-responsive element in the enhancer of the human interleukin-6 gene: similarities with c-fos gene regulation. *Mol. Cell Biol.* 9, 5537-5547.
- Ray, A., Tatter, S.B., May, L.T., and Sehgal, P.B. (1988). Activation of the human "beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 6701-6705.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorovova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326-330.
- Roux, P., Blanchard, J.M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P., and Piechaczyk, M. (1990). Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell* 63, 341-351.
- Rozek, D. and Pfeifer, G.P. (1993). In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol. Cell Biol.* 13, 5490-5499.
- Saatcioglu, F., Claret, F.X., and Karin, M. (1994). Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin. Cancer Biol.* 5, 347-359.
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2001). Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J. Exp. Med.* 193, 1351-1359.
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2002). p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat. Immunol.* 3, 69-75.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J., and Sugita, T. (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett.* 474, 141-145.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., and Sugita, T. (1999). Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with I-kappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 274, 10641-10648.
- Sakurai, H., Shigemori, N., Hasegawa, K., and Sugita, T. (1998). TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappa B-inducing kinase-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 545-549.
- Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., and Saiki, I. (2003). Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 36916-36923.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Sanjo, H., Takeda, K., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Akira, S. (2003). TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling. *Mol. Cell Biol.* 23, 1231-1238.



Sato,S., Sanjo,H., Takeda,K., Ninomiya-Tsuji,J., Yamamoto,M., Kawai,T., Matsumoto,K., Takeuchi,O., and Akira,S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6**, 1087-1095.

Saxena,S., Jonsson,Z.O., and Dutta,A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 44312-44319.

Scacheri,P.C., Rozenblatt-Rosen,O., Caplen,N.J., Wolfsberg,T.G., Umayam,L., Lee,J.C., Hughes,C.M., Shanmugam,K.S., Bhattacharjee,A., Meyerson,M., and Collins,F.S. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 1892-1897.

Schmidt-Supprian,M., Bloch,W., Courtois,G., Addicks,K., Israel,A., Rajewsky,K., and Pasparakis,M. (2000). NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol. Cell* **5**, 981-992.

Schmitz,M.L., Bacher,S., and Kracht,M. (2001). I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 186-190.

Schmitz,M.L., Mattioli,I., Buss,H., and Kracht,M. (2004). NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem.* **5**, 1348-1358.

Schorpp-Kistner,M., Wang,Z.Q., Angel,P., and Wagner,E.F. (1999). JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J.* **18**, 934-948.

Schramm and Ramey. (2005). MWG Biotech Homepage. Internet: [http://www.mwg-biotech.com/docs/upload\\_doc/NatureMethodsEmail\\_siRNA\\_Design.pdf](http://www.mwg-biotech.com/docs/upload_doc/NatureMethodsEmail_siRNA_Design.pdf), 31.03.2006.

Schreiber,M., Wang,Z.Q., Jochum,W., Fetka,I., Elliott,C., and Wagner,E.F. (2000). Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development* **127**, 4937-4948.

Schubert,S., Grunweller,A., Erdmann,V.A., and Kurreck,J. (2005). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J. Mol. Biol.* **348**, 883-893.

Schultz,H., Rogalla,T., Engel,K., Lee,J.C., and Gaestel,M. (1997). The protein kinase inhibitor SB203580 uncouples PMA-induced differentiation of HL-60 cells from phosphorylation of Hsp27. *Cell Stress. Chaperones.* **2**, 41-49.

Schumacher,M.A., Goodman,R.H., and Brennan,R.G. (2000). The structure of a CREB bZIP.somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J. Biol. Chem.* **275**, 35242-35247.

Schwarz,D.S., Hutvagner,G., Du,T., Xu,Z., Aronin,N., and Zamore,P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208.

Schwarz,D.S., Tomari,Y., and Zamore,P.D. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease. *Curr. Biol.* **14**, 787-791.

Sen,G.L. and Blau,H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 633-636.

Senftleben,U., Li,Z.W., Baud,V., and Karin,M. (2001). IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity.* **14**, 217-230.

Sha,W.C., Liou,H.C., Tuomanen,E.I., and Baltimore,D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* **80**, 321-330.

Sharp,P.A. (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev.* **15**, 485-490.

Shaulian,E. and Karin,M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-2400.

