

Untersuchung der Rolle der MK2-Funktion bei der Migration von
Endothelzellen, der Regulation von Urokinase Plasminogen Aktivator
und der Herpes Simplex Virus 1 Infektion

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Katarzyna E. Schewe
geboren am 10.06.1975 in Częstochowa (Polen)

2006

Referent: Prof. Dr. Matthias Gaestel

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 17.08.2006

1 Kurzzusammenfassung

Mitogen-Aktivierte Protein Kinasen (MAPK) gehören zur Serin/Threonin-Superfamilie. Eine der vier Hauptgruppen der MAPK wird durch die vier bekannten Isoformen der p38-MAP-Kinasen repräsentiert. Eines der ersten bekannten Substrate von p38 α,β ist die MAPKAP Kinase 2 (MK2).

Ziel dieser Arbeit war die weitere Charakterisierung des Phänotyps der MK2-defizienten Mäuse und Zellen am Beispiel des invasiven Verhaltens der Endothelzellen im Matrigel und der Expression von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und des Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptors (uPAR).

Es konnte gezeigt werden, dass die invasive Ausbreitung der Endothelzellen in dem Aorta Ring Modell in MK2-defizienten Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp (WT)-Mäusen deutlich schwächer war. Die Ausbreitung der Endothelzellen in WT-Mäusen konnte mit dem p38-Inhibitor, SB203580, signifikant gehemmt werden. In einem Zymogramm wurde gezeigt, dass die Aktivität von uPA in immortalisierten und primären mit UV stimulierten MK2-defizienten Maus-embryonalen Fibroblasten (MEF) im Vergleich zum WT gesenkt war. Eine Rückführung der MK2 in die MK2-defizienten MEFs normalisierte die uPA-Aktivität. SB203580, ein spezifischer Inhibitor von p38 α,β , konnte in WT-Zellen die uPA-Aktivität signifikant hemmen. In immortalisierten und primären Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die uPA-Regulation auf der Ebene der mRNA-Stabilität stattfindet. Tristetraprolin (TTP) ist ein Zinkfingerprotein das an mRNA bindet. In TTP- und MK2/TTP-defizienten Makrophagen waren die uPA-mRNA-Werte vergleichbar mit denen der WT-Zellen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass der p38/MK2-Signalweg die uPA-Expression reguliert und es wurden die ersten Hinweise über die Rolle von TTP in der uPA-Regulation gelegt.

Weiterhin wurde die Rolle von MK2 und TTP bei der HSV-1-Infektion von Fibroblasten untersucht. Verglichen mit WT-Zellen war in den MK2- und den TTP-defizienten Primärkulturen von MEFs der Eintritt der Viren unverändert. Es konnte gezeigt werden, dass eine HSV-1 Infektion das TTP auf der transkriptionellen und der translationellen Ebene stimulieren kann. Die Stimulation des TTPs in MK2-/- Zellen war im Vergleich zu WT stark reduziert und konnte durch SB203580-Behandlung weiter abgeschwächt werden. In einem Zytotoxizitätstest konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum WT eine gesteigerte Resistenz der Zellen gegen eine Virusinfektion in der Reihenfolge MK2-/- Zellen, TTP-/- Zellen auftritt. Möglicherweise ist der p38/MK2/TTP-Signalweg in die Regulation des Zelltodes nach einer HSV-1-Infektion involviert.

Stichworte: MAPKAP-Kinase 2 / Tristetraprolin / Urokinase Plasminogen Aktivator

2 Abstract

Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) belong to the Serin/Threonin-Superfamily. One of the four major MAPK groups is the p-38-MAP-Kinases family, which consists of four isoforms. The first identified and most described substrate of p38 α,β is MAPK-activated protein kinase 2 (MK2).

The goal of this thesis was the further characterisation of the phenotype of MK2 deficient mouse and cells on the examples of the invasive behaviour of the endothelial cells in the matrigel and the expression of the urokinase plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR).

It has been shown in an aorta ring assay that the invasive spread of the endothelial cells in MK2 deficient mouse was significantly reduced compared to wild type (WT) mouse. Treatment with SB203580 compound, a specific p38 α,β -inhibitor, significantly inhibited the spread of the endothelial cells in WT. A significant reduction of uPA expression and activity in immortalised and primary MK2 deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs), compared to WT cells, in response to UV light was demonstrated by a zymogram. A transduction of the MK2 $^{-/-}$ MEFs with a construct expressing WT-MK2 resulted in a rescue of the uPA activity. uPA expression and activity in WT MEFs, on the other hand, could be significantly inhibited using SB203580 compound. It was shown that uPA regulation takes place on the mRNA level in immortalised and primary macrophages. Tristetraprolin (TTP) is a zinc finger protein, which binds to mRNA. The uPA-mRNA level in TTP and in MK2/TTP deficient macrophages was comparable to WT. It was demonstrated that the uPA expression is regulated through the p38/MK2 signal pathway. The results indicate the role of TTP in the regulation of uPA.

Additionally, the role of MK2 and TTP in HSV-1 infection of fibroblasts was investigated. The virus entry in the primary MEFs did not differ between WT, MK2 $^{-/-}$ and TTP $^{-/-}$. It was demonstrated that an infection with HSV-1 can stimulate TTP on the transcriptional and translational level. The stimulation of TTP in MK2 $^{-/-}$ cells was significantly reduced compared to WT, and could be inhibited further using the SB203580 compound. In a cytotoxic assay the MK2 $^{-/-}$ cells showed an increased resistance to HSV-1 infection compared to WT, and the TTP $^{-/-}$ cells were more resistant to HSV-1 compared to WT and MK2 $^{-/-}$. This may indicate an involvement of the p38/MK2/TTP-pathway in the regulation of cell death upon HSV-1 infection.

Keywords: MAPKAP-Kinase 2 / Tristetraprolin / Urokinase Plasminogen Activator

3 Inhaltsverzeichnis

1	KURZZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABSTRACT	2
3	INHALTSVERZEICHNIS	3
4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
5	EINLEITUNG	11
5.1	MAP Kinase Signalwege	11
5.2	p-38-MAP Kinase	15
5.3	MAPKAP Kinase 2 (MK2)	20
5.4	MAPKAP Kinase 5 (MK5)	24
5.5	ARE-enhaltende mRNAs und ARE-Bindungsproteine, Tristetraprolin (TTP)	25
5.6	Urokinase Plasminogen System	26
5.7	Herpesviren und HSV-1	27
5.8	Herpesviren und die Immunantwort	30
5.9	Aufgabenstellung	34
6	MATERIALIEN UND METHODEN	36
6.1	Verwendete Materialien	36
6.1.1	Chemikalien.....	36
6.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	37
6.1.2.1	Zellkultur.....	37
6.1.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
6.1.2.3	Western Blot.....	38
6.1.2.4	Northern Blot	38
6.1.2.5	Agarosegele.....	39
6.1.2.6	FACS.....	39
6.1.2.7	MAPKAP Kinase 2 Assay	40
6.1.2.8	Immunpräzipitation	40
6.1.3	Nährmedien	40
6.1.3.1	Medien für die Zellkultur	40
6.1.3.2	Medien für Bakterien	41

6.1.4	Zelllinien.....	42
6.1.5	Mäuse	42
6.1.5.1	Tötung der Mäuse.....	42
6.1.6	Rekombinante Proteine.....	42
6.1.7	Plasmide	43
6.1.8	Oligonukleotide	43
6.1.9	Antikörper.....	43
6.1.10	Marker	44
6.1.11	Kits	44
6.1.12	Geräte	45
6.2	Zellbiologische Methoden	46
6.2.1	Kultivierung von Zellen.....	46
6.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	46
6.2.3	Isolierung von primären Zellen aus der Maus	47
6.2.3.1	Makrophagen.....	47
6.2.3.2	Maus Embryonale Fibroblasten (E13)	47
6.2.3.3	Thymozyten.....	47
6.2.3.4	T-Zellen.....	48
6.2.4	Behandlung der Zellen mit SB203580	48
6.2.5	Stimulation der Zellen mit UV	48
6.2.6	FACS Analyse	48
6.2.6.1	Prä-G1-peak	48
6.2.6.2	Annexin-V	49
6.2.6.3	Rh123	50
6.2.7	WST-1-Assay	50
6.2.8	3/7-Caspase-Assay.....	50
6.2.9	[³ H]-Thymidin-Inkorporation	51
6.2.10	Transfektion.....	51
6.2.10.1	Transfektion mit Lipofectamin-Plus	51
6.2.10.2	Transfektion mit Calcium-Phosphat	52
6.2.11	Migrationsassay	52
6.2.12	Adhäsionsassay.....	52
6.2.13	Aorta Ring Modell.....	53
6.2.14	Wund-Test	53
6.2.15	Fixierung und Färbung der Zellen mit Kristallviolett.....	54
6.3	Biochemische Methoden	54
6.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	54
6.3.2	Proteinfällung	54

6.3.3	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford	54
6.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
6.3.5	Nicht reduzierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
6.3.6	Western Blot	55
6.3.7	Strippen des Western Blots.....	55
6.3.8	Zymogramm	55
6.3.9	Immunzytochemie	56
6.3.10	MAPKAP Kinase 2 Assay.....	57
6.3.11	Immunpräzipitation	57
6.4	Molekularbiologische Methoden.....	57
6.4.1	Transformation	57
6.4.2	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab	57
6.4.3	Gelelektrophorese von DNA	58
6.4.4	Extraktion der DNA aus dem Agarosegel	58
6.4.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	58
6.4.6	Isolierung von RNA.....	58
6.4.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
6.4.8	Northern Blot.....	59
6.5	Virologische Methoden	60
6.5.1	Viruspräparation aus dem Mediumüberstand.....	60
6.5.2	Plaque Assay	61
6.5.3	Infektion der Zellen für Protein- bzw. RNA-Isolierung	61
6.5.4	β-Gal-Assay	62
6.5.5	Virusreplikationassay, TCID ₅₀ -Test	62
6.5.6	Plaque-Reduction-Assay	63
6.5.7	Zytotoxizität	63
7	ERGEBNISSE	65
7.1	Die Rolle von MK2 bei der Expression und der Aktivierung von uPA und uPAR.....	65
7.1.1	Die Aktivität des uPA.....	65
7.1.2	Expression von uPA und uPAR auf mRNA-Ebene.....	68
7.1.3	Aorta Ring Modell.....	70
7.2	Die Rolle von MK2 bei der Virusinfektion	74
7.2.1	Aktivierung von p38 und MK2 durch HSV-1	74
7.2.2	Expression von Tristetraprolin (TTP).....	75
7.2.3	Nachweis von TTP mRNA in primären WT und MK2 ^{-/-} MEFs	78
7.2.4	Stimulation von TTP durch andere Viren.....	79
7.2.5	Viruseintritt.....	80

7.2.6	Plaquebildung	85
7.2.7	Zytokinproduktion und protektive Wirkung der Zellüberstände	87
7.2.8	Zytotoxizität	89
7.3	Einfluss von Immortalisierung auf die UV-stimulierte Apoptose.....	90
8	DISKUSSION	96
8.1	Die Rolle von MK2 in der Regulation des Urokinase Plasminogen Systems und beim invasiven Verhalten der Endothelzellen.....	96
8.2	Die Rolle von MK2 in der Virusinfektion	102
8.3	Physiologische Bedeutung der Immortalisierung von Zellen.....	107
9	AUSBLICK.....	110
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	112
11	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	129

4 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASK	<i>Apoptosis signal regulating kinase</i>
ATP	Adenosin Triphosphat
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
BMK	<i>Big MAP kinase</i>
BSA	Serum-Albumin des Rindes
CV	Kristallviolett
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DiR	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindotricarbocyaninioidid
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
ECGS	<i>Endothelial cell growth supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Serum des Kalbes)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)

GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HFS	<i>Hypotonic fluorochrom solution</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HSV-1	Herpes Simplex Virus-1
HuR	Hu Protein R
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediators</i>
ICP	<i>Infected cell protein</i>
IE	<i>Immediate-early</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
LB	Luria Bertani (Kulturmedium)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MEF	Maus Embryonale Fibroblasten
MEK	<i>Mitogen/Extracellular-signal regulated kinase kinase</i>
MEKK	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>
MKK	<i>MAP kinase kinase</i>
MK2	Mitogen Aktivierte Protein Kinase Aktivierte Protein Kinase 2
MK5	Mitogen Aktivierte Protein Kinase Aktivierte Protein Kinase 5
MLK	<i>Mixed lineage kinase</i>

MOI	<i>Multiplicities of infection</i>
MOPS	<i>4-morpho-linepropanesulfonic acid</i>
MTK	<i>MAP three kinase</i>
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
OD	Optische Dichte
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque-forming units</i>
PI	Propidiumiodid
PKI	Proteinkinase inhibitor
PKR	<i>Double stranded RNA-activated protein kinase</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rh123	Rhodamin 123
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute Medium</i> (Kulturmedium)
RT	Raumtemperatur, definiert als 18-25 °C

SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	
SFM	Serumfreies Medium
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAK	<i>TGFβ-activated kinase</i>
TAE	Tris, Acetat, EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCID	<i>Tissue culture infecting dose</i>
α -TIF	<i>α-trans-inducing factor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TPL	<i>Tumor progression locus</i>
TTP	Tristetraprolin
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor
Vhs	<i>Virus host shutoff</i>
WST-1	(4-[3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat
WT	Wildtyp

5 Einleitung

5.1 MAP Kinase Signalwege

Alle Lebewesen, vom Einzeller bis hin zu komplexen Organismen, entwickeln sich unter vielfältigen Umwelteinflüssen. Bei den einzelnen Umweltfaktoren kann es sich um externe Parameter, wie z. B. Temperatur, UV-Strahlung, osmotischer Druck oder pH-Wert, aber auch um den Einfluss anderer Zellen handeln. Eine spezielle Rolle innerhalb der Umweltfaktoren nehmen Botenstoffe ein, die die interzelluläre Kommunikation innerhalb eines Organismus sicherstellen; die einzelnen Zellen sind in der Lage spezifische Botenstoffe zu produzieren und zu sezernieren. Es handelt sich dabei z.B. um Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone, die von bestimmten Zellen spezifisch empfangen und verarbeitet werden können. Bei der Aufnahme, der Verarbeitung und bei der Antwort auf diese Signale handelt es sich um sehr komplexe Vorgänge. Letztendlich führen diese zu biochemischen Veränderungen, wie z.B. der Enzymaktivität oder der Expression bestimmter Gene. Um auf ein externes Signal zu reagieren, entwickelten die Zellen verschiedene Systeme. Dazu gehören Zellmembranrezeptoren, intrazelluläre Rezeptorproteine, intrazelluläre Signalstoffe, wie Inositoltriphosphat, das cyclische Adenosin 3',5'-monophosphat (cAMP) und Kalzium, GTP-bindende Proteine, Proteinkinasen und Proteinphosphatasen und eine Reihe weiterer Proteine, die mit anderen Signalproteinen in Wechselwirkung treten.

Die Proteinkinasen bilden eine der größten Proteinfamilie und die größte Enzymfamilie in höheren Zellen. Die Gene, die für die Proteinkinasen kodieren, stellen ca. 1,7 % des gesamten menschlichen Genoms dar (Manning et al. 2002b). Ein Vergleich der Proteinkinasen verschiedener Eukaryonten zeigt, dass die einzelnen Kinasen oder ganze Kinasenfamilien in der Evolution sehr konserviert geblieben sind. Meistens handelt es sich hier um Kinasen, die an den grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt sind. Bei anderen Familien trifft man hingegen auf eine hohe Diversität zwischen den Organismen. Sie sind in Signalkaskaden eukaryontischer Zellen involviert und kontrollieren dadurch viele zelluläre Prozesse, wie Metabolismus, Transkription, Zellzyklus, Regulation und Modifikation des Cytoskeletts, Zellmigration, Apoptose und Entwicklung (Caenepeel et al. 2004). Die Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger Bestandteil interzellulärer Kommunikation im Nervensystem als auch im Immunsystem (Manning et al. 2002a). Neben Kinasen, die konstitutiv aktiv sind, erfordern die meisten Kinasen eine Aktivierung. Dies geschieht nicht nur über meist mehrere regulatorische Phosphorylierungsorte sondern kann auch durch eine

Bindung eines Aktivatorsprotein oder eines Inhibitors, eine ligandenkontrollierte Bindung regulatorischer Untereinheiten, eine Aktivierung durch Cofaktoren, eine intrazelluläre Lokalisation oder eine Änderung des Oligomerisationszustandes erfolgen (Chang and Karin 2001; Cowan and Storey 2003; Dhanasekaran 1998; Dhanasekaran and Premkumar Reddy 1998; Whitmarsh and Davis 1998). Die Phosphorylierung durch Proteinkinasen wird durch Konformationsänderung des Zielproteins, direkte Bindung eines Substrates oder anderer Bindungspartner und Bildung einer Bindungsstelle für ein Effektormolekül reguliert. Die Proteinkinasen können anhand der katalytischen Domäne, die meist aus 250-300 Aminosäuren besteht und weiterhin in 12 konservierte Subdomänen aufgeteilt werden kann, in Familien, Gruppen und Subgruppen unterteilt werden. Es gibt zwei Hauptfamilien, sogenannte Superfamilien von Proteinkinasen: die Serin/Threonin- und die Tyrosin-Kinasen (Hanks and Hunter 1995).