- Sheng, M., Thompson, M.A., and Greenberg, M.E. (1991). CREB: a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252, 1427-1430.
- Sheth, U. and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805-808.
- Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1996). TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272, 1179-1182.
- Shim, J.H., Xiao, C., Paschal, A.E., Bailey, S.T., Rao, P., Hayden, M.S., Lee, K.Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., and Ghosh, S. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* 19, 2668-2681.
- Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1997). TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 8141-8144.
- Singhirunnusorn, P., Suzuki, S., Kawasaki, N., Saiki, I., and Sakurai, H. (2005). Critical roles of threonine 187 phosphorylation in cellular stress-induced rapid and transient activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1) in a signaling complex containing TAK1-binding protein TAB1 and TAB2. *J. Biol. Chem.* 280, 7359-7368.
- Sizemore, N., Leung, S., and Stark, G.R. (1999). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol. Cell Biol.* 19, 4798-4805.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* 5, 834-839.
- Smeal, T., Angel, P., Meek, J., and Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev.* 3, 2091-2100.
- Smeal, T., Hibi, M., and Karin, M. (1994). Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A. *EMBO J.* 13, 6006-6010.
- Sohail, M., Doran, G., Riedemann, J., Macaulay, V., and Southern, E.M. (2003). A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Res.* 31, e38.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G.R., Rampersaud, N., Dyson, M.H., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., and Arthur, J.S. (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.* 22, 2788-2797.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Sontheimer, E.J. (2005). Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 127-138.
- Sreeramaneni, R., Chaudhry, A., McMahon, M., Sherr, C.J., and Inoue, K. (2005). Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 25, 220-232.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.
- Stein, B. and Baldwin, A.S., Jr. (1993). 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.
- Szlosarek, P.W., Grimshaw, M.J., Kulbe, H., Wilson, J.L., Wilbanks, G.D., Burke, F., and Balkwill, F.R. (2006). Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol. Cancer Ther.* 5, 382-390.

Tabara,H., Yigit,E., Siomi,H., and Mello,C.C. (2002). The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109, 861-871.

Tahbaz,N., Kolb,F.A., Zhang,H., Jaronczyk,K., Filipowicz,W., and Hobman,T.C. (2004). Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep.* 5, 189-194.

Takaesu,G., Kishida,S., Hiyama,A., Yamaguchi,K., Shibuya,H., Irie,K., Ninomiya-Tsuji,J., and Matsumoto,K. (2000). TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* 5, 649-658.

Takaesu,G., Ninomiya-Tsuji,J., Kishida,S., Li,X., Stark,G.R., and Matsumoto,K. (2001). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 21, 2475-2484.

Takaesu,G., Surabhi,R.M., Park,K.J., Ninomiya-Tsuji,J., Matsumoto,K., and Gaynor,R.B. (2003). TAK1 is critical for I $\kappa$ B kinase-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J. Mol. Biol.* 326, 105-115.

Thepot,D., Weitzman,J.B., Barra,J., Segretain,D., Stinnakre,M.G., Babinet,C., and Yaniv,M. (2000). Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function. *Development* 127, 143-153.

Thiefes,A., Wolter,S., Mushinski,J.F., Hoffmann,E., Dittrich-Breiholz,O., Graue,N., Dorrie,A., Schneider,H., Wirth,D., Luckow,B., Resch,K., and Kracht,M. (2005). Simultaneous blockade of NF $\kappa$ B, JNK, and p38 MAPK by a kinase-inactive mutant of the protein kinase TAK1 sensitizes cells to apoptosis and affects a distinct spectrum of tumor necrosis factor [corrected] target genes. *J. Biol. Chem.* 280, 27728-27741.

Thomas,R.S., Tymms,M.J., McKinlay,L.H., Shannon,M.F., Seth,A., and Kola,I. (1997). ETS1, NF $\kappa$ B and AP1 synergistically transactivate the human GM-CSF promoter. *Oncogene* 14, 2845-2855.

Tkach,V., Tulchinsky,E., Lukanidin,E., Vinson,C., Bock,E., and Berezin,V. (2003). Role of the Fos family members, c-Fos, Fra-1 and Fra-2, in the regulation of cell motility. *Oncogene* 22, 5045-5054.

Tomari,Y., Du,T., Haley,B., Schwarz,D.S., Bennett,R., Cook,H.A., Koppetsch,B.S., Theurkauf,W.E., and Zamore,P.D. (2004). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* 116, 831-841.

Tomari,Y. and Zamore,P.D. (2005). MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr. Biol.* 15, R61-R64.

Tratner,I. and Verma,I.M. (1991). Identification of a nuclear targeting sequence in the Fos protein. *Oncogene* 6, 2049-2053.

Treisman,R. (1992). The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* 17, 423-426.

Tupler,R., Perini,G., and Green,M.R. (2001). Expressing the human genome. *Nature* 409, 832-833.

Udalova,I.A. and Kwiatkowski,D. (2001). Interaction of AP-1 with a cluster of NF- $\kappa$ B binding elements in the human TNF promoter region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 25-33.

van Dam,H., Duyndam,M., Rottier,R., Bosch,A., Vries-Smits,L., Herrlich,P., Zantema,A., Angel,P., and van der Eb,A.J. (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of cjun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 12, 479-487.

Van Snick,J., Cayphas,S., Szikora,J.P., Renauld,J.C., Van Roost,E., Boon,T., and Simpson,R.J. (1988). cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur. J. Immunol.* 18, 193-197.

Vanden Berghe,W., De Bosscher,K., Boone,E., Plaisance,S., and Haegeman,G. (1999). The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J. Biol. Chem.* 274, 32091-32098.

Vanden Berghe,W., Plaisance,S., Boone,E., De Bosscher,K., Schmitz,M.L., Fiers,W., and Haegeman,G. (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 273, 3285-3290.

Vanden Berghe,W., Vermeulen,L., De Wilde,G., De Bosscher,K., Boone,E., and Haegeman,G. (2000). Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1185-1195.

Vial,E. and Marshall,C.J. (2003). Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. *J. Cell Sci.* 116, 4957-4963.

Vriz,S., Lemaitre,J.M., Leibovici,M., Thierry,N., and Mechali,M. (1992). Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* 12, 3548-3555.

Wagner,E.F. and Eferl,R. (2005). Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol. Rev.* 208, 126-140.

Wang,T.H., Chan,Y.H., Chen,C.W., Kung,W.H., Lee,Y.S., Wang,S.T., Chang,T.C., and Wang,H.S. (2006). Paclitaxel (Taxol) upregulates expression of functional interleukin-6 in human ovarian cancer cells through multiple signaling pathways. *Oncogene.*

Wang,W., Zhou,G., Hu,M.C., Yao,Z., and Tan,T.H. (1997). Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J. Biol. Chem.* 272, 22771-22775.

Wang,Z.Q., Ovitt,C., Grigoriadis,A.E., Mohle-Steinlein,U., Ruther,U., and Wagner,E.F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 360, 741-745.

Watanabe,M., Ogawa,Y., Ito,K., Higashihara,M., Kadin,M.E., Abraham,L.J., Watanabe,T., and Horie,R. (2003). AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am. J. Pathol.* 163, 633-641.

Weiss,C., Schneider,S., Wagner,E.F., Zhang,X., Seto,E., and Bohmann,D. (2003). JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J.* 22, 3686-3695.

Whitmarsh,A.J. and Davis,R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74, 589-607.

Wianny,F. and Zernicka-Goetz,M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-75.

Williams,B.R. (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 509-513.

Williams,B.R. (1999). PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18, 6112-6120.

Winzen,R., Kracht,M., Ritter,B., Wilhelm,A., Chen,C.Y., Shyu,A.B., Muller,M., Gaestel,M., Resch,K., and Holtmann,H. (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* 18, 4969-4980.