Mitogen-Aktivierte Protein Kinasen (MAPK) bilden eine Proteinkinasefamilie, die in Eukaryonten von Hefe bis zu Mensch stark konserviert sind und zu den Serin/Threonin-Superfamilie gehört. Die vier Hauptgruppen dieser Familie bilden die *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), *c-jun N-terminal / stress-activated protein kinases* (JNK/SAPK), p38 und ERK5 (*Big MAPK*) (Johnson and Lapadat 2002; Zarubin and Han 2005). Sie werden durch eine duale Phosphorylierung an einem Tyrosin- und Threoninrest aktiviert. Diese Phosphorylierungsstellen liegen in dem Motiv TXY zwischen der Subdomäne VII und VIII innerhalb des Aktivierungsloops der katalytischen Kinasedomäne (Hanks and Hunter 1995; Qi and Elion 2005), wobei X je nach Hauptgruppe Glutamat (Glu), Prolin (Pro) oder Glycin (G) ist (Cowan and Storey 2003; Dhanasekaran and Premkumar Reddy 1998). Die MAP Kinasen der p38-Signalkaskade enthalten das Motiv TGY, die ERK1/2 und ERK5 das TEY und die JNK-Gruppe weisen das TPY-Motiv auf (Shi and Gaestel 2002). Jedes Modul dieser Signalkaskaden besteht aus drei verschiedenen Proteinkinasen, die sich in der Zelle linear anordnen und das Signal von der extrazellulären Membran in das Zellinnere weitergeben. Die Signale werden durch GTPasen und / oder andere Proteinkinasen an das erste Modul die MAPKKK weitergegeben. Die MAPKKK phosphorylieren die MAPKK und diese phosphorylieren weiter die MAPK. Andere Substrate für die MAPK stellen Proteinkinasen, Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren und Cytoskelettproteine dar.

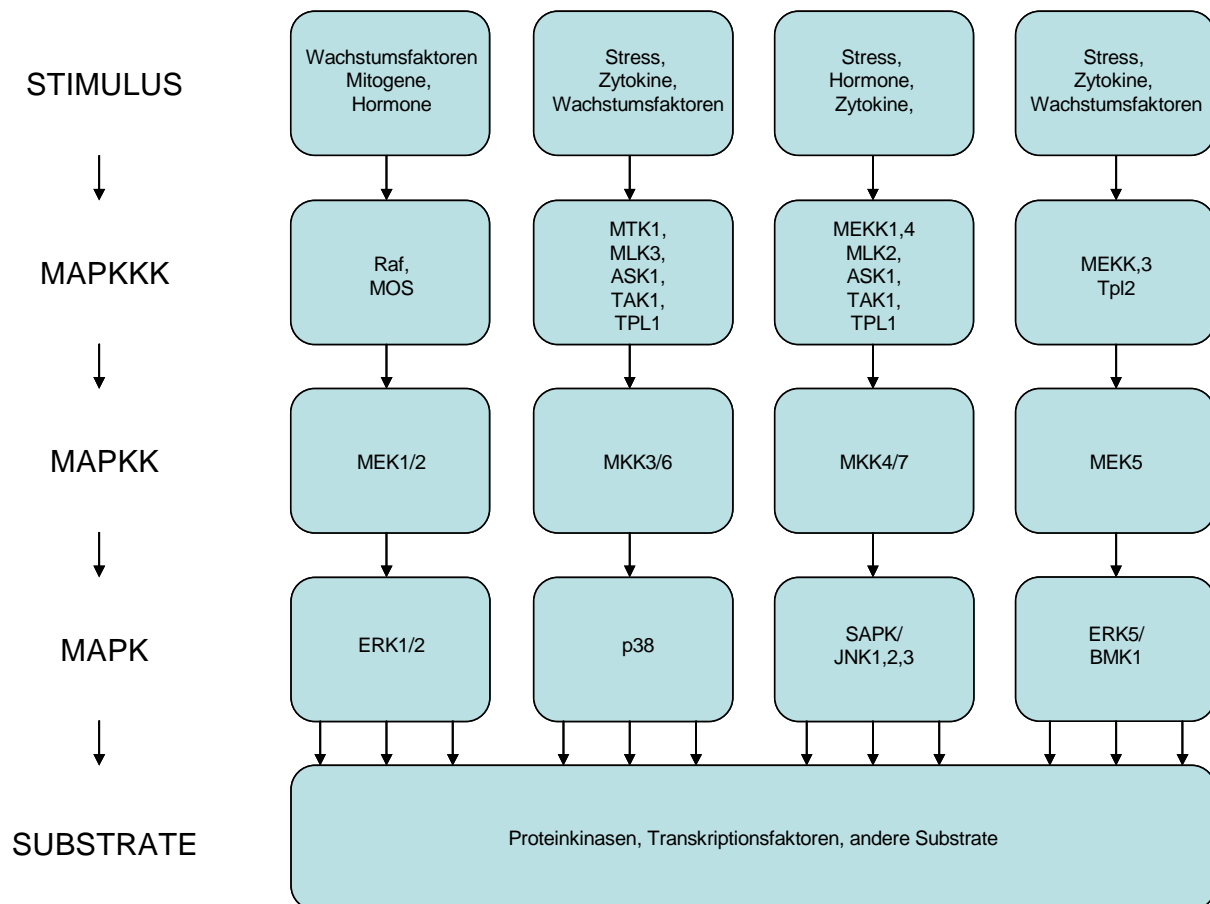


Abbildung 5-1: Mitogen-Aktivierte Proteinkinase Kaskaden. Die MAPK-Signalkaskaden setzen sich aus aktivierenden Proteinkinasen, die als Mitogen Aktivierten Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), Mitogen Aktivierten Protein Kinase Kinase (MAPKK) und Mitogen Aktivierten Protein Kinase (MAPK) bezeichnet werden. Eine aktivierte MAPKKK phosphoryliert und aktiviert damit eine spezifische MAPKK, die dann wiederum eine spezifische MAPK aktiviert. Die vier Hauptgruppen der MAPK-Familie bilden die *extracellular signal-regulated kinase 1,2* (ERK1,2), p38, *c-jun N-terminal / stress-activated protein kinases* (JNK/SAPK) und ERK5 (BMK). Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren stellen die wichtigsten Substrate für MAP-Kinasen dar. Eine Signalkaskade resultiert in einer Regulation bestimmter Gene und ruft somit eine biologische Antwort auf einen Stimulus aus. Grafik erstellt und modifiziert nach (Dhanasekaran and Premkumar Reddy 1998; Johnson and Lapadat 2002).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivierung der MAPK transient und wird nur über die Phosphorylierung und nicht über ihre Expression reguliert. Eine Dephosphorylierung durch MAPK-Phosphatasen bringt die Kinasen in ihre inaktive Form und führt so zur Herabregulierung der Kinaseaktivität. Es gibt drei Familien der Phosphatasen, die Ser/Thr-, die Tyr- und die dualspezifischen Ser/Thr/Tyr-Phosphatasen (Tamura et al. 2002). Die MAPK-Phosphatase-2 ist hoch spezifisch nur für ERK und JNK und die Phosphatase PAC-1 weist eine Spezifität für ERK und p38 und nicht für JNK auf (Chu et al. 1996). Auf der anderen Seite wurde demonstriert, dass MAPK-Phosphatase-1 und -4 ERK, JNK und p38 dephosphorylieren können (Chu et al. 1996; Muda et al. 1997). Während die dualspezifische MAPK-Phosphatase-3 für ERK1 und ERK2, nicht aber für JNK und p38 spezifisch ist (Groom et al. 1996; Muda et al. 1996), dephosphoryliert die Phosphatase MAPK-Phosphatase-5 nur die JNK und p38 (Muda et al. 1996; Tanoue et al. 1999; Theodosiou et al. 1999). Wip1 ist eine

Proteinphosphatase, die durch eine spezifische Dephosphorylierung am Threonin alle vier Isoformen von p38 inaktivieren kann (Bulavin et al. 2004).

Bei der Dephosphorylierung und Inaktivierung der MAPKs in eukaryontischen Zellen spielen die dualspezifischen Proteinphosphatasen eine besondere Rolle (CAMPS et al. 2000; Keyse 2000). Bis jetzt wurden in Säugerzellen zehn dualspezifischen Phosphatasen isoliert und charakterisiert (Christie et al. 2005). Aufgrund der Homologie der Aminosäuresequenz, der Substratspezifität und der zellulären Lokalisation können diese Enzyme in drei Familien unterteilt werden (CAMPS et al. 2000; Keyse 2000). Eine der Familien beinhaltet induzierbare, nukleäre MAPK-Phosphatasen, wie DUSP1/MKP-1/CL-100, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP-2 und DUSP5/hVH-3. Zu der anderen Familie gehören DUSP8/hVH-5, DUSP10/MKP-5 und DUSP16/MKP-7, welche vorwiegend JNK und p38 dephosphorylieren. Die dritte Gruppe besteht aus cytoplasmatischen Phosphatasen, wie DUSP6/MKP-3/Pyst1, DUSP7/MKP-X/Pyst2 und DUSP9/MKP-4/Pyst3, welche vorwiegend ERK1/2 inaktivieren (Christie et al. 2005). In den letzten Jahren wurden Hinweise bezüglich der Regulation, der katalytischen Mechanismen und der Substratspezifität mancher MAPK-Phosphatasen publiziert. Bei der selektiven Dephosphorylierung der ERK1/2 durch DUSP6/MKP-3 bilden beispielsweise die beiden Enzyme einen stabilen Komplex, welcher auf ein konserviertes Motiv in der Amino' nicht-katalytischen Domäne der Phosphatase zurückzuführen ist (Groom et al. 1996; Muda et al. 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von MAPKs an DUSP6/MKP-3 ihre katalytische Aktivierung hervorruft (Camps et al. 1998; Fjeld et al. 2000; Stewart et al. 1999). Auch andere MAPK-Phosphatasen, wie DUSP7/MKP-X/Pyst2, DUSP9/MKP-4/Pyst3, DUSP1/MKP-1/CL-100 und DUSP4/MKP-2 werden nach der Bindung ihrer Substrate katalytisch aktiv, was eventuell einen generellen Mechanismus bei der Regulation der Substratspezifität der MAPK-Phosphatasen andeutet (Camps et al. 1998; Chen et al. 2001; Dickinson et al. 2002; Dowd et al. 1998; Slack et al. 2001).

Eine wichtige Komponente der Regulation der Signaltransduktion ist die Bildung von Komplexen zwischen den Proteinkinasen und anderen Molekülen des Signalweges oder mit Ankerproteinen und *Scaffold*-Proteinen. Durch Ankerproteine wird eine Lokalisation der Bindungspartner an spezifischen zellulären Kompartimenten bzw. spezifischen Substraten gewährleistet, während *Scaffold*-Proteine in der Lage sind, aus verschiedenen Signalmolekülen Multienzymkomplexe zu bilden (Whitmarsh and Davis 1998). Eine Signalweiterleitung ist in diesen Multienzymkomplexen schneller und effizienter. Auf der anderen Seite werden dadurch Kreuzreaktionen mit anderen Signalwegen verhindert. MP1 wurde als ein *Scaffold*-Protein der ERK1 und MEK1 beschrieben, das jedoch nicht an ERK2 und MEK2 bindet (Schaeffer et al.

1998). Für die JNK-Signalkaskade ist JIP1 als *Scaffold*-Protein bekannt, das spezifisch an JNK1 und MKK7 bindet (Whitmarsh and Davis 1998). Manche Kinasen besitzen keine katalytische Aktivität, da ihnen einer der hochkonservierten katalytischen Reste fehlt (Manning et al. 2002a; Manning et al. 2002b). Es wird postuliert, dass diese Kinasen u. a. die Funktion der *Scaffold*-Proteine übernehmen (Caenepeel et al. 2004). Die Signalkaskaden der Proteinkinasen sind keine starren Module. Vielmehr können verschiedene Subtypen der Proteinkinasen zu unterschiedlichen Modulen rekrutiert werden. Bestimmte Kinasen nehmen an verschiedenen Signalwegen teil und sind so an vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Generell sind die ERK1/2-Module in Zellteilung, Migration und Zellüberleben involviert, während JNK-Signalwege Apoptose, Inflammation und Tumorgenese beeinflussen (Cowan and Storey 2003). Die Substrate der MAPK sind unterschiedlich und umfassen cytoplasmatische und nukleäre Proteine. Die meistbeschriebene Funktion der MAPK ist eine Regulation der Genexpression durch eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Typisch für die durch MAPK regulierten Transkriptionsfaktoren ist, dass sie als Dimere vorliegen bzw. durch die Aktivierung dimerisieren (English et al. 1999). Substrate des ERK1/2-Signalweges sind z. B. andere Enzyme, wie MAPKAP-K1, Phospholipase A₂; Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1, Ets-1, Sap1a, m-Myc; STAT-Proteine, wie Stat3; Adapterproteine, wie Sos und Wachstumsfaktorrezeptoren, wie EGF (Denhardt 1996). JNK wurde zunächst beschrieben als der Hauptaktivator von c-Jun, das zu einer Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors führt (Shaulian and Karin 2002). Inzwischen wurde über andere Transkriptionsfaktoren, die durch JNK reguliert werden, berichtet. Dazu gehören ATF-2, Elk-1, Myc, Smad3, p53, NFAT4, DPC4 und MADD (Atfi et al. 1997; Zhang et al. 1998).

5.2 p-38-MAP Kinase

Die p38-MAP Kinase (p38) bildet eine der vier Hauptgruppen der MAPK. Die p38 MAPK-Signalkaskade wird durch Stress und Zytokine aktiviert, was zu einer Phosphorylierung der zentralen p38-Kinase führt. Es sind vier Isoformen der p38-Kinase bekannt. Zunächst wurde p38 (p38 α) als ein 38-kDa-Protein isoliert, das unmittelbar nach einer LPS-Stimulation am Tyrosin phosphoryliert wird (Han et al. 1993). Parallel wurde p38 als eine aktivierende Kinase für MK2 in mit IL-1 oder Arsenit stimulierten Zellen identifiziert (Freshney et al. 1994; Rouse et al. 1994). Inzwischen wurden drei weitere Isoformen p38 β (Jiang et al. 1996), p38 γ (Cuenda and Dorow 1998; Lechner et al. 1996; Li et al. 1996) und p38 δ (Jiang et al. 1997; Kumar et al. 1997) kloniert. Die Aminosäuresequenzen der vier Isoformen weisen eine 60%ige Identität auf (Zarubin and Han 2005). Auf der anderen Seite weisen die Sequenzen nur eine 40-45%ige

Identität zu anderen MAPK auf (Ono and Han 2000; Zarubin and Han 2005). Während p38 α und p38 β ubiquitär exprimiert werden (Jiang et al. 1996), sind p38 δ und p38 γ unterschiedlich in verschiedenen Geweben exprimiert. p38 γ wird hauptsächlich im Skelettmuskel (Lechner et al. 1996; Li et al. 1996) und p38 δ in Lunge, Nieren, Hoden, Pankreas und im Dünndarm exprimiert (Kumar et al. 1997). Die Expression der p38-Isoformen ändert sich auch in Abhängigkeit von der Differenzierung und im Laufe der Entwicklung. Es wurde berichtet, dass p38 γ während der Muskeldifferenzierung induziert wird und dass die p38 δ -Expression vom Entwicklungsstadium der Mausembryos oder der adulten Mäusen abhängig ist (Hu et al. 1999; Lechner et al. 1996). Zwei der Isoformen, p38 α und p38 β , wurden als Zielmoleküle der *Cytokine-Suppressive-Anti-Inflammatory-Drug* (CSAD) beschrieben (Lee et al. 1994). Es handelt sich um eine Reihe von Pyridinyl-Imidazolverbindungen, die spezifisch diese Isoformen durch eine kompetitive Bindung an der ATP-Bindungsstelle inhibieren. Durch Einsatz dieser Verbindungen, wie SB203580 und SB202190, wurde die weitere Charakterisierung der Rolle von p38 erleichtert. Diese Substanzen zeigen besonders in niedrigen Konzentrationen eine hohe Spezifität für p38, in hohen Konzentrationen werden jedoch auch andere Kinasen, wie RICK (Argast et al. 2005), LCK, PKB α , GSK3 β , c-Raf und JNK2 β 1 inhibiert (de Laszlo et al. 1998). Es wird vermutet, dass die Spezifität dieser Verbindungen zu p38 α und p38 β durch die der ATP-Bindungsstelle benachbarten Aminosäuren vermittelt wird, die mit den Inhibitoren interagieren (Gum and Young 1999; Lisnock et al. 1998; Tong et al. 1997).

Wie alle MAPK wird p38 durch eine duale Phosphorylierung aktiviert. MKK3 und MKK6 sind die wichtigsten Aktivatoren der p38-Kinase (Shi and Gaestel 2002). MKK3 und MKK6 weisen eine 80%ige Identität in der Aminosäuresequenz auf, unterscheiden sich jedoch in der Spezifität zu den p38-Isoformen. Während MKK6 alle vier Isoformen aktiviert, kann MKK3 p38 β nicht phosphorylieren (Dhanasekaran and Premkumar Reddy 1998). Die Substrate der p38-Kinase umfassen andere Kinasen, Transkriptionsfaktoren und andere Proteine. MAPKAPK2 (MK2) wurde als erstes p38-Substrat beschrieben. Es wurde *in vitro* eine Aktivierung von MK2 durch p38 α gezeigt. Parallel konnte *in vivo* eine Inhibierung der MK2-Aktivierung durch SB203580 beobachtet werden (Freshney et al. 1994; Rouse et al. 1994). Eine weitere durch p38 aktivierbare Kinase ist die MAPKAPK3 (MK3), die eine 70%ige Identität in der Aminosäuresequenz mit MK2 aufweist. Beide enthalten eine prolinreiche Domäne, haben die gleichen regulatorischen Phosphorylierungsstellen und einen ähnlichen C-

Terminus. Die Aktivierung der MK3 kann ebenfalls durch SB203580 inhibiert werden (Kumar et al. 1997; McLaughlin et al. 1996).

Andere Kinasen, die durch p38 aktiviert werden, sind *MAPK-Interacting Protein Kinase 1* (MNK1), *Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase-1* und *-2* (MSK1, MSK2) und Caseinkinase 2 (CK2) (Shi and Gaestel 2002). p38 ist auch in der Lage verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie *Monocyte Enhancer Factors 2C* und *2A* (MEF 2C, MEF2A) (Zhao et al. 1999), *Ternary Complex Factor SAP1* (Janknecht and Hunter 1997), p53 (Huang et al. 1999) und *Signal Transducer and Activator of Transkription 1* (STAT1) (Kovarik et al. 1999) direkt zu phosphorylieren.

In anderen Eukaryonten wurden Homologe von p38 identifiziert und kloniert. Beispielweise sind das Hog1 in *Saccharomyces cerevisiae* (Brewster et al. 1993) und Spc1/Sty1 in *Schizosaccharomyces pombe* (Shiozaki and Russell 1995), welche in die Verarbeitung der extrazellulären Stresstimuli, wie durch Zitronensäure (Lawrence et al. 2004), in der Osmoregulation und in die Regulation des Zellzyklus involviert sind. In Säugertieren wird p38 durch eine Reihe von Umwelteinflüssen aktiviert. Eine besondere Rolle spielt p38 α im Immunsystem bei der Inflammation (Han et al. 1994). Eine p38 α -Aktivierung wurde in LPS-stimulierten Makrophagen (Han et al. 1994), in TNF-stimulierten Endothelzellen (Pietersma et al. 1997), in IL-17-stimulierten Chondrocyten (Shalom-Barak et al. 1998), in der mit IL-18-stimulierten Monocyten-Zelllinie U1 (Shapiro et al. 1998) und in PMA-stimulierten humanen Neutrophilen beobachtet (Krump et al. 1997). Die Bedeutung von p38 wurde in verschiedenen *in vivo* Tiermodellen gezeigt. So konnte eine p38-Inhibierung durch SB203580 die Sterblichkeit von mit Endotoxinen behandelten Mäuse senken (Badger et al. 1996). Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF), Erythropoetin, Nervenwachstumsfaktor (NGF), Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF), Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) sind in der Lage p38 α in verschiedenen Zelltypen zu aktivieren (Ono and Han 2000). Auch andere Stimuli, wie transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF)- β , vasoaktive Peptide, Hitzeschock und Ischämie können p38 α aktivieren (Ono and Han 2000).

Der p38-Signalweg ist in die Regulation der Transkription und der posttranskriptionellen Genexpression involviert. Nach einer Stimulation mit UV oder mit Anisomycin (Hazzalin et al. 1997) oder nach einer Virusinfektion (Huttunen et al. 1998) reguliert p38 die Expression von

Genen, wie *c-fos*, *fosB*, *c-jun* und *junD*. Eine Inhibierung von p38 blockiert die Translation von TNF α und IL-6 (Lee et al. 1994). Die mRNAs, deren Translation bzw. Stabilität durch p38 beeinflusst ist, beinhalten in der 3' nichttranslatierten Region (UTR) einen oder mehrere Adenosin- und Uridin-reiche Elemente (ARE). Dazu gehören u.a. TNF, Cyclooxygenase 2, Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), IL-3, IL-6 und IL-8 (Shi and Gaestel 2002). Es gibt Hinweise, dass MK2 und ihre Substrate, das kleine Hitzeschockprotein (Hsp27) oder das mRNA-bindende Protein Tristetraprolin (TTP) in die Prozesse involviert sind, die mRNA-Stabilität regulieren (Carballo et al. 2001; Lasa et al. 2000).

Apoptose ist eine der Antworten der Zellen auf Stress und es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass die p38-Signalkaskade an der Regulation dieses Prozesses beteiligt ist. Es besteht eine Korrelation zwischen der p38-Aktivierung und dem durch NGF induzierten Zelltod in PC12-Zellen (Kummer et al. 1997) oder dem Fas-vermittelten Zelltod in Jurkat-Zellen (Juo et al. 1997). Die Rolle von p38 in der Apoptose ist vom Zelltyp und vom Stimulus abhängig (Nebreda and Porras 2000). p38 wurde auch als eine anti-apoptotische MAP Kinase in Kardiomyocyten, DNA-beschädigten Fibroblasten, Endothelialzellen nach einer Sauerstoffunterversorgung, differenzierenden Neuronen, und aktivierten Makrophagen beschrieben (Porras et al. 2004). Auf der anderen Seite ist p38 in der Lage das apoptotische Zellsterben in Neuronen (De Zutter and Davis 2001) und in Kardiozyten (SAURIN et al. 2000) zu vermitteln. Eine proapoptotische Rolle von p38 wurde in anderen Zelltypen nach einer Stimulation mit TNF α (Valladares et al. 2000), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) (Edlund et al. 2003) oder oxidativem Stress beschrieben (Zhuang et al. 2000). p38 kann auf unterschiedliche Weise die Apoptose beeinflussen. Eine zentrale Rolle in der Apoptose nehmen die Cysteinproteasen, die sogenannten Caspasen ein. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression einer dominant aktiven MKK6b eine Caspaseaktivität und somit den Zelltod induziert (Huang et al. 1997). In den Gedächtnis-B-Lymphozyten wurde gezeigt, dass ein Entzug von *nerve growth factor* (NGF) aus dem Kulturmedium zu einer Phosphorylierung von p38 und ihrer Translokation zu den Mitochondrien führte. Gleichzeitig wurde das Bcl-2 phosphoryliert, was die Freisetzung des Cytochroms C aus Mitochondrien stimulierte und somit die Apoptose initiierte. Bei einer Behandlung dieser Zellen mit exogenem NGF wurde p38 nicht aktiviert, wodurch Bcl-2 nicht phosphoryliert und das Cytochrom C nicht freigesetzt wurde (Torcia et al. 2001).

Auch die Regulation und die Modifikation des Cytoskeletts und die Zellmigration wird von der p38 beeinflusst (Hedges et al. 1999). Dies wird durch MK2 und ihr Substrat, das kleine

Hitzeschockprotein Hsp 25/27, vermittelt, das in die Aktinpolymerisation involviert ist (Benndorf et al. 1994; Lavoie et al. 1993). Die nicht-phosphorylierte Form von Hsp25/27 konnte *in vitro* an das *Barbed-End* von Aktinfilamenten binden und somit die Aktinpolymerisierung inhibieren (Benndorf et al. 1994). Rekombinantes, von MK2 phosphoryliertes Hsp27 erhöhte die Aktinpolymerisation (Butt et al. 2001).

Die Rolle von p38 α in der Embryogenese scheint essentiell zu sein. Ein gezieltes Ausschalten des Genes ist für das Embryo letal (Allen et al. 2000), da die Entwicklung der Plazenta gestört ist (Adams et al. 2000). Die Defekte der Plazenta sind auf gestörte Angiogenese zurückzuführen und manifestieren sich am Tag E10.5 nach der Befruchtung. Die Ausbildung der Labyrinthischicht der Plazenta wird nahezu komplett unterbunden und die Bildung der Spongiotrophoblasten ist signifikant reduziert. Diese Fehlbildungen werden auf das Unterbleiben der Vaskularisation und auf die erhöhte Rate der Apoptose zurückgeführt (Mudgett et al. 2000). Mudgett und Kollegen beschrieben dass, die abnormale Angiogenese nicht nur auf die Plazenta beschränkt ist, sondern auch im Embryo beobachtet wird (Mudgett et al. 2000). Durch eine Aggregation von tetraploiden (p38 α +/+) und diploiden (p38 α -/-) Embryos in dem *Morula*-Stadium konnten die Defekte in der Plazenta rückgängig gemacht werden und die p38 α -/- Embryos entwickelten sich dann normal, was darauf hinweist, dass p38 α eine Rolle bei der Organogenese der Plazenta und nicht des Embryos spielte (Adams et al. 2000). Eine *in vitro* Behandlung von Embryos im zwei Zellen Stadium mit spezifischen p38-Inhibitoren, wie SB220025 und SB203580 stoppte die Embryonalentwicklung bereits im Stadium von acht bis 16 Zellen (Natale et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass der spezifische Inhibitor von p38 SB203580 selektiv die Umhüllung der Endothelzellen durch glatte Muskelzellen und Perizyten im heranreifenden neuen Gefäß hemmt. Somit entstehen defekte Endothelgefäße (Zhu et al. 2003). Durch eine Überexpression mit MKK6, einem p38-Aktivator, konnte die Zahl der umhüllenden Zellen erhöht werden (Zhu et al. 2003). Das Wachstum und die Ausbreitung der mit Angiopoetin-1 stimulierten Endothelzellen wurden durch SB203580 nicht beeinflusst (Zhu et al. 2003).

Durch Generierung von p38 α *knockout* Mäuse wurden neben den bereits beschriebenen Defekten in der Embryogenese auch Veränderungen in der Erythropoese beschrieben. Tamura und Kollegen zeigten, dass manche der p38 α -/- Embryos den Tag E11,5 bis E12,5 überlebten, sich weiter entwickelten und ihre Morphologie unauffällig war. Aufgrund von Defekten in der Erythropoese, die auf verringerte Expression von Erythropoetin (Epo) zurückzuführen sind,

wiesen sie jedoch Anämien auf (Tamura et al. 2000). Es wurde suggeriert, dass p38 die Regulation von Erythropoetin auf der posttranskriptionellen Ebene, insbesondere durch die Regulation der mRNA-Stabilität, stattfindet.

5.3 MAPKAP Kinase 2 (MK2)

Die MK2 wurde als erstes Substrat für p38 beschrieben (Freshney et al. 1994; Rouse et al. 1994). Das Protein besteht aus einem N-terminalen Prolin-reichen Motiv (Engel et al. 1993; Stokoe et al. 1993; Zu et al. 1994), einer katalytischen Domäne und einem C-terminalen regulatorischen Bereich. Innerhalb der katalytischen Domäne existieren eine regulatorische Phosphorylierungsstelle in der Aktivierungsschleife (T222 in MK2 des Menschen) (Ben-Levy et al. 1995; Engel et al. 1995) und eine zweite nah benachbarte regulatorische Phosphorylierungsstelle in der Subdomäne (T272) (Ben-Levy et al. 1995). Der C-Terminus der MK2 enthält eine dritte regulatorische Phosphorylierungsstelle (T334 in MK2 des Menschen) (Ben-Levy et al. 1995; Stokoe et al. 1992a), ein Kernlokalisierungssignal (Engel et al. 1993; Stokoe et al. 1993), ein Kernexportsignal (Ben-Levy et al. 1998; Engel et al. 1998) und ein autoinhibitorisches Motiv (Ben-Levy et al. 1995; Zu et al. 1994). Eine Phosphorylierung am C-terminalen T334 führt zu einer Konformationsänderung, wodurch das autoinhibitorische Element inaktiviert und das Kernexportsignal aktiviert wird. Daraus resultiert eine Aktivierung und Translokation der MK2 vom Nukleus ins Cytoplasma (Ben-Levy et al. 1998; Engel et al. 1998; Neininger et al. 2001). Es wurde beschrieben, dass nach einer Stressestimulation p38 α an den C-Terminus von MK2 im Zellkern zum Teil binden kann und dadurch zusammen mit MK2 aus dem Kern co-exportiert wird (Ben-Levy et al. 1998; Engel et al. 1998; Neininger et al. 2001). Es wurden zwei verschiedene humane und murine Isoformen der MK2 detektiert, welche unterschiedlich im Gel laufen und deren Banden etwa dieselbe Stärke aufweisen. Da in den MK2^{-/-} Mäusen beide Isoformen fehlen, handelt es sich entweder um zwei verschiedene Splicing-Varianten oder sie entstehen durch posttranslationelle Modifikation des Proteins. In Menschen wurden zwei verschiedene cDNAs für MK2 isoliert, welche für Proteine mit unterschiedlichen C-Termini (MK2-CT1 und MK2-CT2) kodieren. Das Translationsprodukt dieser cDNA weist eine unterschiedliche Affinität zu p38 (Kotlyarov et al. 2002) und ein unterschiedliches Translokationsverhalten auf.

MK2-defizienten Mäuse entwickeln sich normal, sind fertil und zeigen keine morphologischen Veränderungen (Kotlyarov et al. 1999). Die Tiere weisen eine erhöhte Resistenz gegen endotoxischen Schock auf, was auf eine Reduktion von TNF α zurückzuführen sein könnte

(Kotlyarov et al. 1999). In MK2-defizienten Makrophagen und Milzzellen wurde die Rolle dieses Enzyms in der Biosynthese von Zytokinen, wie TNF α , IL-6, INF γ , IL-1 β und IL-10, gezeigt. In den mit LPS-stimulierten Zellen ist die Proteinmenge dieser Zytokine signifikant erniedrigt (Kotlyarov et al. 1999). Während die Expression von TNF α in den stimulierten Zellen auf 10 % der WT-Zellen gesenkt war, wurde keine deutliche Reduktion von TNF α -mRNA beobachtet. Das spricht für eine post-transkriptionelle Regulation auf der Ebene Translation durch MK2. Die mRNA von TNF α enthält in der 3'-untranslatierten Region Adenosin- und Uridin-reiche Elemente (ARE), die in die Kontrolle der Translation involviert sind indem sie die Deadenylierung der mRNA und ihre Degradierung durch Exosomen stimulieren. In Makrophagen von MK2- und TNF α -ARE-defizienten Mäusen war die TNF α -Menge nach LPS-Stimulation im Vergleich zu WT-Mäusen nicht verändert (Neininger et al. 2002). Die Synthese von TNF α wird, abhängig von den ARE-Elementen, auf der post-transkriptionellen Ebene reguliert, indem die Translation inhibiert ist. Auch die Expression anderer Zytokine wie, IL-1, IL-6 oder INF γ , wird auf der post-transkriptionellen Ebene reguliert. Da jedoch nach einer LPS-Stimulation sowohl die Protein- als auch die mRNA-Menge dieser Zytokine gesenkt war, ist ihre defekte Expression auf eine herabgesetzte mRNA-Stabilität zurückzuführen (Kotlyarov et al. 1999).

Nach einer Stresstimulation bilden p38 und MK2 einen Komplex und wandern ins Cytoplasma (Ben-Levy et al. 1998; Engel et al. 1998). In MK2-defizienten Zellen ist die p38-Menge signifikant verringert, was für eine p38-stabilisierende Rolle von MK2 spricht (Kotlyarov et al. 2002). Ein MK2-*knockout* ist somit ein partieller p38-*knockout*. Um auszuschließen, dass der beobachtete Phänotyp der MK2-defizienten Zellen, wie die gesenkte TNF α -Produktion, auf die Reduktion von p38 zurückzuführen ist, wurden verschiedene MK2-Mutanten in die Zellen zurückgebracht. Diese konnten entweder p38 stabilisieren und ins Cytoplasma exportieren, zeigten aber keine katalytische Aktivität, oder sie konnten p38 nicht stabilisieren und nicht ins Cytosol exportieren, zeigten jedoch eine katalytische Aktivität. Dadurch wurde gezeigt, dass MK2 über den C-Terminus p38 stabilisiert und diese Stabilisierung von der katalytischen Aktivität der MK2 unabhängig ist. Eine Stabilisierung von p38 durch eine katalytisch inaktive MK2 zeigte keinen Einfluß auf die TNF α -Produktion. Es wurde demonstriert, dass die katalytische Aktivität von MK2 für die TNF α -Produktion essentiell ist. Das weist darauf hin, dass die Defekte in der TNF α -Produktion in den MK2-defizienten Zellen in erster Linie auf das Fehlen der MK2 und nicht der p38 zurückzuführen sind. Eins der cytoplasmatischen Substrate für MK2 ist das kleine Hitzeschockprotein

Hsp25/27 (Guay et al. 1997; Hannigan et al. 2001; Hedges et al. 1999; Stokoe et al. 1992b). Das nicht phosphorylierte Hsp25/27 bindet an die *Barbed*-Aktinenden und inhibiert ihre Polymerisierung. Eine Phosphorylierung von Hsp25/27 blockiert diese Inhibierung und lässt somit die Aktinpolymerisierung zu (Benndorf et al. 1994; Gerthoffer and Gunst 2001). Die Polymerisierung und die Modellierung von Aktin spielt eine große Rolle bei der Bildung von Membranausstülpungen wie Lamellipodien und Fillopodien, welche die gezielte Bewegung der Zellen vorantreiben (Gerthoffer and Gunst 2001). In MK2-defizienten Makrophagen wurde gezeigt, dass die Bildung der Filopodien nach einer Stimulation mit PDGF, TNF oder VEGF verglichen mit WT signifikant gesenkt ist (Kotlyarov et al. 2002). Auch die Migration der immortalisierten Fibroblasten und primären glatten Muskelzellen durch eine mit Fibronectin beschichtete Membran war in einem Stimulusgradienten von PDGF oder IL-1 signifikant gesenkt. Durch den Einsatz von MK2-Mutanten wurde gezeigt, dass sowohl die N-terminale Prolin-reiche als auch die katalytische Domäne für eine effektive Regulation der Migration notwendig sind (Kotlyarov and Gaestel 2002).