- Wu,G.D., Lai,E.J., Huang,N., and Wen,X. (1997). Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 272, 2396-2403.
- Yamaguchi,K., Shirakabe,K., Shibuya,H., Irie,K., Oishi,I., Ueno,N., Taniguchi,T., Nishida,E., and Matsumoto,K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- Yamamoto,T., Eckes,B., Mauch,C., Hartmann,K., and Krieg,T. (2000). Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J. Immunol* 164, 6174-6179.
- Yamasaki,K., Taga,T., Hirata,Y., Yawata,H., Kawanishi,Y., Seed,B., Taniguchi,T., Hirano,T., and Kishimoto,T. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241, 825-828.
- Yang,S.H., Sharrocks,A.D., and Whitmarsh,A.J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320, 3-21.
- Yang,W. and Steitz,T.A. (1995). Recombining the structures of HIV integrase, RuvC and RNase H. *Structure.* 3, 131-134.
- Zamore,P.D., Tuschl,T., Sharp,P.A., and Bartel,D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zeng,Y., Yi,R., and Cullen,B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9779-9784.
- Zenz,R., Eferl,R., Kenner,L., Florin,L., Hummerich,L., Mehic,D., Scheuch,H., Angel,P., Tschachler,E., and Wagner,E.F. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437, 369-375.
- Zerial,M., Toschi,L., Ryseck,R.P., Schuermann,M., Muller,R., and Bravo,R. (1989). The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* 8, 805-813.
- Zhang,A., Pastor,L., Nguyen,Q., Luo,Y., Yang,W., Flagella,M., Chavli,R., Bui,S., Nguyen,C.T., Zheng,Z., He,W., McMaster,G., and Witney,F. (2005). Small interfering RNA and gene expression analysis using a multiplex branched DNA assay without RNA purification. *J. Biomol. Screen.* 10, 549-556.
- Zhang,H., Kolb,F.A., Jaskiewicz,L., Westhof,E., and Filipowicz,W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57-68.
- Zhang,Z., Weinschenk,T., Guo,K., and Schluesener,H.J. (2006). siRNA binding proteins of microglial cells: PKR is an unanticipated ligand. *J. Cell Biochem.* 97, 1217-1229.
- Zhong,H., SuYang,H., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Ghosh,S. (1997). The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89, 413-424.
- Ziff,E.B. (1990). Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet.* 6, 69-72.
- Zlotnik,A. and Yoshie,O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12, 121-127.

## 6 Anhang

### 6.1 Sonden des Transkriptionsfaktorarrays TFhum

Nr.	Gensonde	Accession Number
1	c-JUN #1	NM_002228
2	c-JUN #2	NM_002228
3	c-JUN #3	NM_002228
4	JUNB #1	NM_002229
5	JUND #1	NM_005354
6	JUND #2	NM_005354
7	JUND #3	NM_005354
8	cFOS #1	NM_005252
9	cFOS #2	NM_005252
10	cFOS #3	NM_005252
11	FOSB #1	NM_006732
12	FOSB #2	NM_006732
13	FOSB #3	NM_006732
14	FRA-1 #1	NM_005438
15	FRA-1 #2	NM_005438
16	FRA-1 #3	NM_005438
17	FRA-2 #1	NM_005253
18	FRA-2 #2	NM_005253
19	FRA-2 #3	NM_005253
20	ATF1 #1	NM_005171
21	ATF1 #2	NM_005171
22	ATF1 #3	NM_005171
23	ATF2 #1	NM_001880
24	ATF2 #2	NM_001880
25	ATF2 #3	NM_001880
26	ATF3 #1	NM_004024
27	ATF3 #2	NM_004024
28	ATF3 #3	NM_004024
29	ATF4-1 #1	NM_001675
30	ATF4-1 #2	NM_001675
31	ATF4-1 #3	NM_001675
32	ATF4-2 #1	NM_182810
33	ATF4-2 #2	NM_182810
34	ATF5 #1	NM_012068
35	ATF5 #2	NM_012068
36	ATF5 #3	NM_012068
37	ATF6 #1	NM_007348
38	ATF6 #2	NM_007348
39	ATF6 #3	NM_007348
40	ATF7 #1	NM_006856
41	ATF7 #2	NM_006856
42	B-ATF #1	NM_006399
43	B-ATF #2	NM_006399
44	B-ATF #3	NM_006399
45	NFATC2 #1	NM_173091
46	NFATC2 #2	NM_173091
47	NFATC2 #3	NM_173091