Die Aktivität der endogenen p38 korreliert mit einer Metastasenbildung bei Brusttumoren und der Invasion der Tumorzellen in die extrazelluläre Matrix (Huang et al. 2000). Eine Behandlung der Brusttumorzelllinie BT549 mit dem p38-Inhibitor SB 203580 führte zu einer verringerten mRNA- und Protein-Menge von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und seinem Rezeptor (uPAR) und nahm diesen Zellen die Fähigkeit zu migrieren (Huang et al. 2000). Urokinase Plasminogen Aktivator ist eine Serinprotease, die von Zellen sezerniert wird und dort nach einer Bindung an ihren Rezeptor (uPAR) spezifisch die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin katalysiert. Plasmin ist eine Serinprotease mit einer breiten Spezifität, die u.a. für die Degradation der extrazellulären Matrix und für die Aktivierung weiterer Proteasen, wie Matrixmetalloproteasen (MMP) zuständig ist (Pepper 2001). Diese Prozesse spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, der Angiogenese, der Tumormetastasierung und in der embryonalen Entwicklung. Eine erhöhte uPA Expression wurde in Brust-, Prostata- und Darmtumoren bei Menschen beobachtet (Chen et al. 2001). Eine Überexpression der Zellen mit MKK3 und MKK6, die p38 aktivieren können, erhöhte die uPA-Expression. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass eine dominant negative Mutante von MK2 die uPA-Expression senken, die uPA-mRNA destabilisieren (Han et al. 2002) und die Migration der mit VEGF-stimulierte Endothelzellen inhibieren konnte (Yu et al. 2004). Dominant negative Mutanten von MKK6, p38 β , p38 δ und MK3 zeigten keinen Einfluss auf das migratorische Verhalten der Endothelzellen (Yu et al. 2004). Auch die Protein-Menge von uPA konnte durch

Überexpression mit dominant negativen Mutanten von MKK3, p38 α , p38 γ und MK2 signifikant gesenkt werden. Dies deutet auf eine Korrelation zwischen der Zellmigration und der Expression von uPA, die durch den MKK3-p38 α/γ -MK2-Signalweg reguliert werden. Die bekannten Aktivatoren von uPA sind Wachstumsfaktoren, wie FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor*) (Miralles et al. 1998b; Witowsky et al. 2003), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Yu et al. 2004), Integrine, wie Vitronectin (Chen et al. 2001), Serum (Miralles et al. 1998b), PMA (Shetty and Idell 2000), Hormone und Zytokine (Pepper 2001). UV-Licht wird als uPA-Stimulus diskutiert. UV führt in der Regel zu DNA-Schädigungen, welche verschiedene Hauttumore hervorrufen können. Gleichzeitig werden die Gene transkribiert, deren Produkte eine schützende Funktion nach der UV-Stimulation ausüben, was allgemein als UV-Antwort bezeichnet wird. UV-Signale können drei Gruppen der MAP-Kinasen aktivieren, die ERK1/2, JNK und p38 (Miralles et al. 1998a). uPA wurde als eins der ersten Proteine beschrieben, welches in humanen *Xeroderma Pigmentosum*-Zellen durch UV induzierbar war (Miskin and Ben-Ishai 1981). Miralles und Kollegen beschrieben, dass UV-C die Expression von uPA mRNA in NIH 3T3 murinen Fibroblasten stimulieren kann und dass dieser Prozess von JNK und nicht von ERK oder von p38 abhängig ist (Miralles et al. 1998a).

Die mRNAs von uPA und uPAR enthalten in der 3'untranslatierten Region ARE, die für die Instabilität dieser mRNAs verantwortlich sind. Es wurde gezeigt, dass der mRNA-stabilisierende Faktor HuR die mRNAs von uPA und uPAR stabilisieren kann (Tran et al. 2003). In Tumorzelllinien, die eine erhöhte endogene Expression von uPA aufweisen, wurde HuR mittels RNAi-Technik ausgeschaltet. Dies führte zu einer signifikanten Senkung von uPA- und uPAR-mRNA. Gleichzeitig gibt es Hinweise dafür, dass MK2 bei der Akkumulation von HuR im Cytoplasma involviert ist und dadurch die Expression von uPA und uPAR beeinflussen kann (Tran et al. 2003).

Es wurde eine MK2 ähnliche Kinase, genannt 3pK (Sithanandam et al. 1996) bzw. MK3 (McLaughlin et al. 1996), beschrieben. MK2 und MK3 weisen in der Aminosäuresequenz eine 70%ige Identität auf und die Proteinstruktur beider Proteine ist ähnlich, MK3 hat ein N-terminales Prolin-reiches Motiv, die gleichen Phosphorylierungsstellen und einen ähnlichen C-Terminus. Nach einer Stresstimulation wandert MK3 ins Cytoplasma. Auch die Aktivatoren und die Substrate von MK3 und von MK2 unterschieden sich nicht signifikant (Clifton et al. 1996). Durch den spezifischen p38-Inhibitor, SB203580, konnte die MK3-Aktivierung blockiert werden (Clifton et al. 1996; Kumar et al. 1997; McLaughlin et al. 1996).

5.4 MAPKAP Kinase 5 (MK5)

Die Mitogen aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase 5 (MK5) wurde zunächst als eine p38-regulierte/aktivierte Proteinkinase (PRAK) beschrieben (New et al. 1998). Es ist eine Serin/Threonin Kinase, die in der Nukleotidsequenz eine etwa 40%ige Identität zu MK2 und MK3 aufweist und in unstimulierten Zellen im Zellkern lokalisiert ist. Das Protein enthält eine Kinasedomäne und einen Kernlokalisierungssignal. Während MK2 und MK3 Phosphorylierungsstellen in der Region zwischen der katalytischen Domäne und dem C-Terminus beinhalten, fehlen diese in MK5. New und Kollegen (New et al. 1998) beschrieben, dass p38 α und p38 β nach einer Stress- und Zytokinstimulation MK5 phosphorylieren, was als Folge zu einer Phosphorylierung von Hsp25/27 *in vivo* führt. Parallel wurde gezeigt, dass MK5 *in vitro* ein Substrat für ERK und p38 ist (Ni et al. 1998).

Durch eine homologe Rekombination wurde die MK5 in Mäusen deletiert (Shi et al. 2003). Die Mäuse entwickeln sich normal, sind fertil und zeigen keine Veränderungen in der Gewebemorphologie. Es wurde allerdings beobachtet, dass die embryonale Letalität bis zum Tag E11 erhöht ist und die MK5-defizienten Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen nach der Geburt etwas kleiner sind. Die MK5-defizienten Mäuse zeigen im Gegensatz zu den MK2-defizienten Mäusen keine erhöhte Resistenz gegenüber einem endotoxischen Schock, da ihre Zytokinproduktion nach einer LPS-Stimulation nicht gesenkt ist. Außerdem wurde gezeigt, dass das endogene MK5 das Hsp25/27 *in vivo* und *in vitro* nicht phosphorylieren konnte (Shi et al. 2003).

2004 wurde in einem *two-hybrid assay* nur eine schwache Interaktion zwischen MK5 und p38 und eine ca. zehnfach stärkere Interaktion zwischen MK5 und ERK3 gezeigt (Schumacher et al. 2004). ERK3 ist, im Vergleich mit anderen ERKs, eine untypische Kinase, da sie kein Threonin- und Tyrosinrest in der Aktivierungsschleife besitzt und durch Proteinstabilität und/oder Autophosphorylierung reguliert wird. Eine Interaktion zwischen MK5 und ERK3 konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Eine Überexpression von ERK3 in Zellen führt zu einer Translokation von MK5 vom Zellkern ins Cytoplasma, zu einer Aktivierung der MK5 und zur Phosphorylierung von MK5 und ERK3. Die Aktivierung von MK5 ist von der enzymatischen Aktivität von ERK3 unabhängig, hängt jedoch von der eigenen katalytischen Aktivität und dem C-Terminus der ERK3 ab. Das Fehlen der MK5 führt zu einer signifikanten Reduktion von ERK3-Protein. Eine Deletion der MK5 führt zu einer signifikanten Reduktion von ERK3 und zu einer erhöhten Lethalität vor dem Tag E11. In der gleichen Zeit erreicht die ERK3-Expression in den WT-Mäusen ihr Maximum. Es wird

postuliert, dass ERK3 als *Scaffold*-Protein die MK5 während der Embryonalentwicklung der Maus reguliert (Schumacher et al. 2004).

5.5 ARE-enthaltende mRNAs und ARE-Bindungsproteine, Tristetraprolin (TTP)

Eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen, Proto-Onkogenen und anderen Proteinen, die in die inflammatorische Antwort auf eine Infektion involviert sind, zeichnen sich durch sehr kurzlebige mRNAs aus und enthalten in der 3' untranslatierten Region ARE (Clark 2000; Kracht and Saklatvala 2002). Diese Sequenzabschnitte enthalten meist Pentamere mit der Reihenfolge AUUUA, die in der Sequenz verteilt sind oder sich überlappen können. Es wurden drei Klassen der AREs beschrieben. AREs der Klasse I enthalten eine bis drei Kopien von den Pentameren, die in der Sequenz verteilt sind. Klasse II zeichnet sich durch multiple Pentamere aus, die sich überlappen können und die AREs der Klasse III enthalten statt AU-reiche nur U-reiche Sequenzen (Dean et al. 2004). Die AREs kontrollieren die mRNA-Stabilität indem sie in der Regel einen schnellen Deadenylierung-abhängigen mRNA-Zerfall initiieren. Dies wird durch eine Bindung von spezifischen ARE-Bindungsproteinen an die AREs vermittelt. Während Proteine wie AUF-1, KSRP, *T-cell internal antigen 1* (TIA1), *T-cell internal antigen 1-related* (TIAR1) und Tristetraprolin (TTP) eine mRNA-Destabilisierung vermitteln, wurde HuR als ein mRNA stabilisierendes Protein beschrieben (Esclatine et al. 2004b). Tristetraprolin (TTP) ist ein Zinkfingerprotein, das an die mRNAs der Klasse II bindet. Dazu gehören die mRNAs von TNF α , GM-CSF, IL-3 und COX-2. Die TTP-deletierten *knock-out* Mäuse weisen einen starken inflammatorischen Phänotyp auf, erkrankten an Arthritis, Dermatitis, Cachexie, Hyperplasie und sterben früh. Diese Symptome sind auf eine erhöhte Synthese von TNF α zurückzuführen, da eine wöchentlich Injektion von Antikörpern gegen TNF α die TTP $^{-/-}$ Mäuse vor Arthritis und anderen Erkrankungen schützen konnte (Carrick et al. 2004). Die TNF α -mRNA ist in den TTP-defizienten Makrophagen stabiler als in den WT Makrophagen, was für eine destabilisierende Rolle von TTP im Bezug auf TNF α -mRNA spricht (Carballo et al. 1998). Eine Überexpression von TTP in HEK 293 Zellen, denen das endogene TTP fehlt, führte zu einer Deadenylierung von Reporter mRNAs, die TNF α -AREs enthielten (Lai et al. 1999). TTP kann *in vitro* die Deadenylierung von TNF α -AREs jedoch nicht von den TNF α -Mutanten initiieren. Der mRNA-Abbau ist von der Regulation der Deadenylierung nicht unbedingt abhängig. Eine Überexpression von TTP in HEK 293 Zellen führte auch zu einer

Destabilisierung von Reporter mRNA, die anstelle des Poly-(A)-Schwanzes eine Histon mRNA *Stem Loop* Struktur enthielten (Lai and Blackshear 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass die TNF α -Produktion in TTP-defizienten primären Makrophagen durch eine Inhibierung von p38 gesenkt wird (Kontoyiannis et al. 2001). Auf der anderen Seite kann eine Blockade von p38 nach einer LPS-Stimulation der makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW 264.7 die TTP-Induktion inhibieren (Mahtani et al. 2001). Eine Aktivierung des p38-Signalweges kann die Expression von TTP stimulieren und die TTP-mRNA stabilisieren, was auf die AREs in der TTP-mRNA zurückzuführen ist (Tchen et al. 2004). Interessanterweise konnte gleichzeitig demonstriert werden, dass TTP in der Lage ist, an eigene mRNAs zu binden und somit die eigene Expression negativ zu regulieren (Tchen et al. 2004).

5.6 Urokinase Plasminogen System

Zellen werden durch komplexe Netzwerke aus extrazellulären Matrixproteinen, wie z.B. Elastin oder Collagen, verbunden und bilden so Gewebe. Bei bestimmten Prozessen, wie bei der Gewebeumstrukturierung, der Wundheilung oder der Embryonalentwicklung müssen Zellen in der Lage sein, diese extrazellulären Verbindungen aufzulösen. Auch Krebszellen können diese Matrixproteine degradieren, um als Folge innerhalb des Organismus zu migrieren. Eine zentrale Rolle bei diesen Prozessen nehmen Proteasen ein (Alfano et al. 2005; Blasi and Carmeliet 2002; Duffy 2004; Ghiso et al. 1999; Kjoller 2002; Ossowski 1988; Ossowski and Aguirre-Ghiso 2000; Ossowski et al. 1979; Ossowski and Reich 1983; Pepper et al. 1987). Neben Cystein-Proteasen, wie Cathepsin B, D und L, und Matrixmetalloproteasen, wie Collagenasen spielt das Urokinase-Plasminogen-System eine wichtige Rolle.

Plasmin ist eine Serinprotease, welche in der Lage ist, unspezifisch die meisten Proteine der extrazellulären Matrix, wie z. B. Fibronectin, Laminin oder Collagen, zu degradieren (Blasi et al. 1987). Plasmin ist ein Zymogen und wird als Plasminogen produziert. Erst durch eine Spaltung zu Plasmin erlangt es seine proteolytische Aktivität. Die spezifischen Plasminogen Aktivatoren: *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) und *tissue-type plasminogen activator* (tPA) katalysieren die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Während tPA beim Auflösen von Blutgerinnsel von Bedeutung ist, spielt uPA eine Rolle bei der Degradation der Matrixproteine in verschiedenen Geweben.

uPA wird, ähnlich wie Plasmin, von den Zellen als ein inaktives Zymogen (pro-uPA) produziert, in den extrazellulären Raum sezerniert und dort von anderen Proteasen, wie

Cathepsin B und L und Plasmin, in seine aktive Form umgewandelt (Alfano et al. 2005; Blasi and Carmeliet 2002; Blasi et al. 1987; Duffy 2004; Ghiso et al. 1999; Kjoller 2002; Ossowski and Aguirre-Ghiso 2000). In der aktiven Form bindet uPA an seinen Rezeptor, den Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR), welcher in der Zellmembran lokalisiert ist. Der Rezeptor-gebundene uPA weist eine höhere proteolytische Aktivität als der ungebundene uPA auf (Blasi and Carmeliet 2002; Ghiso et al. 1999; Plow et al. 1986). Außerdem wird die uPA-abhängige Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin durch die Bindung an den Rezeptor an die Zellmembran fokussiert. Die enzymatische Aktivität von uPA wird auch von bestimmten Protein-Inhibitoren reguliert. Einer dieser Inhibitoren, der Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) bindet an den Rezeptor-gebundenen uPA, wodurch es zu einer Degradation sowohl von uPA als auch von PAI-1 kommt (Cubellis et al. 1990; Estreicher et al. 1990; Jensen et al. 1990; Olson et al. 1992).

Die Komponenten des Urokinase-Plasminogen-Systems sind im gesunden Gewebe bei physiologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung, Zellmigration oder Angiogenese von Bedeutung. Es wurde auch gezeigt, dass uPA in verschiedenen humanen Tumoren, wie z.B. Brust-, Darm-, Magen-, Nieren- oder Eierstocktumoren, vermehrt exprimiert wird und dort eine wichtige Rolle bei der Tumorausbreitung und der Metastasenbildung spielt (Duffy 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die uPA/uPAR-Komplexe auch als Rezeptor für Vitronektin fungieren können. Diese Funktion wurde in gesunden Geweben, wie bei der Migration von Monozyten, und in malignen Geweben, wie bei Tumorzellmigration und Tumorzellausbreitung beobachtet (Wei et al. 1996).

5.7 Herpesviren und HSV-1

Herpesviren wurden in mehr als 80 Wirbeltierarten beschrieben. Die Infektionssymptomatik der verschiedenen Herpesviren variiert stark. Eine taxonomische Eingrenzung wird aufgrund der Morphologie, des Aufbaus, der biologischen Eigenschaften und der Pathogenität der Viren vorgenommen. Die Familie der Herpesviridae wird in drei Unterfamilien unterteilt: α -Herpesviren, wie HSV-1, HSV-2 und Varicella-Zoster-Virus; β -Herpesviren, wie Cytomegaloviren, HHV-6, HHV-7; γ -Herpesviren, wie Epstein-Barr-Virus und Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Klapper and Cleator 1997). Die Vironen der Herpesviren haben einen Durchmesser von 170 – 200 nm und bestehen aus mehr als 30 Strukturproteinen (Grunewald et al. 2003). Das Genom der Herpesviren besteht aus einer linearen dsDNA. Die DNA ist von einem ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 125 nm umgeben und

besteht aus 162 Kapsomeren. Das ausgereifte Kapsid besteht aus fünf Proteinen: VP5, VP19C, VP23, VP24 und VP26. Daneben gibt es die Kapsid-assoziierten Proteine, wie UL6, UL15, UL16, UL17, UL25 und UL33. Die Kapside der Herpesviren sind von einer Hülle aus einer Lipiddoppelschicht umgeben, in welcher sowohl virale als auch zelluläre Proteine, meist Glycoproteine, eingelagert sind. Bei Herpes Simplex sind das bis zu zwölf virale Glykoproteine: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, gN und bis zu vier nichtglykolysierte Polypeptide. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Adsorption der Viren an die Zellrezeptoren, bei der Internalisierung und der Membranhüllung während der Virusmorphogenese (Mettenleiter 2003; Mettenleiter 2002; Roizman and Knipe 2001; Spear 2004). Auf der anderen Seite sind sie auch für eine Antikörperantwort wichtig. Zwischen dem Kapsid und der Membranhülle befindet sich das Tegument, eine weniger strukturierte Proteinmatrix von unterschiedlicher Dicke, die bis zu 20 verschiedene virale Proteine beinhaltet. Eine Besonderheit der Herpesviren unter den DNA-Viren ist, dass Tegumentproteine, wie α -TIF (VP16), Vhs, während einer Infektion in die Zelle gelangen und verschiedene regulatorische Funktionen während der frühen Phase der Replikation erfüllen (Smiley 2004).

Die lineare dsDNA, die das Genom der Herpesviren bildet, ist 120 000 – 230 000 Basenpaare lang. Bei allen Virustypen kommen einmalige (*unique*) und sich wiederholende (*repeat*) Sequenzabschnitte vor. Das Genom von HSV-1 (152 000 Basenpaare) ist in ein langes (L, 126000 Basenpaare) und ein kurzes (S, 26 000 Basenpaare) Segment unterteilt. Beide Segmente enthalten *unique long* (U_L) und *unique small* (U_S) Regionen und die sich wiederholenden Sequenzen (R_L , R_S). Das HSV-Genom kodiert für ca. 80 virale Proteine (Roizman and Knipe 2001).

Eine Virusinfektion kann in einen latenten und einen lytischen Zyklus unterteilt werden. Die primäre Infektion der Epithelzellen ist immer lytisch, es folgt eine Virusreplikation und eine Genexpression, die zum Zelltod führen. Anschließend können die Nachkommenviren in den autonomen oder sensorischen Neuronen, wie z.B. den Trigemini-Neuronen, die u.a. die Lippen innervieren, in eine lebenslange Latenz etablieren (Enquist et al. 1998; Mettenleiter 2003). Während dieser Phase liegt das Virusgenom in der Zelle als extrachromosomales Episom vor und der produktive Zyklus ist unterbunden (Khanna et al. 2004a; Khanna et al. 2004b). Die Zahl der Episome variiert von zehn bis 100 pro Zelle. Bei einer Zellteilung wird die virale DNA durch zelluläre DNA-Polymerasen repliziert und an beide Tochterzellen weitergegeben. Eine Besonderheit der α -Herpesviren ist ihre Minimalexpression bestimmter RNA-Spezies

während der Latenz. Diese tragen zur Aufrechterhaltung der Latenz bei. Im lytischen Zyklus können Viren verschiedene Zellarten infizieren und sich in diesen vermehren. Der Viruseintritt ist in der Regel rezeptorvermittelt. Die viralen Oberflächen-Glykoproteine gB, gC können an Heparinsulfat-Proteoglycan auf der Zelloberfläche binden. Parallel dazu kommt es zu einer Interaktion zwischen den viralen gD und zellulären Membranproteinen der Immunglobulinsuperfamilie oder der TNF-Rezeptorfamilie, die allgemein als *herpesvirus entry proteins A-D* (HveA-D) bezeichnet werden. Diese Bindungen ermöglichen den α -Herpesviren den Zelleintritt (Spear 2004). Mutationen in dem Glykoprotein gD reduzieren signifikant den Hve-vermittelten Eintritt (Montgomery et al. 1996; Whitbeck et al. 1997). Nectin-1, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, wurde als einer der wichtigsten Rezeptoren für HSV-1 gD beschrieben (Geraghty et al. 1998). Bei einer rezeptorvermittelten Infektion verschmilzt die Zellmembran mit der Virusmembran. Bei diesem Vorgang wurden die Glykoproteine gB, gD und gH/gL als essentiell beschrieben (Galdiero et al. 2004; Spear 2004). Das Kapsid und die Tegumentproteine (z.B. α -TIF, Vhs) gelangen ins Cytoplasma. Ein Teil der Proteine verbleibt in der Zellperipherie, andere migrieren entlang der zellulären Mikrotubuli zum Nukleus (Hammonds et al. 1996; Mabit et al. 2002; Sodeik et al. 1997; Topp et al. 1996). Nachdem sie am Zellkern angelangt sind, wird die virale DNA durch die Zellkernporen in den Zellkern injiziert (*uncoating*), während die Kapside im Cytoplasma bleiben (Ojala et al. 2000; Sodeik et al. 1997). In den Zellkern gelangt auch das virale Tegumentprotein α -TIF, das die durch zelluläre Transkriptionsfaktoren vermittelte Transkription der viralen *immediate-early* (IE)-Gene aktiviert. Das Vhs verbleibt im Cytoplasma, wo es eine RNase-ähnliche Funktion übernimmt. Die Transkription der viralen Gene kann in drei Abschnitte unterteilt werden. Zunächst werden die *immediate early* (α)-Gene (α 4-ICP0, α 0-ICP0, α 27-ICP27/U_L54, α 22-ICP22/U_S1 und α 47-ICP47/U_S12) exprimiert. Das wird durch eine Interaktion von α -TIF mit zellulären Transkriptionsfaktoren begünstigt. Die zweite Phase ist die Phase der *early* (β)-Genexpression. Sieben dieser Genprodukte sind für die DNA-Relikation notwendig: DNA-Polymerase (U_L30), DNA-bindende Proteine (U_L42, U_L29, ICP8), ORI-bindende Proteine (U_L9) und der Helikase/Primase-Komplex (U_L5, U_L8 und U_L52). Nach einer effizienten Expression dieser Gene, kann eine Virus-Replikation beginnen. Andere Proteine der *early*-Phase sind für die Erhöhung der freien Nukleotide in den infizierten Zellen verantwortlich. Die Expression dieser Gene ist jedoch für eine Virus-Replikation in Zellkulturzellen nicht essentiell. In der dritten Phase findet die Replikation der viralen DNA und die Expression der *late* (γ)-Gene statt. In dieser Zeit ist die Expression der früheren Gene stark reduziert bzw. komplett ausgeschaltet.

Alle Strukturkomponenten und die für die Virusverpackung benötigten Proteine sind ebenso Produkte der *late*-Phase. Dazu gehören verschiedene *Scaffold*-Proteine, wie z.B. UL26/UL26.5, und Kapsidproteine, wie z.B. VP5, VP23 oder VP19C, die für den Kapsidzusammenbau essentiell sind. Die meisten *Scaffold*-Proteine werden in einem autoproteolytischen Vorgang aus dem Prokapsid entfernt. Es entsteht ein fertiges Kapsid. Mit Hilfe einiger viraler Proteine wird die DNA in das Kapsid gebracht. In der *late*-Phase werden u.a. Tegumentproteine wie z.B. α -TIF und Vhs produziert, die ebenso während der Morphogenese in neue Viruspartikel eingebaut werden.

5.8 Herpesviren und die Immunantwort

Der Körper reagiert auf eine Virusinfektion zunächst mit einer unspezifischen, nichtadaptiven Immunantwort. Diese natürliche Immunität wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Zellen, wie den Mono- und Granulocysten, den Makrophagen und den natürlichen Killerzellen, sowie durch verschiedene Faktoren, wie Akutphaseproteine, Faktoren des Komplementssystems, Zytokine, Interferone, Tumornekrosefaktore und Chemokine gewährleistet. Nach einer Etablierung der Infektion entwickelt sich die spezifische, adaptive Immunabwehr. Dazu gehören die antikörperproduzierenden B-Zellen (das humorale Immunsystem), T-Helferzellen und cytotoxische T-Lymphozyten. Die Kommunikation der verschiedenen Immunsysteme und ihrer Komponenten wird durch die Zytokine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und Chemokine vermittelt. Dies ist essentiell, um alle Immunzellen zu koordinieren und an den Infektionsherd zu locken. Eine primäre HSV-Infektion bewirkt im Wirtsorganismus eine starke Zytokinantwort. Es werden die Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , IFN- α/β , IFN- γ und GM-CSF sezerniert (Mogensen and Paludan 2001b). Jede der nachfolgenden Infektionen wirkt sich etwas schwächer aus, da die Infektion und die Immunantworten lokaler verlaufen. Während einer Infektion führen mehrere Faktoren zu einer antiviralen Antwort. Bereits eine rezeptorvermittelte Bindung der Viren an die Zelloberfläche kann die s.g. erste Welle der Zytokinproduktion auslösen. Unter den HSV-1 Glykoproteinen wurde das Glykoprotein gD als effizienter Stimulus für IFN- α identifiziert, wo hingegen gB, gC, gE, gG, gI und gH/gL keine IFN- α -Produktion initiieren konnten (Ankel et al. 1998). Die Rolle der zellulären *Toll-Like*-Rezeptoren, die meist im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen beschrieben wurden (Takeda et al. 2003), wird für die Zytokinproduktion in einer HSV-1- und HSV-2-Infektion diskutiert (Kurt-Jones et al. 2005). Es wurde in einem *in vivo*-Mausmodell gezeigt, dass der *Toll-Like*-Rezeptor-2 (TLR2) eine kritische Rolle für das Überleben der Tiere

nach einer HSV-1-Infektion spielt (Kurt-Jones et al. 2004) Tegumentproteine, die während des Viruseintritts in die Zelle gelangen, Akkumulation viraler dsRNA und neusynthetisierte virale Proteine können eine weitere Welle der Zytokinproduktion über verschiedene Signalwege in der Wirtszelle stimulieren. Im Zusammenhang mit einer antiviralen Antwort wurden zuerst Interferone beschrieben. Es gibt zwei Klassen von Interferonen. Klasse I bilden die antiviralwirkenden Interferone (IFN- α und IFN- β), die meist die Virusreplikation beeinflussen und sehr schnell durch Viren induzierbar sind (Mogensen and Paludan 2001b). Das IFN- γ , das die Klasse II bildet, erfüllt immunregulatorische Funktionen, was die weitere Zytokinproduktion induziert und Effektorfunktionen verschiedener Immunzellen steigert. IFN α/β und IFN γ inhibieren synergistisch die Replikation von HSV-1 (Sainz and Halford 2002). Zu den interferonbildenden Zellen gehören Makrophagen, Monocyten, Granulocyten und Fibroblasten. Die Bindung der Interferone an die spezifischen Rezeptoren führt zu deren Phosphorylierung und Konformationsänderung, was die assoziierten Proteinkinasen der JAK-Familie (Tyk-2, Jak-1) aktiviert (Darnell 1997; Li et al. 2005). Diese aktivieren und phosphorylieren die STAT-1- und STAT-2-Transkriptionsfaktoren (Darnell et al. 1994). Diese bilden Homo- bzw. Heterodimere, wandern in den Kern und binden zusammen mit weiteren Regulatorproteinen an die *interferon stimulated regulatory elements* (ISRE)-Kontrollelemente der DNA. Diese regulieren die Expression der *interferon stimulated genes* (ISG). Die Signalweiterleitung von Tyk-1, Jak-1 verläuft auch über den Insulinrezeptorsubstratsignalweg und über MAPK, insbesondere den p38-Signalweg (Platanias 2003). Die p38-Aktivierung ist für die IFN α/β abhängige Transkriptionsregulation über ISRE oder GAS Elemente bekannt und diese ist von STAT-Proteinen unabhängig (Li et al. 2004; Platanias 2003). Eine Stimulation der Zellen mit IFN α resultiert in einer Aktivierung der MKK3 und MKK6, die Aktivatoren von p38 sind. In MKK3- und MKK6-defizienten MEFs konnte keine IFN α -abhängige Stimulation von MK2 und MK3, die Substrate für p38 darstellen, festgestellt werden (Li et al. 2005).

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) spielt eine Schlüsselrolle in Entzündungs- und Infektionsprozessen, insbesondere in viralen Infektionen (Herbein and O'brien 2000). TNF- α ist in die Signalwege der Virusreplikation involviert und kann die Zellen aktivieren, differenzieren oder Apoptose in infizierten Zellen auslösen. TNF- α ist in der Lage, direkt die Virusreplikation zu blockieren, indem es insbesondere den Viruseintritt verhindert (Paludan and Mogensen 2001). TNF- α wird überwiegend von Makrophagen, Monozyten, B- und T-Lymphocyten gebildet, während TNF- β von T-Lymphocyten sezerniert wird. Die TNF-Rezeptoren, TNF-R1 und TNF-R2, werden von verschiedenen Zelltypen auf der Oberfläche

präsentiert. Die Bindung induziert in Zellen die Produktion von Zytokinen, wie z.B.: IL-1, IL-6, GM-CSF. TNF kann Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B und AP-1, induzieren kann, was die Transkription der proinflammatorischen und immuregulierenden Gene initiiert (Mohler et al. 1994). Mäuse sind nach einer TNF-Behandlung vor einer HSV-1-Infektion geschützt (Rossol-Voth et al. 1991). Mit LPS stimulierte und anschließend mit HSV-1 infizierte humane Monozyten zeigten eine erhöhte TNF-Produktion und eine gesenkte Prädisposition für eine HSV-1-Infektion (Cipollaro de L'Ero et al. 1998).

Interferone können, neben anderen Zytokinen wie IL-6 oder TNF- α , den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren, welcher ein zentraler Transkriptionsfaktor vieler viraler Infektionen ist. Er wird u. a. durch HSV, Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Influenzaviren, Hepatitis B Virus (HBV), humanes Immundefizienzvirus (HIV) und humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (HTLV-1) aktiviert (Mogensen and Paludan 2001b). Die Aktivierung des NF- κ B durch die meisten Viren, wie HIV-1, Influenzavirus, Hepatitis B und C und die Herpesviren, verläuft über IKK (Santoro et al. 2003). NF- κ B ist in wichtige proinflammatorische, zellproliferations- und zellüberlebensregulierende Prozesse involviert (Karin and Lin 2002). In der inaktiven Form liegen die Proteine der NF- κ B-Familie (p50, RelA) als Dimere im Cytoplasma vor und sind an inhibitorische Proteine der I κ B-Familie gebunden (Melchjorsen et al. 2003). I κ B wird durch I κ B Kinase (IKK) phosphoryliert und als Folge durch eine spezifische Ubiquitinligase der SCF-Familie polyubiquitiniert und im Proteasom degradiert. So wird NF- κ B frei, wandert zum Kern und bindet an die DNA (Schmitz et al. 2004). Dadurch werden Gene, die unter der NF- κ B-Kontrolle stehen, transkribiert. Zu den Produkten dieser Gene gehören u. a. PKR und 2',5'-OligoAdenosinsynthetase, die die Proteinsynthese hemmen und so die Virusreplikation beeinflussen. Die Aktivierung erfolgt durch die meisten viralen, bakteriellen und mykotischen Infektionen, als Antwort auf proinflammatorische Zytokine (TNF- α , Interferone), Mitogene, Wachstumsfaktoren und stressinduzierende Faktoren (Santoro et al. 2003; Schmitz et al. 2004). TNF- α und IL-1 β sind auch selbst Aktivatoren von NF- κ B, wodurch ein positiver autoregulatorischer Zyklus entsteht, der die Immunantwort verstärkt und in bestimmten Fällen zu chronischen Entzündungen führen kann (Tak and Firestein 2001). ICP4 und ICP27, HSV-1 Proteine der IE-Phase, sind in der Lage die nukleare Translokation von NF- κ B zu stimulieren (Margolis et al. 1992; Patel et al. 1998). Kurt-Jones und Kollegen (Kurt-Jones et al. 2005) zeigten, dass eine starke Aktivierung des NF- κ B durch HSV-1 von der Expression des *Toll-Like-Rezeptors-2*

(TLR2) und nicht des TLR4 abhängig war. Im gleichen Experiment zeigte HSV-2 nur eine schwach NF- κ B stimulierende Wirkung. Da die Viren vor der Infektion mit UV-Licht inaktiviert wurden, hängt eine NF- κ B-Aktivierung vermutlich nicht von der Virusreplikation ab.

Auf der anderen Seite wird diskutiert, dass NF- κ B durch seine apoptosehemmende Rolle in den Wirtszellen zu einer erhöhten Virusreplikation beitragen könne. Das wurde bereits für HIV, Herpesviren, Hepatitis C Viren (HCV) und Encephalomyocarditisviren (EMCV) gezeigt (Roulston et al. 1999). Viele Viren, wie Herpesviren (z.B. HSV-1) oder Simian Virus 40 (SV40), besitzen in ihrem Genom eine NF- κ B-bindende Domäne, was eventuell im Zusammenhang mit der Replikation stehen könnte (Cherrington and Mocarski 1989; Rong et al. 1992).

Die Familie der Interferonregulationsfaktoren (IRF) bildet eine weitere wichtige Gruppe der in die Immunabwehr involvierten Transkriptionsfaktoren. IRF-1 defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, natürliche Killerzellen zu entwickeln und reagieren nicht auf IFN- γ (Taniguchi et al. 2001). Eine Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 ist sowohl für eine virusstimulierte Produktion von IFN α/β (Sato et al. 2000) als auch des Chemokins RANTES (Lin et al. 1999) essentiell.

Eine dritte Gruppe der von vielen Viren induzierten Transkriptionsfaktoren bilden das Aktivatorprotein-1 (AP-1) und der aktivierende Transkriptionsfaktor 2 (ATF2)/Jun. Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren ist von den MAPK Signalwegen, wie p38 und Jun, abhängig (Herlaar and Brown 1999). Die durch HSV-2 stimulierte TNF- α -Produktion ist von ATF2/Jun abhängig (Paludan and Mogensen 2001) und eine HSV-1-Stimulation des Monocyten-Chemotaktischer Faktor-1 (MCP-1) ist durch AP-1 vermittelt (Lim and Garzino-Demo 2000). Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die in einer HSV-Infektion aktiviert werden, sind NF- κ B, AP-1, ATF/CREB und Oct-1 (Mogensen and Paludan 2001a; Mogensen and Paludan 2001b; Zachos et al. 1999).

Auf der anderen Seite haben Viren verschiedene Strategien entwickelt, um dieser massiven zellulären, antiviralen Antwort entgegenzuwirken. Die Expression der meisten zellulären Gene ist während einer Virusinfektion gesenkt (Smiley 2004). Die Suppression der zellulären und viralen mRNA-Synthese wird beispielweise durch ICP27 vermittelt, welches zu einer Repression der primären Transkription und des prä-mRNA Spleißens führt (Smiley 2004). Das *virion host shutoff* Protein (vhs), kodiert durch das Gen UL₄₁, ist ein weiteres Beispiel für HSV-

1-Proteine, die in diesen Prozessen von Bedeutung sind (Esclatine et al. 2004a; Esclatine et al. 2004b; Esclatine et al. 2004c; Taddeo et al. 2002; Taddeo et al. 2004). Vhs führt zu einer Zerstörung der Polyribosomen und zu einer Degradation der mRNA, indem es entweder selbst als RNase fungiert oder eine zelluläre RNase rekrutiert (Smiley et al. 2001). Da die virale Transkription eine hohe Aktivität aufweist, werden trotz der Vhs-Aktivität virale Gene exprimiert. Es wurde über eine vhs-abhängige Herabregulation des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I (Koppers-Lalic et al. 2001) und der Klasse II (Trgovcich et al. 2002) berichtet. Die Produktion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine, wie IL-1 β , IL-8 oder MIP-1 α war in infizierten U937-Zellen in einer vhs-abhängigen Weise gehemmt (Suzutani et al. 2000). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass vhs keinen Einfluss auf die interferonstimulierenden Gene (ISG) ausübt (Smiley 2004). Weitere Studien haben gezeigt, dass die mRNA-Degradation selektiv und eventuell sequenzspezifisch ist (Esclatine et al. 2004a; Esclatine et al. 2004b; Esclatine et al. 2004c; Taddeo et al. 2002; Taddeo et al. 2004). Von der vhs-abhängigen mRNA-Degradation sind häufig mRNAs betroffen, die in der 3' nichttranslatierten Region ein oder mehrere AREs enthalten. I κ B α und c-fos, beide Proteine mit AU-reichen Bereichen, werden nach einer HSV-1-Infektion sehr schnell degradiert. Im Gegensatz dazu bleiben GADD45 β und TTP stabil (Esclatine et al. 2004a; Esclatine et al. 2004b; Esclatine et al. 2004c; Taddeo et al. 2002; Taddeo et al. 2004).