Nr.	Gensonde	Accession Number
48	NFATC1-1 #1	NM_172390
49	NFATC1-2 #1	NM_006162
50	NFATC1-2 #2	NM_006162
51	NFATC1-3 #1	NM_172387
52	NFATC1-3 #2	NM_172387
53	NFATC1-3 #3	NM_172387
54	NFATC1-4 #1	NM_172388
55	NFATC1-4 #2	NM_172388
56	NFATC1-5 #1	NM_172389
57	NFATC4 #1	NM_004554
58	NFATC4 #2	NM_004554
59	NFATC4 #3	NM_004554
60	NFATC3-1 #1	NM_173165
61	NFATC3-2 #1	NM_004555
62	NFATC3-2 #2	NM_004555
63	NFATC3-2 #3	NM_004555
64	NFATC3-3 #1	NM_173163
65	NFATC3-3 #2	NM_173163
66	NFATC3-3 #3	NM_173163
67	NFATC3-4 #1	NM_173164
68	NFAT5-1 #1	NM_138714
69	NFAT5-1 #2	NM_138714
70	NFAT5-1 #3	NM_138714
71	NFAT5-2 #1	NM_138713
72	NFAT5-2 #2	NM_138713
73	NFAT5-2 #3	NM_138713
74	NFAT5-3 #1	NM_006599
75	NFAT5-3 #2	NM_006599
76	NFAT5-3 #3	NM_006599
77	MAF #1	NM_005360
78	MAF #2	NM_005360
79	MAF #3	NM_005360
80	MAFB #1	NM_005461
81	MAFB #2	NM_005461
82	MAFB Isoform #1	AF134157
83	MAFB Isoform #2	AF134157
84	MAFA #1	XM_352752
85	MAFA #2	XM_352752
86	MAFA #3	XM_352752
87	MAFG #1	NM_002359
88	MAFK #1	NM_002360
89	MAFF-1 #1	NM_012323
90	MAFF-1 #2	NM_012323
91	NRL #1	NM_006177
92	NRL #2	NM_006177
93	CEBPA #1	NM_004364
94	CEBPA #2	NM_004364

Nr.	Gensonde	Accession Number
95	CEBPB #1	NM_005194
96	CEBPB #2	NM_005194
97	CEBPB #3	NM_005194
98	CEBPG #1	NM_001806
99	CEBPG #2	NM_001806
100	CEBPD #1	NM_005195
101	CEBPD #2	NM_005195
102	CEBPD #3	NM_005195
103	CEBPE #1	NM_001805
104	NFIL3 #1	NM_005384
105	NFIL3 #2	NM_005384
106	NFIL3 #3	NM_005384
107	DDIT3 #1	NM_004083
108	DDIT3 #2	NM_004083
109	DDIT3 #3	NM_004083
110	NFE2L1 #1	NM_003204
111	NFE2L1 #2	NM_003204
112	NFE2L1 #3	NM_003204
113	NFE2L2 #1	NM_006164
114	NFE2L2 #2	NM_006164
115	NFE2L2 #3	NM_006164
116	NFE2L3 #1	NM_004289
117	NFE2L3 #2	NM_004289
118	NFE2L3 #3	NM_004289
119	NF-E1 #1	M76541
120	NF-E1 #2	M76541
121	BACH1 #1	NM_001186
122	BACH1 #2	NM_001186
123	BACH1 #3	NM_001186
124	BACH2 #1	NM_021813
125	BACH2 #2	NM_021813
126	BACH2 #3	NM_021813
127	CREB3L2 #1	NM_194071
128	CREB3L2 #2	NM_194071
129	CREB3L2 #3	NM_194071
130	ELF1 #1	NM_172373
131	ELF1 #2	NM_172373
132	ELF1 #3	NM_172373
133	SPI1 #1	NM_003120
134	ETS1 #1	NM_005238
135	ETS1 #2	NM_005238
136	ETS1 #3	NM_005238
137	ETS2 #1	NM_005239
138	ETS2 #2	NM_005239
139	ETS2 #3	NM_005239
140	FLI1 #1	NM_002017
141	FLI1 #2	NM_002017