5.9 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte der Phänotyp von MK2-defizienten Mäusen und Zellen in verschiedenen erfolgversprechenden Richtungen charakterisiert werden. Insbesondere sollte die physiologische Rolle der MK2-defizienten Endothelzellen in einem Angiogenesemodell sowie am Beispiel der Expression und der Aktivität von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und dessen Rezeptors in immortalisierten und primären Zellen untersucht werden. Durch eine Rückführung der Kinase in die MK2-defizienten MEFs sollten die Ergebnisse weiter untermauert werden.

Parallel sollte die Rolle von MK2 in der HSV-1-Infektion untersucht werden. Dabei sollte das Projekt auf die Aktivierung von Tristetraprolin (TTP), ein funktionell relevantes Substrat der MK2, nach der Infektion fokussiert werden. Deshalb sollte der Viruseintritt, die Zytotoxizität von HSV-1, die Virusreplikation und die protektive Wirkung der zytokinhaltigen Überstände von infizierten Zellen in den primären WT, MK2 $^{-/-}$ und TTP $^{-/-}$ MEFs untersucht werden.

Ferner sollte die Rolle von MK2 und von MK5 beim UV-stimulierten Zellsterben untersucht werden. Hierzu sollte zunächst sowohl die Zellproliferation als auch die Zellvitalität gemessen werden. Eine Rückführung der Kinasen in die defizienten MEFs sollte die Ergebnisse absichern.

6 Materialien und Methoden

6.1 Verwendete Materialien

6.1.1 Chemikalien

Accutase II TM	PAA
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Bestatin	Sigma
Bio-Rad-Protein Assay	Bio-Rad
DEPC	Sigma
E-64	Sigma
Human IgG	Sigma
Leupeptin	Sigma
BD Matrigel TM Basement Membrane Matrix	BD Biosciences
Monensin sodium	Sigma
Nylonwolle	Polysciences, Inc.
ONPG	Applichem
Pepstatin	Sigma
Plasminogen	Calbiochem
PMSF	Roth
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, komplet mini, EDTA-frei	Roche
Rapid-hyb buffer	Amersham
SB203580	Calbiochem
[³ H]-Thymidin	ICN Biomedicals, Inc.
TNF- α	Roche
Trizol [®] LS Reagent	Invitrogen

6.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

6.1.2.1 Zellkultur

PBS	137 mM NaCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
Lysispuffer	20 mM Tris-Acetat pH 7,0
	0,1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	1 mM Na ₃ VO ₄
	10 mM β-Glycerophosphat
	50 mM NaF
	5 mM Na-Pyrophosphat
	1 % Triton X-100
	Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, komplet mini, EDTA-frei

6.1.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8
Trennpuffer	188 mM Tris-HCl, pH 8,8
10 x Elektrodenpuffer	250 mM Tris-HCl
	192 mM Glycin
	1 % SDS
Gelfärbelösung	0,1 % Coomassie R-250
	40 % Methanol
	10 % Essigsäure

Gelentfärbelösung 10 % Essigsäure
 40 % Methanol

Geltrocknungslösung 4 % Glycerin
 25 % Ethanol

6.1.2.3 Western Blot

Anodenpuffer 300 mM Tris-HCl, pH 10,4
 20 % Methanol

Kathodenpuffer 25 mM Tris-HCl, pH 9,4
 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
 20 % Methanol

Blockmilch/PBS 5 % Magermilchpulver
 0,1 % Tween 20

PBS/Tween20 0,1 % Tween 20 in PBS

Stripping Buffer 62,5 M Tris-HCl
 2 % SDS
 100 mM β -Mercaptoethanol
 pH 6,8

6.1.2.4 Northern Blot

1%iges Agarose-Gel 214,8 ml DEPC dH₂O
 3 g Agarose
 55,2 ml 37%iges Formaldehyd
 30 ml 10 x MOPS (pH 7,0)

20 x SSPE 3 M NaCl
 172,5 mM NaH₂PO₄ x H₂O

	20 mM EDTA
	pH 7,4
10 x MOPS	0,2 M MOPS
	50 mM Natriumacetat x 3 H ₂ O
	10 mM EDTA
	pH 7,0
20 x SSC	3 M NaCl
	300 mM Natriumcitrat x 2 H ₂ O
	pH 7,0
3 x RNA-Loading-Sample	12,5 µl 10 x MOPS
	21,5 µl 37 % Formaldehyd
	62,5 µl Formamid
	2,5 µl Ethidiumbromid

6.1.2.5 Agarosegele

Elektrodenpuffer (1 x TAE)	40 mM Tris
	20 mM Natriumacetat
	mit Eisessig auf pH 7,2 einstellen
	1 mM EDTA zugeben
6 x Probenpuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol
	30 % (v/v) Glycerin

6.1.2.6 FACS

HFS	50 µg/ml PI
	0,1 % Natriumcitrat
	0,1 % Triton-X 100

6.1.2.7 MAPKAP Kinase 2 Assay

10 x Puffer	500 mM Na β -glycerophosphat
	1 mM EDTA
	pH 7,4
5 x Startmix	0,1 μ l 1 M Mg-Acetat
	0,25 μ l 10 mM ATP
	0,1 μ l γ ³³ P-ATP
	4,55 μ l dH ₂ O

6.1.2.8 Immunpräzipitation

Tris-Buffered-Saline (TBS)	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	25 mM Tris-HCl
	pH 7,4
IP-Puffer	50 mM NaF
	0,1 % Triton X-100
	1 mM Na ₃ VO ₄

6.1.3 Nährmedien

6.1.3.1 Medien für die Zellkultur

Standardmäßig wurde für die Kultivierung der Zellen D-MEM mit 450 mg/l D-Glucose Glucose, GlutaMAXTMI und Natriumpyruvat (Gibco) verwendet. Vor der Benutzung wurde das Medium mit folgenden Zusätzen supplementiert:

10 % FCS (v/v)	(PAA)
100 U/ml Penicillin	(PAA)
0,1 mg/ml Streptomycin	(PAA)

Für die Kultivierung der Endothelzellen im Aorta Ring Assay wurde ein E-STIM Endothelial Cell Culture Medium (BD Biosciences), was zusätzlich 10 ng/ml EGF, 200 μ g/ml ECGS, Penicillin und Streptomycin enthielt, benutzt.

Die Inokulierung der Zellen mit HSV-1 erfolgte in einem mit HEPES gepufferten RPMI 1640 (CytoGen), dem 0,1 % BSA zugesetzt wurde.

Für die Kultivierung der Verozellen und BHK-Zellen wurde das MEM Eagle Medium (CytoGen) benutzt, was mit 7,5 % FCS versetzt wurde.

Transfektionen wurden in Opti-MEM (Gibco) durchgeführt.

Als Einfriermedium wurde eine Lösung aus 12,5 % DMSO und 87,5 % FCS benutzt.

6.1.3.2 Medien für Bakterien

LB-Medium (Q-Biogene)	1 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	1 % Natriumchlorid
LB-Platten	LB-Medium
	1,5 % Agar Agar
LB/Amp	LB-Medium
	100 µg/ml Ampicillin
LB/Kana	LB-Medium
	50 µg/ml Kanamycin
SOA-Medium	2 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
SOC-Medium	SOA-Medium
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

6.1.4 Zelllinien

MEF: WT, MK2^{-/-} (Kotlyarov et al. 1999), MK5^{-/-} (Shi et al. 2003)

MEF: p38^{+/+}, p38^{-/-} (Ambrosino et al. 2003)

MEF: STAT1^{+/+}, STAT1^{-/-} (Durbin et al. 1996)

Makrophagen: WT, MK2^{-/-} (Hitti et al. 2006)

L-929: murine Fibroblasten

Vero: Zelllinie aus der Niere der Grünen Meerkatze

BHK: *Baby Hamster Fibroblast*

6.1.5 Mäuse

Bezeichnung	Genotyp	
WT (CL57/Black6)	Wildtyp	(Kotlyarov et al. 1999)
MK2 (129ola + CL57/Black6) Die Mäuse wurden in mehreren Generationen auf CL57/Black6 zurückgekreuzt.	MK2 ^{-/-}	(Kotlyarov et al. 1999)
MK5 (129ola + CL57/Black6)	MK5 ^{-/-}	(Shi et al. 2003)
TTP WT	TTP ^{+/+}	(Taylor et al. 1996)
TTP ^{-/-}	TTP ^{-/-}	(Taylor et al. 1996)

Alle Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierstall der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten.

6.1.5.1 Tötung der Mäuse

Die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar vor der Isolation von Zellen bzw. Geweben und wurde im Sinne des Tierschutzes vom Fachpersonal mittels Inhalation von CO₂ durchgeführt.

6.1.6 Rekombinante Proteine

Recombinant mouse uPA

American Diagnostica GmbH

Recombinant rat uPA

American Diagnostica GmbH

Recombinant murine M-CSF

R & D Systems

6.1.7 Plasmide

pcDNA3-myc-MK2wt

pcDNA3-HA-MK5wt

pEGFP-C1

6.1.8 Oligonukleotide

uPAex2 5'-GTC TGG CTG GCG AGC CTG TTC CTC TGC-3'

uPAex6 5'-GCC AAT CTG CAC ATA GCA CCA GGG TCG C-3'

uPA color primer 5'-GGC TGT CAG AAC GGA GGT GTA TGC GTG TC-3'

789 uPA 5'-GCA CGA ATA CTA CAG GGA AGA CAG C-3'

1264 uPA 5'-GAA TCC AGT CCA GGA AGT GTG AGA C-3'

uPAR 1fr 5'-GCT GCT GCT GCT GTT GCT GGC GAC TAC C-3'

uPAR 2fr 5'-CAT CAG CCT GAC AGA GAC CGT GTG CGC C-3'

uPAR 3rc 5'-GCC ACA GCC TCG GGT GTA GTC CTC ATC C-3'

uPAR 4rc 5'-GGA GAC AGA GAC GTT GAG GTG GGT CGG G-3'

6.1.9 AntikörperPrimäre Antikörper

Anti-Actin

Santa Cruz

Anti-GAPDH

Chemikon

Anti-ICP0 (11060)

freundliche Gabe von Dr. B. Sodeik

Anti-p38 α

Cell Signalling

Anti-pp38 α (Thr 180/ Tyr 182)

Cell Signalling

Anti-uPA

Santa Cruz

Anti-MK2

Cell Signalling

Anti-ICP4	freundliche Gabe von Dr. B. Sodeik
Anti-TTP	freundliche Gabe von Dr. P. J. Blackshear

Sekundäre Antikörper

LRSC-G α M	Jackson ImmunoReserch Laboratories, Inc.
Anti-Rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz
Anti-Mouse-IgG-HRP	Santa Cruz
Anti-Goat-IgG-HRP	Santa Cruz
Anti-Maus-IgG-HRP	Santa Cruz

6.1.10 Marker

GeneRuler 50bp DNA-Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler DNA-Ladder Mix	MBI Fermentas
Prestained SDS-Page, low range	BioRad
Prestained SDS-Page, high range	BioRad

6.1.11 Kits

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD
Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche
CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay	Promega
CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay	Promega
Lipofectamine™ 2000 CD	Invitrogen
Lipofectamin™ Plus	Invitrogen
Lipophilic Tracer Sample Kit	Molecular Probes
Nucleo Spin Extrakt II	Macherey-Nagel

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz

6.1.12 Geräte

Brutschrank (Zellkultur)	Stericult-200-Incubator, Forma Scientific
Brutschrank (Bakterien)	B 5060EK-CO2, Heraeus Instruments
Cell harvester	SkatronAS
Gel-Dokumentationssystem	Digit-Store duo (INTAS)
Gel-Dokumentationssystem	Las-3000, Fujifilm
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Elektrophorese Netzgerät	Electrophoresis Power Supply E 835, Consort
Durchflusszytometer	EPICS® XL-MCL, Becton Coulter
Software	EXPO™32 ADC Version 1.1B, Becton Coulter
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiovert 100, Zeiss
Mikroskop	Telaval 3, Carl Zeiss Jena
Mini hybridisation oven	Biometra
Mixer	Vortexgenie 2, Bender & Hobein AG
Odyssey Infrared Imager	Licor
Photometer	Genequant, Pharmacia
Sterilbank (Bakterien)	BDK
Sterilbank (Zellkultur)	Hera Safe, Heraeus Instrument
Thermocycler	Personal Cyclor, Biometra
Ultraschall-Gerät	Branson Sonifier 250

UV-Stratalinker	UV-Stratalinker [®] 1800, Stratagene
Wasserbad	M12, Lauda
Zentrifugen	Biofuge Pico, Heraeus Biofuge 28RS, Heraeus
Ultrazentrifugen	J6-MC, Beckmann 2-5, Sigma 3K12, Sigma TL-100, Beckmann; Rotor: TLS-55, TLA 100.2 J-21C, Beckmann; Rotor: JA-10 L8-70; Rotor: 19

6.2 Zellbiologische Methoden

6.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in einem Begasungsbrutsschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wurde - wenn nicht anders vermerkt - DMEM mit Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum und 0,001 % Penicillin/Streptomycin benutzt. Zur Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (PAA) abgelöst (ca. 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂), und anschließend 1:10 verdünnt ausgesät.

6.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Bei einer Konfluenz von max. 90 % wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und 3 min bei 200 g pelletiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in einem auf RT temperierten Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen verteilt. In einer Isopropanolbox wurden die Zellen langsam auf -80 °C gebracht und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen zu rekultivieren, wurden sie schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde tropfenweise in ein Röhrchen mit ca. 5 ml Medium pipettiert und 3 min bei 200 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem

Medium aufgenommen und in Schalen bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert.

6.2.3 Isolierung von primären Zellen aus der Maus

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

6.2.3.1 Makrophagen

Die Oberschenkelknochen einer Maus wurden entnommen. Die Knochenenden wurden abgeschnitten und der Knochen wurde zweimal mit jeweils 2 ml Medium durchgespült. Die Zellsuspension wurde für ca. 3 min auf Eis gestellt, damit überflüssiges Gewebe sedimentieren konnte. Anschließend wurde die Zellsuspension abgenommen, in Schalen verteilt und mit Medium aufgefüllt. Eine Differenzierung in Makrophagen wurde durch Zugabe von 5 µg/ml GM-CSF stimuliert. Da andere Zellen, wie z.B. Granulozyten, nicht adhären, können sie durch Mediumwechsel aus der Kultur entfernt werden. Die Kultur der Makrophagen dauerte ca. 10 Tage. Danach wurden sie direkt für Versuche verwendet bzw. gesplittet.

6.2.3.2 Maus Embryonale Fibroblasten (E13)

Die Mäuse wurden am 13. Tag der Trächtigkeit getötet. Die Embryos wurden entnommen und einmal mit PBS gewaschen. Nach der Entfernung der Köpfe und der Leber wurden die Embryos in Trypsin/EDTA (3 ml pro Embryo) zerkleinert bis eine pipettierbare Suspension entstand. Diese wurde in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmeyerkolben überführt und bei RT zwei bis drei Stunden geschüttelt. Die Zellsuspension wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Nachdem das überschüssige Gewebe sedimentierte, wurden die Zellen in Zellkulturschalen ausplattiert und mit Medium aufgefüllt. Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt. Beim Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet.

6.2.3.3 Thymozyten

Der Thymus einer Maus wurde entnommen und in einem Gewebehomogenisator in 5 ml Medium homogenisiert. Der Zellüberstand ohne Gewebereste wurde in ein neues Röhrchen überführt, die Zellen wurden pelletiert und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Isolierung für Versuche verwendet.

6.2.3.4 T-Zellen

Die Milz einer Maus wurde entnommen und in einem Gewebehomogenisator in 5 ml Medium homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen überführt und für ca. 3 min auf Eis gestellt. Nachdem die Geweberesten sedimentierten, wurde der Zellüberstand in ein frisches Röhrchen umpipettiert und 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,4 ml Medium aufgenommen. Die Erythrozyten wurden durch Einwirkung einer hypotonischen Lösung lysiert. Hierzu wurden 3,6 ml NH_4Cl (155 mM) dazugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert, in Medium aufgenommen und auf Nylonwolle-Säulen (0,5 g Wolle pro Milz) geschichtet. Die Säulen wurden 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Da die B-Zellen an der Nylonwolle adhäreren, konnten die T-Zellen anschließend durch Waschen der Wolle gesammelt werden. Die Zellen wurden pelletiert, in Medium aufgenommen und in Schalen ausgesät.

6.2.4 Behandlung der Zellen mit SB203580

Um die p-38-MAP Kinase zu inhibieren wurden die Zellen mit einem spezifischen p38-Inhibitor SB203580 (de Laszlo et al. 1998; Lee et al. 1994) behandelt. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und eine Stunde im Medium mit 10 μM SB203580 vorinkubiert. Danach folgte die versuchsspezifische Stimulierung der Zellen, wobei die Substanz SB203580 in der gleichen Konzentration weiterhin im Medium vorhanden war.

6.2.5 Stimulation der Zellen mit UV

Adhärente Zellen wurden mit einer Wellenlänge von 254 nm (UV-C) in einem UV-Stratalinker[®] 1800 stimuliert. Das Medium der subkonfluenten Zellen wurde zuvor abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig abgesaugt und die Zellen wurden mit UV behandelt. Sofort nach der Stimulation wurden die Zellen mit Medium bedeckt und je nach Versuch weiter bearbeitet.

6.2.6 FACS Analyse

Adhärente Zellen wurden für alle FACS Analysen mit Accutase II, statt Trypsin/EDTA, abgelöst.

6.2.6.1 Prä-G1-peak

Dieser Test basiert auf der Messung der relativen DNA-Menge in einzelnen Zellen. Hierzu werden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, was sich in die Nukleinsäuren einlagert und

dann stark fluoresziert. Es wird angenommen, dass die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zu der DNA-Menge ist. Eine proliferierende Zellpopulation, deren Fluoreszenz in einem Durchflusscytometer gemessen wird, zeigt drei Zellgruppen. Eine Gruppe von Zellen mit dem einfachen G₁-Phase-DNA-Gehalt weist einen Peak auf. Zellen mit dem doppelten DNA-Gehalt befinden sich in der G₂- und M-Phase und weisen einen zweiten Peak auf. Zwischen den beiden Peaks befinden sich Zellen aus der S-Phase. Während der Apoptose wird die DNA degradiert, so dass die relative Menge kleiner wird. In diesem Fall kann eine Verschiebung der Fluoreszenz detektiert werden. Es entsteht ein dritter Peak, ein s.g. Prä-G₁-Peak, der die Zellen beinhaltet, die eine kleinere DNA-Menge als in der G₁-Phase haben.

Die stimulierten Zellen wurden abgelöst, mit PBS gewaschen und pelletiert. Das Zellpellet ($6 \cdot 10^5$ Zellen) wurde in 1 ml HFS aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gut resuspendiert und am FACS analysiert. Die Anregung des PI erfolgte bei 488 nm und die Emission wurde im FL2-Detektor bei einem Emissionmaximum von 600 nm gemessen.

6.2.6.2 Annexin-V

Die Apoptose ist durch eine Reihe von morphologischen Veränderungen charakterisiert. Dazu gehört auch der Verlust der Zellmembranasymmetrie, was früh nach der Induktion der Apoptose geschieht. In apoptotischen Zellen wird ein Zellmembranphospholipid, das Phosphatidylserin, von der inneren zu der äußeren Seite der Membran translokalisiert. Annexin V ist ein 35-36 kDa großes Ca²⁺-abhängiges Protein, das an Phospholipide bindet und eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin aufweist (Schmid et al. 1992). Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences). Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen und in *binding buffer* aufgenommen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml). 100 µl der Zellsuspension wurde in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt und es wurden jeweils 5 µl von Annexin V-FITC und von PI zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen 15 min bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden 400 µl von *binding buffer* zugesetzt und die Zellen mittels Durchflusszytometers ausgewertet. PI wurde im FL2-Detektor bei einem Maximum von 600 nm gemessen. FITC wurde im FL1 bei einem Maximum von 525 nm detektiert.

6.2.6.3 Rh123

Die Änderung des Mitochondrial-Transmembran-Potentials wurde durch Färbung mit Rh123 und PI gemessen. Zellen wurden abgelöst, pelletiert und in 1 ml von frischem Medium (ca. 10^6 Zellen) aufgenommen. Es wurden 20 μ l einer 0,1 mM Rh123-Lösung dazugegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l einer PI-Lösung (1 mg/ml) zugesetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen am FACS ausgewertet. PI wurde im FL2-Detektor bei einem Maximum von 600 nm gemessen. Rh123 wurde im FL1 bei einem Maximum von 525 nm detektiert.

6.2.7 WST-1-Assay

Die Zellproliferation und Zellviabilität wurde in einem WST-1-Assay (Roche) überprüft. Dieser Test basiert auf der Spaltung des Tetrazoliumsalzes (WST-1) durch die mitochondrialen Dehydrogenasen zu Formazan. Diese Spaltung ist mit einem Farbumschlag verbunden und kann photometrisch detektiert werden. Hierzu wurden zunächst die behandelten und die unbehandelten Zellen in 96-Well Platten in je 100 μ l Medium pro Well ausgesät. Für die Messung wurden pro Well je 10 μ l der WST-1-Lösung zugesetzt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Absorption (A) bei 420 nm gemessen. Die Referenzmessung verlief bei einer Wellenlänge von 620 nm. Für die Auswertung wurde die Differenz $A_{420\text{ nm}} - A_{620\text{ nm}}$ gebildet.

6.2.8 3/7-Caspase-Assay

Die Caspasen 3 und 7 sind die Schlüsselenzyme bei der Apoptose in Säugerzellen (Adams 2003) und ihre Aktivität wird als ein Hinweis für den programmierten Zelltod verstanden. Mit Hilfe des Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega) wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in den verschiedenen Zelllinien bestimmt. Caspase-3-ähnliche Proteasen sind in der Lage, den am C-Terminus lokalisierten Aspartatrest in einer DEVD-Sequenz (Asp-Glu-Val-Asp) zu spalten. In diesem Assay wird ein Caspase-3/7 Substrat, das Z-DEVD-R110 (Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Asp-L-Glu-L-Val-L-Asp), genutzt. Dieses Substrat fluoresziert bei 499 nm. Nach Zugabe zu den Zellen wird das Substrat durch die Caspasen 3/7 gespalten. Das DEVD-Peptid wird vom Rhodamin 110 entfernt, was das Emissionsmaximum des Rhodamins in den Bereich von 521 nm verschiebt. Die genaue Durchführung erfolgte nach der Anweisung des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst in einer weißen 96-Well Platte in je 100 μ l Medium ausplattiert. Zum Zeitpunkt der Messung wurden je 100 μ l pro Well der Caspase 3/7-Lösung dazu pipettiert. Die Lösung enthielt neben dem Caspase-Substrat auch

zellysierende Substanzen, so dass vorherige Zellyse nicht nötig war. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 460 nm und einer Emission von 530 nm gemessen.

6.2.9 [³H]-Thymidin-Inkorporation

Eine Methode für die Überprüfung der Zellproliferation ist eine Messung der Inkorporation von radioaktivem Thymidin. Zellen die sich in der Teilung befinden, replizieren ihre DNA. Bei einer Zugabe von radioaktivem Thymidin bauen sie dieses in die DNA ein. Anschließend kann die Radioaktivität gemessen werden.

Die in 6 cm Ø Schalen stimulierten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die auf $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml eingestellte Zellsuspension wurde in eine 96-Well Platte (0,1 ml/Well) ausgesät. Als die Zellen nach ca. drei Stunden adhärent waren, wurde [³H]-Thymidin (0,5 µCi/Well) dazu pipettiert. Die Inkorporation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellüberstände und die mit dH₂O lysierten Zellen wurden durch einen für DNA undurchlässigen Filter geführt. Die DNA wurde mittels eines *Cell-Harvester* gesammelt. Die Filter wurden an der Luft getrocknet und anschließend in ein Szintillationsröhrchen überführt. Pro Röhrchen wurden jeweils 3 ml eines Szintillationscocktails gegeben und die Radioaktivität wurde in einem Szintillationsmessgerät gemessen. Alle Messungen wurden vierfach durchgeführt.

6.2.10 Transfektion

Alle Transfektionen wurden bei einer Konfluenz der Zellen von 70-80 % durchgeführt. Hierzu wurden am Vortag des Experimentes je Transfektionsansatz $8 \cdot 10^5$ Zellen auf eine Schale mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät.

6.2.10.1 Transfektion mit Lipofectamin-Plus

Für einen Ansatz wurden 2 µg Plasmid DNA in 750 µl Opti-MEM gegeben und gut gemischt. Dazu wurden 20 µl Plus-Reagenz pipettiert und gevortext. Nach einer 15minütigen Inkubation bei RT wurde der DNA-Ansatz zu einem Gemisch aus Opti-MEM (750 µl) und Lipofectamin (30 µl) gegeben und gemischt. Der komplette Ansatz wurde erneut 15 min bei RT inkubiert und zum Schluss zu 5 ml Opti-MEM gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit dem Transfektionsansatz für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit D-MEM weiterkultiviert.

6.2.10.2 Transfektion mit Calcium-Phosphat

Drei bis vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium erneuert. Für einen Ansatz wurden 36 µl einer 2 M Calciumchlorid-Lösung und 20 µg Plasmid DNA in 300 µl sterilem Wasser gelöst. In einem zweiten Röhrchen wurden 300 µl eines zweifachen HEPES-Puffer vorgelegt. Die DNA-Lösung wurde sehr langsam zu dem HEPES-Puffer pipettiert. Der Puffer wurde während der Zeit ständig geschüttelt. Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Transfektion verlief zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂.

6.2.11 Migrationsassay

Die Migration von MEFs wurde in einer Neuro Probe Migrationskammer durchgeführt. Die Kammer bestand aus einem unteren und einem oberen Teil, zwischen denen sich eine Polycarbonatmembran mit 8 µm Poren (Neuro Probe) als Migrationsbarriere befand. Die Zellen wanderten von der oberen in die untere Kammer. Um einen Stimulusgradienten herzustellen, wurde das PDGF enthaltende Medium nur in die Wells der unteren Kammer vorgelegt. Am Tag vor dem Versuch wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90 % für eine Nacht auf SFM umgestellt. Am Versuchstag wurde die Polycarbonatmembran mit 0,01% Fibronectin/PBS für eine Stunde bei RT beschichtet, danach mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Je 25 µl des PDGF (10 ng/ml) enthaltenden Mediums wurde in die Wells der unteren Kammer pipettiert. Die Membran wurde vorsichtig daraufgelegt, mit der oberen Kammer abgeschlossen und fest verschraubt. Die Zellsuspension (50 µl/Well) wurde pipettiert. Die Migration erfolgte sechs Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurden die nicht migrierten Zellen von der oberen Seite der Membran abgewischt und die Membran mit migrierten Zellen 15 min in einer 3,7%igen Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Danach wurde die Membran mit Wasser gespült und eine Stunde in 3%iger Giemsa-Lösung gefärbt. Die Membran wurde erneut mit Wasser gespült und bei RT getrocknet. Für die Auswertung wurde die Membran eingescannt und die Farbintensität mit dem Tina-Programm bestimmt.

6.2.12 Adhäsionsassay

Zunächst wurden die 96 Well-Platten mit 0,001%igem Fibronectin/PBS eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und eine Stunde bei RT mit 0,1 % BSA/PBS geblockt. Danach wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen und bei RT getrocknet. Am Tag des Versuches wurden die subkonfluenten Zellen 40 - 60 min

lang mit 2 μM DiR bei 37 °C und 5 % CO_2 gefärbt. DiR ist ein lipophiler Chromphor, der sich in die Zellmembran einlagert und somit die Detektion ermöglicht. Nach der Markierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellzahl wurde auf $2 \cdot 10^5$ /ml eingestellt. Jeweils 0,1 ml/Well der Zellsuspension wurden in die mit Fibronectin beschichteten Wells pipettiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden in bestimmten Zeitabständen (0 - 120 min) abgenommen und die Wells wurden zweimal mit PBS gewaschen. Bis zur Messung und während der Messung verblieben die Zellen in PBS. Die Detektion der adhärenen Zellen erfolgte bei Emissionsmaximum von 800 nm am Odyssey Infrared Imager.

6.2.13 Aorta Ring Modell

Das Aorta Ring Modell wurde als ein Modell für Angiogenese durchgeführt. Hierzu werden kleine Abschnitte der Aorta in einem Matrigel[®] eingebettet. Dieses Gel ist ein Extrakt aus einem Maustumor, dem *Engelbreth-Holm-Swarm*, was reich an extrazellulären Matrixproteinen ist. Nach der Einbettung der Aortaringe wurde das Gel zusätzlich mit einem Endothelzellmedium überschichtet, was Wachstumsfaktoren, wie EGF und ECGS enthielt. Das Auswachsen der Endothelzellen und ihr invasives Potential im Matrigel[®] zu migrieren wird als ein Angiogenesemodell genutzt (Zhu et al. 2003).

Die Aorta einer Maus wurde mit sterilem Präparationsbesteck präpariert und in möglichst dünne Ringe geschnitten. Bis zur Einbettung in Matrigel[®] wurden die Aortastücke auf Eis gehalten. Mit vorgekühlten Glaspipetten wurde das Matrigel[®] in Wells einer vorgekühlten 48-Well Platte (0,4 ml/Well) pipettiert. Die Aortaringe wurden in den Wells, möglichst zentral, platziert. Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C wurde das Matrigel[®] fest. Anschließend wurde das Matrigel[®] mit Endothelzellmedium überschichtet, um das Wachstum der Endothelzellen zu stimulieren. Das Medium wurde alle drei Tage erneuert. Je nach Versuch wurden dem Medium bestimmte Inhibitoren zugegeben, diese wurden in Abhängigkeit ihrer Halbwertszeit erneuert. Das Wachstum von Endothelzellen wurde mikroskopisch dokumentiert.

6.2.14 Wund-Test

Am Vortag der Versuches wurden die Zellen in einer 24 Well Platte mit je $3,5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well ausplattiert. Nachdem die Zellen adhären waren, wurden sie einmal mit SFM gewaschen und über Nacht und während des ganzen Versuches in SFM kultiviert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Zellen während des Versuches nicht proliferieren. Am Tag des Versuches wurden mit einer sterilen gelben Pipettenspitze mehrere Wunden in dem Zellrasen

gemacht. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das SFM enthielt dabei ggf. spezifische Inhibitoren. Die Wunden wurden mikroskopisch dokumentiert.

6.2.15 Fixierung und Färbung der Zellen mit Kristallviolett

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 3,7 % PFA/PBS auf die Zellen gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für ca. 20 min mit einer 0,05 % Kristallviolettlösung gefärbt. Die 5%ige Stammlösung von Kristallviolett (in reinem Ethanol) wurde hierzu 1:100 mit dH₂O verdünnt.

6.3 Biochemische Methoden

6.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zunächst wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und in einem Röhrchen 5 min bei 500 g bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Lysispuffer aufgenommen, die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren vereinzelt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt.

6.3.2 Proteinfällung

Zum Aufkonzentrieren wässriger verdünnter Proteinlösungen wurden diese 9:1 mit 100%iger (w/v) TCA versetzt und die Proteine über Nacht bei 4 °C gefällt. Anschließend wurde 20 Minuten bei 13000 g zentrifugiert, die Pellets dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und in Ladungspuffer aufgenommen. Durch das Waschen mit Aceton war eine pH-Neutralisierung mit NaOH nicht nötig.

6.3.3 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Zur Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz (Bradford 1976) der Firma Biorad verwendet. Zu 20 µl Probe wurden 1 ml des 1:5 mit dH₂O verdünnten Reagenz gegeben, 15 min bei RT inkubiert und anschließend die OD_{595nm} gemessen. Eine Standardreihe wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) angefertigt.

6.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen im SDS-Gel wurde die modifizierte Methode nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet, bei der durch einen pH-Sprung zwischen Trenn- und Sammelgel eine Schärfung der Banden stattfindet. Die Proteine wurden vor dem Auftragen für 5 Minuten

in Laemmlipuffer erhitzt. In der Regel wurden 10%ige oder 12%ige Gele verwendet. Das Einlaufen der Proteine in das Sammelgel erfolgte bei 80 V (ca. 30 min), dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

6.3.5 Nicht reduzierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für einen Nachweis der Proteine in einem Zymogramm wurde die Auftrennung der Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Der Unterschied zu der herkömmlichen SDS-Page war das Fehlen des β -Mercaptoethanols im Laemmlipuffer.

6.3.6 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurden die Proteine mittels eines Semi-Dry Western Blot-Gerätes (Biorad) auf eine Hybond-ECL-Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences) übertragen. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte für 90 min bei 0,8 mA/cm² Gel bei maximal 20 V. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt, die Membran für 20 min in PBS gewaschen und für 1 h in Blockmilch geblockt. Der Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgte mittels Antikörpern. Nach dem Blocken wurde viermal mit PBS-Tween (0,1 % Tween-20 in PBS) gewaschen, der erste Antikörper in Blockmilch verdünnt zugesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde viermal jeweils fünf Minuten mit PBS-Tween gewaschen, der zweite Antikörper zugesetzt und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut viermal jeweils fünf Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Bei HRP-konjugierten sekundären Antikörpern wurde die Membran für eine Minute in Luminolreagenz inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Chemilumineszenz im Gel-Dokumentationssystem (Fujifilm).

6.3.7 Strippen des Western Blots

Auf der Membran gebundene Antikörper wurden durch Inkubation im *Stripping Buffer* für 20 Minuten bei 50 °C entfernt.

6.3.8 Zymogramm

Das Zymogramm wurde als eine indirekte Methode zum Nachweis der Aktivität des uPA-Systems genutzt. uPA ist eine Serinprotease, welche Plasminogen zu Plasmin spezifisch konvertiert und von den Zellen sezerniert wird. Plasmin führt unspezifisch zur Proteolyse einer ganzen Reihe von Proteinen, was u.a. die Zerstörung der extrazellulären Matrix hervorruft. Unter physiologischen Bedingungen spielt die plasmininduzierte Proteolyse eine Rolle z.B. bei

der Zellmigration. Die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin ist nicht von uPA alleine abhängig. uPA ist neben seinem Rezeptor (uPAR) und spezifischen Inhibitoren, wie PAI-1, ein Bestandteil eines Urokinas Plasminogen Systems.