Nr	Gensonde	Accession Number
142	ERG-1 #1	NM_182918
143	ERG-1 #2	NM_182918
144	ERG-1 #3	NM_182918
145	ERG-2 #1	NM_004449
146	ERG-2 #2	NM_004449
147	ELK4A #1	NM_001973
148	ELK4A #2	NM_001973
149	ELK4B #1	NM_021795
150	ELK4B #2	NM_021795
151	ELK4B #3	NM_021795
152	ELK3 #1	BC017371
153	ELK3 #2	BC017371
154	ELK3 #3	BC017371
155	TEF #1	NM_003216
156	HLF #1	NM_002126
157	HLF #2	NM_002126
158	HLF #3	NM_002126
159	DBP #1	NM_001352
160	DBP #2	NM_001352
161	DBP #3	NM_001352
162	CREM #1	NM_181571
163	CREM #2	NM_181571
164	HCREM-1 #1	D14825
165	HCREM-1 #2	D14825
166	HCREM-1 #3	D14825
167	ICER1 #1	AF069065
168	ICER1 #2	AF069065
169	ICER1 #3	AF069065
170	JDP2 #1	NM_130469
171	JDP2 #2	NM_130469
172	JDP2 #3	NM_130469
173	SNFT #1	NM_018664
174	SNFT #2	NM_018664
175	SNFT #3	NM_018664
176	XBP1 #1	NM_005080
177	XBP1 #2	NM_005080
178	XBP1 #3	NM_005080
179	SFA-2 #1	D42106
180	SFA-2 #2	D42106
181	CREB1A #1	NM_004379
182	CREB1A #2	NM_004379
183	CREB1B #1	NM_134442
184	CREB1B #2	NM_134442
185	CREB3 #1	NM_006368
186	CREB3 #2	NM_006368
187	CREB3 #3	NM_006368
188	CREB3L4 #1	NM_130898
189	CREB3L4 #2	NM_130898
190	CREB3L4 #3	NM_130898
191	CREB5 #1	NM_182898
192	CREB5 #2	NM_182898
193	CREB3L3 #1	NM_032607
194	CREB3L3 #2	NM_032607

Nr	Gensonde	Accession Number
195	CREB3L3 #3	NM_032607
196	CREBL1 #1	NM_004381
197	CREBL1 #2	NM_004381
198	CREBL1 #3	NM_004381
199	CREBL2 #1	NM_001310
200	CREBL2 #2	NM_001310
201	CREBL2 #3	NM_001310
202	CREB3L1 #1	NM_052854
203	CREB3L1 #2	NM_052854
204	CREB3L1 #3	NM_052854
205	Unnamed Protein #1	AK000928
206	Unnamed Protein #2	AK000928
207	Unnamed Protein #3	AK000928
208	HP8 #1	X87248
209	HP8 #2	X87248
210	MADH1 #1	NM_005900
211	MADH1 #2	NM_005900
212	MADH1 #3	NM_005900
213	MADH2 #1	NM_005901
214	MADH2 #2	NM_005901
215	MADH2 #3	NM_005901
216	MADH3 #1	NM_005902
217	MADH3 #2	NM_005902
218	MADH3 #3	NM_005902
219	MADH4 #1	NM_005359
220	MADH4 #2	NM_005359
221	MADH4 #3	NM_005359
222	MADH5 #1	NM_005903
223	MADH5 #2	NM_005903
224	MADH5 #3	NM_005903
225	MADH6 #1	NM_005585
226	MADH6 #2	NM_005585
227	MADH6 #3	NM_005585
228	MADH7 #1	NM_005904
229	MADH7 #2	NM_005904
230	MADH7 #3	NM_005904
231	STAT1A #1	NM_007315
232	STAT1A #2	NM_007315
233	STAT1A #3	NM_007315
234	STAT1B #1	NM_139266
235	STAT1B #2	NM_139266
236	STAT1B #3	NM_139266
237	STAT2 #1	NM_005419
238	STAT2 #2	NM_005419
239	STAT2 #3	NM_005419
240	STAT3-1 #1	NM_139276
241	STAT3-1 #2	NM_139276
242	STAT3-1 #3	NM_139276
243	STAT3-2 #1	NM_003150
244	STAT3-2 #2	NM_003150
245	STAT3-2 #3	NM_003150

Nr	Gensonde	Accession Number
246	STAT4 #1	NM_003151
247	STAT4 #2	NM_003151
248	STAT4 #3	NM_003151
249	STAT5A #1	NM_003152
250	STAT5A #2	NM_003152
251	STAT5A #3	NM_003152
252	STAT5B #1	NM_012448
253	STAT5B #2	NM_012448
254	STAT5B #3	NM_012448
255	c-REL #1	NM_002908
256	c-REL #2	NM_002908
257	c-REL #3	NM_002908
258	RELA #1	NM_021975
259	RELA #2	NM_021975
260	RELA #3	NM_021975
261	RELB #1	NM_006509
262	RELB #2	NM_006509
263	RELB #3	NM_006509
264	NFKB1 #1	NM_003998
265	NFKB1 #2	NM_003998
266	NFKB1 #3	NM_003998
267	p52 #1	AF098482
268	p52 #2	AF098482
269	p52 #3	AF098482
270	MYOD1 #1	NM_002478
271	MYOD1 #2	NM_002478
272	MYOG #1	NM_002479
273	MYOG #2	NM_002479
274	USF1 #1	NM_007122
275	USF1 #2	NM_007122
276	USF1 #3	NM_007122
277	MITF #1	NM_000248
278	MITF #2	NM_000248
279	MITF #3	NM_000248
280	SP1 #1	XM_028606
281	SP1 #2	XM_028606
282	SP1 #3	XM_028606
283	GATA2 #1	NM_032638
284	GATA2 #2	NM_032638
285	GATA2 #3	NM_032638
286	TBP #1	NM_003194
287	TBP #2	NM_003194
288	TBP #3	NM_003194
289	OCT-1 #1	X13403
290	OCT-1 #2	X13403
291	OCT-1 #3	X13403
292	NR3C1 #1	BC015610
293	NR3C1 #2	BC015610
294	NR3C1 #3	BC015610
295	RB1 #1	NM_000321
296	RB1 #2	NM_000321
297	RB1 #3	NM_000321
298	CREBBP #1	NM_004380

Nr.	Gensonde	Accession Number
299	CREBBP #2	NM_004380
300	CREBBP #3	NM_004380
301	JAB1 #1	U65928
302	JAB1 #2	U65928
303	JAB1 #3	U65928
304	SRC-1 #1	U40396
305	SRC-1 #2	U40396
306	ANAC #1	AF054187
307	ANAC #2	AF054187
308	ANAC #3	AF054187
309	SMRT #1	U37146
310	SMRT #2	U37146
311	SMRT #3	U37146
312	NCOA6 #1	NM_014071
313	NCOA6 #2	NM_014071
314	NCOA6 #3	NM_014071
315	MEN1 #1	U93236
316	MEN1 #2	U93236
317	THOC4 #1	NM_005782
318	THOC4 #2	NM_005782
319	THOC4 #3	NM_005782
320	UBN1 #1	NM_016936
321	UBN1 #2	NM_016936

Nr.	Gensonde	Accession Number
322	UBN1 #3	NM_016936
323	IRF1 #1	NM_002198
324	IRF1 #2	NM_002198
325	IRF1 #3	NM_002198
326	IRF2 #1	NM_002199
327	IRF2 #2	NM_002199
328	IRF2 #3	NM_002199
329	IRF3 #1	NM_001571
330	IRF3 #2	NM_001571
331	IRF3 #3	NM_001571
332	IRF4 #1	NM_002460
333	IRF4 #2	NM_002460
334	IRF4 #3	NM_002460
335	IRF5-1 #1	NM_002200
336	IRF5-1 #2	NM_002200
337	IRF5-2 #1	NM_032643
338	IRF5-2 #2	NM_032643
339	IRF5-2 #3	NM_032643
340	IRF6 #1	NM_006147
341	IRF6 #2	NM_006147
342	IRF6 #3	NM_006147
343	IRF7A #1	NM_001572
344	IRF7A #2	NM_001572

Nr.	Gensonde	Accession Number
345	IRF7C #1	NM_004030
346	IRF7C #2	NM_004030
347	IRF7D #1	NM_004031
348	IRF7D #2	NM_004031
349	ACTB	NM_001101
350	GAPDH	NM_002046
351	HPRT1	NM_000194
352	RPL15	NM_002948
353	UBC	NM_021009
354	RPS17	NM_001021
355	U2AF1	NM_006758
356	COX8	NM_004074
357	UQCRC1	NM_003365
358	MRPL27	NM_148570
359	GSS	NM_000178
360	PAPSS1	NM_005443
361	LARS2	NM_015340
362	PDHA1	NM_000284
363	UBE2L3	NM_003347
364	PTDSS1	NM_014754
365	POLR2A	NM_000937
366	NDUFB8	NM_005004
367	GUSB	NM_000181

## 6.2 Antikörper des RayBio® Human Cytokine Antibody Arrays

### 6.2.1 Array VI

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
1	POS	POS	POS	POS	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CK β 8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CK β 8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
3	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN-γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
4	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN-γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
5	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1δ	MIP-3α	NAP-2	NT-3	PARC
8	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1δ	MIP-3α	NAP-2	NT-3	PARC
9	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TGF-β 3	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
10	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TGF-β 3	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	POS	POS

### 6.2.2 Array VII

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
1	POS	POS	POS	POS	Blank	Acrp30	AqRP	Angiopoietin-2	Amphiregulin	Axl	bFGF	b-NGF	BTC	CCL-28
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Blank	Acrp30	AqRP	Angiopoietin-2	Amphiregulin	Axl	bFGF	b-NGF	BTC	CCL-28
3	CTACK	Dtk	EGF-R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF-9	GCSF	GITR-Ligand	GITR	GRO	GRO-α	HCC-4	HGF
4	CTACK	Dtk	EGF-R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF-9	GCSF	GITR-Ligand	GITR	GRO	GRO-α	HCC-4	HGF
5	ICAM-1	ICAM-3	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF-1 SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Rα	IL-6 R	IL-8
6	ICAM-1	ICAM-3	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF-1 SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Rα	IL-6 R	IL-8
7	I-TAC	Lymphotoctin	MIF	MIP-1α	MIP-1 β	MIP-3β	MSP-α	NT-4	Osteoprotegerin	Oncostatin M	PIGF	sgp130	sTNF RII	sTNF-RI
8	I-TAC	Lymphotoctin	MIF	MIP-1α	MIP-1 β	MIP-3β	MSP-α	NT-4	Osteoprotegerin	Oncostatin M	PIGF	sgp130	sTNF RII	sTNF-RI
9	TECK	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	TRAIL R3	TRAIL R4	uPAR	VEGF	VEGF-D	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
10	TECK	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	TRAIL R3	TRAIL R4	uPAR	VEGF	VEGF-D	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank



## 7 Lebenslauf

**Daniela Kettner-Buhrow**, geb. Buhrow  
Dipl.-Biochemikerin  
\*16.03.1978 in Marburg/Lahn

### Schule

08/1984 – 07/1988 Grundschule Marburg-Wehrda in Marburg/Lahn  
08/1988 – 06/1997 Gymnasium Martin-Luther-Schule in Marburg/Lahn  
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Studium

10/1997 – 10/2002 Biochemie; Universität Hannover  
09/1999 Vordiplom Biochemie; Note: Sehr gut  
02/2002 – 08/2002 Diplomarbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur pharmakologischen Modulation von intrazellulären Effektormolekülen des unspezifischen Immunsystems“ am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht  
Studienabschluss: Diplom Biochemie; Note: Sehr gut

### Promotionsstudium

10/2002 – dato Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kracht  
Betreuer: Prof. Dr. Müller (Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover) und Prof. Dr. Kracht

Hannover, 31.03.2006

*Daniela Kettner-Buhrow*

## 8 Liste wissenschaftlicher Publikationen

- **Kettner-Buhrow,D.**, Dittrich-Breiholz,O., Schneider,H., Wolter,S., Resch,K., and Kracht,M. (2006)  
Small interfering RNAs generated by recombinant dicer induce inflammatory gene expression independent from the TAK1-NFkappaB-MAPK signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *347*, 566-573.
- **Kettner-Buhrow,D.**, and Kracht,M. (November 2005)  
Suppression of stable cytokine mRNAs using siRNA oligonucleotides.  
Application Note. MWG Biotech.  
Internet: [http://www.mwgdna.de/docs/upload\\_doc\\_app\\_notes\\_s/AN053\\_Valid\\_of\\_siRNA\\_21\\_12.pdf](http://www.mwgdna.de/docs/upload_doc_app_notes_s/AN053_Valid_of_siRNA_21_12.pdf), 26.03.2006
- Hoffmann,E., Thiefes,A., **Buhrow,D.**, Dittrich-Breiholz,O., Schneider,H., Resch,K., and Kracht,M. (2005)  
MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors.  
*J. Biol. Chem.* *280*, 9706-9718.
- Kracht,M., Thiefes,A., **Buhrow,D.**, Resch,K., and Hoffmann,E.  
MEK1-dependent delayed expression of fra-1 counteracts c-fos and p65 NF-κB-mediated Interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors.  
Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI), Maastricht, 20.10.2004-23.10.2004, *Immunobiol.* *209*(2004)4-6, Page 414, L.9
- Hoffmann,E., Dittrich-Breiholz,O., Thiefes,A., **Buhrow,D.**, Resch,K., and Kracht,M.  
Inducible Fra-1 and c-Fos expression determines the extent of interleukin-8 gene transcription in response to IL-1 or EGF.  
Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 45. Frühjahrstagung, Mainz, 9.03.-11.03.2004, *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Supplement 1 to Volume 369*, March 2004, Page R73, 292