Zunächst wurden die Zellen in 6-Well Platten mit je $2 \cdot 10^5$ Zellen/Well ausgesät und nach der vollständigen Anhaftung für 12 h im SFM kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit UV-C oder PMA stimuliert und in SFM für 24 h inkubiert. Die Proteine aus den Zellüberständen wurden mit TCA gefällt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter nichtreduzierenden Bedingungen mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Danach wurde das Gel einmal in 2,5 % Triton X-100 und zweimal in dH_2O für je 20 min gewaschen, danach auf ein Plasminogen-Substrat-Gel (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Plasminogen, 2,5 % fettarme Milch, 1 % Agarose, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5) geschichtet und über Nacht bei 37 °C und hoher Feuchtigkeit inkubiert. Im Plasminogen-Substratgel fungierte Plasminogen als Substrat für uPA und Milch als Substrat für Plasmin. Auf der Höhe von ca. 45 kDa des SDS-Geles, was dem Molekulargewicht von uPA entspricht, entstand Plasmin, was zu einer Proteolyse der Milch führte. Die Stellen wurden auf dem weißen Substrat-Gel als farblose Flecken sichtbar. Die Gele wurden dann mit einem schwarzen Hintergrund eingescannt und weiter ausgewertet.

6.3.9 Immunzytochemie

Der Eintritt der HSV-1-Kapside in die Zelle und die Expression eines der frühen Virusproteine (ICP0) wurde mit Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Dohner et al. 2002; Marozin et al. 2004). Die MEFs wurden in 24-Well Platten auf sterilen mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % wurden die Zellen mit HSV-1 (10 PFU/Zelle) für 3, 4 und 6 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 3%igem PFA in PBS für 20 min bei RT fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Das verbleibende PFA wurde durch 50 mM NH_4Cl in PBS für 10 min inaktiviert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurden sie mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Zum Abblocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde 0,5 % BSA in PBS für 30 min bei RT auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und 30 min mit dem in 0,5 % BSA in PBS verdünnten primären Antikörper bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für jeweils 10 min mit 0,5 % BSA in PBS gewaschen und mit dem in 0,5 % BSA in PBS verdünnten sekundären Antikörper 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal für jeweils 10 min mit 0,5 % BSA in PBS und zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden kurz mit ddH_2O gewaschen und in Moviol (6 g

Glycerin, 2,4 g Moviol 40-88, 6 ml ddH₂O, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5, 25 mg/ml DABCO) auf einem Objektträger eingebettet. Die langfristige Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

6.3.10 MAPKAP Kinase 2 Assay

Die Kinaseaktivität von MK2 wurde indirekt durch Phosphorylierung von Hsp25, welches ein Substrat von MK2 ist, bestimmt. 10 µl der Zellysate (20-50 µg Protein) wurden hierzu mit dem Hsp25 enthaltenden 10 x Reaktionspuffer gemischt und anschließend mit dem das radioaktiv markierte γ -³³P-ATP enthaltenden Startmix für 20-30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4fachem SDS-Ladepuffer gestoppt. Die Proteine wurden bei 95 °C für 3-5 min denaturiert und mittels SDS-Page aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend getrocknet und das durch Phosphorylierung von Hsp25 inkorporierte radioaktiv markierte Phosphat am Phosphoimager detektiert.

6.3.11 Immunpräzipitation

Um ein bestimmtes Protein aus den Zellysaten zu isolieren, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden die spezifischen Antikörper zu den Zellysaten gegeben. Die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe und die freien Antikörper wurden anschließend mit Protein-A-Sepharose ausgefällt.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Transformation

0,5 µg Plasmid-DNA wurden mit 200 µl chemisch kompetenter *E. coli* Zellen gemischt und für 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (75 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad) und sofortiges Abkühlen auf Eis. Die Zellen wurden mit 800 µl SOC-Medium versetzt, für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert, wobei auf eine Platte 100 µl Suspension und auf die andere 500 µl ausgebracht werden. Es wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.4.2 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Größere Mengen Plasmid-DNA von bis zu 500 µg wurden mit dem Maxi KitTM (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Es wurden 300 ml-Übernachtskulturen des betreffenden Bakterienklons zentrifugiert und die DNA nach alkalischer Lyse des Bakterienpellets durch Anionenaustauschersäulen aufgereinigt.

6.4.3 Gelelektrophorese von DNA

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarosegele verwendet, bei kleinen Fragmenten (<500 bp) 2%ige. Die Suspension von Agarose in 1 x TAE wurde mehrere Male in einer Mikrowelle kurz zum Sieden gebracht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C Ethidiumbromid zugegeben. Nach Gießen und Erstarren des Gels wurde es mit TAE in einer Flachbett-Elektrophoreseapparatur überschichtet und die Taschen mit den Proben beladen. Die Elektrophorese wurde 30 min bei 90 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel in einem UV-Transilluminator fotografiert.

6.4.4 Extraktion der DNA aus dem Agarosegel

Einzelne DNA-Banden wurden nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA wurden mit einem Nucleo Spin Extrakt II-Kit von Macherey-Nagel nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

6.4.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde in Quarzküvetten bei 260 nm photometrisch bestimmt. Die DNA bzw. die RNA wurde 1:80 in dH₂O verdünnt und die Extinktion gemessen. Dabei entspricht 1 OD_{260nm} 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssRNA.

6.4.6 Isolierung von RNA

Für die Isolierung der RNA wurden ca. 10⁶ Zellen aus konfluenten 10 cm Ø Zellkulturplatten benutzt. Die Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis abgeschabt. Bis zur Lyse der Zellen wurden sie auf Eis gehalten bzw. bei -80 °C für längere Lagerung eingefroren. Die weitere Durchführung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach der Vorschrift des Herstellers.

6.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten benutzt.

Zur Amplifikation wird *HotStarTaq DNA Polymerase* (Qiagen) eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

10x PCR-Puffer	2,5 µl
5x Q-Solution	5 µl
MgCl (25 mM)	0,5 µl

dNTP-Lösung (je 10 mM)	0,5 µl
<i>Primer fw.</i> (10 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Primer rv.</i> (10 pmol/µl)	0,5 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	0,2 µl
<i>Template DNA</i>	1 µl
dH ₂ O	14,3 µl

15 min bei 95°C

Denaturierung 30 s bei 95 °C

Annealing 60 s bei entsprechender Temperatur

Elongation 2 min pro kb bei 72 °C

25-30 Zyklen

Finale Extension 10 min bei 72 °C

6.4.8 Northern Blot

Northern Blot ist eine Methode zum Nachweis der mRNA. Die aus den Zellen isolierte RNA wurde zunächst in einem denaturierenden Agarosegel getrennt und anschließend auf eine Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech) übertragen. Mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden wurden spezifische mRNAs detektiert.

Alle Geräte wurden gründlich gesäubert und mit 70%igem Ethanol gespült. Wasser für alle Lösungen wurde mit DEPC (0,5 ml/ 1 l dH₂O) behandelt und autoklaviert. Zunächst wurde ein 1%iges Agarose-Gel im 1x MOPS, welches Formaldehyd und Formamid enthielt, gegossen. Je 10 - 20 ng der RNA wurden mit dem dreifachen Volumen der RNA-Ladungsprobe gründlich gemischt und 3 min bei 70 °C denaturiert. Die Proben wurden anschließend kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V ca. 3 bis 4 h. Vor dem Bloten wurde die Qualität der RNA und die korrekte Auftrennung überprüft und dokumentiert. Es wurde aus mehreren Schichten von Wathman-Papier ein luftblasenfreier Sandwich gebildet: zunächst zwei mit 10 x SSC befeuchteten Lagen von Wathmann-Papier, das Gel, dann die Membran und mehrere Lagen von trockenem Wathmann-Papier. Auf das Sandwich wurden noch ein Stapel von zurechtgeschnittenen Papiertüchern (ca. 5 cm hoch) und ein Gewicht gelegt. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte in 10 x SSC über Nacht.

Die Membran wurde dann kurz in 2 x SSC gewaschen, für zehn Minuten bei 80 °C getrocknet und anschließend zweimal mit 1200 J/m² (*Auto-Crosslinking*) behandelt. Danach folgte die Pre-hybridisierung im *Rapid-Hybridization Buffer* (Amersham) bei 64 °C für 1- 2 h. Die radioaktive Sonde wurde mit dem Kit *Megaprime DNA Labelling System* (Amersham) nach der Anleitung des Herstellers vorbereitet. Um die Sonde radioaktiv zu markieren wurde ein dATP [α ³³P] benutzt. Vor der Zugabe der Sonde wurden die nicht inkorporierten Nukleotide mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) nach der Anleitung des Herstellers entfernt. Die Sonde wurde anschließend zum *Rapid-Hybridization Buffer* gegeben und die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 64 °C. Die Membran wurde dreimal für je 5 min bei RT mit 2 x SSC und 0,1 % SDS und danach zweimal für je 20 min bei 64 °C mit 0,1 x SSC und 0,1 % SDS gewaschen. Die Auswertung erfolgte am Phosphoimager.

6.5 Virologische Methoden

6.5.1 Viruspräparation aus dem Mediumüberstand

Eine Viruspräparation von HSV1 (KOS) wurde in BHK-Zellen durchgeführt (Dohner et al. 2002; Sodeik et al. 1997). Als Inokulum wurde HSV1(KOS) der Passage 2 aus BHK-Zellen benutzt. Zunächst wurden die BHK-Zellen in 40 Flaschen (175 cm²) ausgesät und bis zum Erreichen einer 90%igen Konfluenz bei 37 °C, und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zuerst einmal mit PBS gewaschen und mit 5 ml Inokulum (RPMI/BSA) bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach einer Stunde wurden 25 ml von MEM/FCS-Medium dazupipettiert und weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Virusernte erfolgte nach dem Eintreten eines kompletten cytopathischen Effektes (ca. 40 Stunden nach der Infektion). 90 % der Zellen waren dabei abgerundet und lösten sich beim Klopfen an die Flaschen ab. Die Überstände wurden gesammelt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und das PBS ebenso gesammelt. Die Zellen wurden aus den Überständen bei 4000 rpm (Beckmann J-21C, Rotor JA-10) und 4 °C für 10 min pelletiert. Die Überstände wurden in neue Zentrifugenbecher überführt und bei 12000 rpm (L8-70 UZ, Rotor 19) und 4 °C für 90 min zentrifugiert, um die Viren zu pelletieren. Die Überstände wurden verworfen, das restliche Medium vorsichtig entfernt und das Pellet in 2 ml MNT-Puffer (20 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure, 100 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4) aufgenommen und gut resuspendiert. Die Viruslösung wurde 24 h bei 4 °C inkubiert, was die Lösung des Pellets erleichtert. Anschließend wurde die Suspension weiter mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Zwischendurch wurde dreimal für je 30 sec. eine Ultraschallbehandlung bei 4 °C durchgeführt. Als in der Lösung keine Partikel mehr zu sehen waren, wurde die Suspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff

eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Viruslösung wurde mittels eines Plaque Assays titriert.

6.5.2 Plaque Assay

Die Infektiosität einer Viruslösung wurde mittels Plaque Assay in Vero Zellen bestimmt (Dohner et al. 2002; Sodeik et al. 1997). Die wichtigste Form des erkennbaren Zellschadens virusinfizierter Zellen ist die Abkuglung der Zellen. Die initial infizierten Zellen infizieren ihre Nachbarzellen, die sich ebenfalls abrunden. So entsteht ein Plaque aus abgekugelten Zellen. Im weiteren Verlauf werden die Zellen cytopathisch und lösen sich von dem Zellrasen ab. An diesen Stellen entstehen zellfreie Areale. Der verbleibende Zellrasen kann fixiert und gefärbt werden. Aus der Anzahl der Plaques wird der Titer der Viruslösung (PFU/ml) errechnet.

Zunächst wurden die Verozellen in 12 Well Platten mit $13 \cdot 10^4$ Zellen/Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die konfluenten Zellen mit der Viruslösung in verschiedenen Konzentrationen infiziert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit RPMI/BSA gewaschen und die Viren wurden 1 h bei RT inokuliert. Anschließend wurde das Inokulum verworfen und frisches Medium auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde mit gepoolten humanen $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ IgG, die immer auch HSV1 spezifische IgG enthalten, supplementiert. Dadurch wurde gewährleistet, dass die von den primär infizierten Zellen ins Medium sezernierten Virusnachkommen inaktiviert wurden und keine neuen Zellen infizieren konnten. Somit konnte die primäre Konzentration der Viren bestimmt werden. Die Inkubation verlief zwei Tage im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 . In der Zeit wurde die Plaquebildung mikroskopisch beobachtet und protokolliert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit $9,25\%$ igem PFA in PBS fixiert und mit $0,025\%$ igem Kristallviolett in 5% igem Ethanol gefärbt.

6.5.3 Infektion der Zellen für Protein- bzw. RNA-Isolierung

Am Vortag des Versuches wurden die Zellen in 6 cm bzw. 10 cm \varnothing Schalen ausgesät. Bei einer Konfluenz von $80 - 90\text{ }\%$ wurden die Zellen mit 20 PFU/ Zelle infiziert. Zunächst wurden die Zellen einmal für 15 min mit kaltem mit HEPES gepuffertem RPMI/BSA auf Eis gewaschen. Die Inokulation mit HSV-1 wurde 2 h lang auf Eis in RPMI/BSA durchgeführt. Das Inokulum wurde entfernt und die Zellen in serumhaltigem DMEM bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden danach einmal mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt, pelletiert und lysiert.

6.5.4 β -Gal-Assay

In diesem Assay wurde eine HSV-1(KOS)tk12-Mutante benutzt, die das bakterielle *LacZ* Gen unter der Kontrolle des ICP4 Promotors besitzt (Warner et al. 1998). Da das ICP4-Protein zu den viralen *immediate early* Proteinen gehört, wird die Aktivität des Enzyms β -Galactosidase als ein Indikator für den Viruseintritt eingesetzt (Dohner et al. 2002; Mabit et al. 2002; Marozin et al. 2004).

Am Vortag wurden die Zellen in 24-Well Platten ausgesät. Es wurden immer zwei Platten parallel behandelt. Eine diente für die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität durch ONPG-Färbung, die zweite für die Zellzahlkontrolle mittels Kristallviolett-Färbung (CV). Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurde eine Virusinfektion mit $3 \cdot 10^6$ PFU/Well für MEFs und $6 \cdot 10^6$ PFU/Well für Makrophagen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen einmal für 15 min mit CO₂-unabhängigem Medium (0,1 % BSA) gewaschen. Das Medium wurde abgesaugt, und 0,25 ml/Well CO₂-unabhängiges Medium (0,1 % BSA) mit Viren wurde auf die Zellen für eine Stunde bei 37 °C gegeben. Anschließend wurde das Inokulum abgesaugt, je 0,5 ml/Well vom CO₂-unabhängigem Medium (10 % FCS) dazupipettiert und weitere vier Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Für die ONPG-Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 15 min bei RT lysiert (1 mg/ml BSA, 0,5 % Triton X-100, 2 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml E-64, 2 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Antipain, 2 μ g/ml Bestatin, 2 μ g/ml Pepstatin, 160 μ g/ml PMSF in PBS). Nach einer vollständigen Lyse der Zellen wurden 0,2 ml/Well der ONPG-Lösung (3,5 mg/ml ONPG in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5) dazugegeben. Nach einer dreistündigen Inkubation bei RT wurde die OD bei 420 nm gemessen. Die zweite Platte wurde, wie im Teil Zellbiologische Methoden beschrieben, mit PFA/PBS fixiert und mit Kristallviolett (CV) gefärbt. Für die Auswertung wurden die ONPG-Werte durch die CV-Werte dividiert, um auszuschließen, dass die Unterschiede auf der unterschiedlichen Zellzahl basieren.

6.5.5 Virusreplikationassay, TCID₅₀-Test

Die Replikation der Viren in den verschiedenen Zelllinien wurde in einem modifizierten Plaque Assay, dem TCID₅₀, in Verozellen durchgeführt. Die verschiedenen Zelllinien wurden infiziert und später als Inokulum für Verozellen benutzt. Das Sterben der Verozellen diente als Indikator für die Virusreplikation in den Zelllinien.

Zunächst wurden die Zellen mit einer niedrigen MOI von 0,1, 0,01 bzw. 0,001 PFU/Zelle infiziert. Nach einer 48-stündigen Infektion wurden die Zellen und der Zellüberstand

gesammelt und durch dreifaches Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C vollständig lysiert. Es wurden Verdünnungsreihen dieser Viruslösungen in 96 Well Platten vorbereitet (50 µl/Well). Anschließend wurden je 100 µl in jedes Well einer Verozellsuspension ($4 \cdot 10^5$ Zellen/ml) pipettiert. Die Infektion verlief 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit PFA/PBS fixiert, erneut gewaschen und mit Kristallviolett gefärbt. Nachdem das Kristallviolett getrocknet war, wurde es mit reinem Ethanol gelöst und die OD bei 595 nm bestimmt.

6.5.6 Plaque-Reduction-Assay

Eine Virusinfektion löst in den Zellen eine antivirale Antwort aus. Zytokine werden von den Zellen produziert und sezerniert. Die Konditionierung des Mediums durch Zytokine kann in einem Plaque-Reduction-Assay überprüft werden. Das Medium, welches die Zytokine enthält, wird gesammelt und auf Verozellen gegeben. Nach dieser Vorinkubation werden die Verozellen infiziert. Die Zytokine können die Infektion der Verozellen beeinflussen und somit die Bildung von Plaques verändern.

Die Zellen wurden zunächst mit einer niedrigen MOI von 0,1 bzw. 0,01 PFU/Zelle für 48 h infiziert. Die Mediumüberstände wurden gesammelt und 20 min bei 55000 g bei 4 °C zentrifugiert, um die Viruspartikel aus den Überständen zu entfernen. Die Überstände wurden auf Verozellen gegeben. Nach zwölfstündiger Inkubation wurden die Überstände abgenommen und die Zellen wurden mit MOI 0,002 PFU/Zelle für inokuliert. Nach einer Stunde wurde das Inokulum verworfen und die zytokinkonditionierten Überstände wurden erneut auf die Zellen gegeben. Nach drei bis fünf Tagen der Infektion wurden die Verozellen mit PFA/PBS fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Als Kontrolle dienten Verozellen, die vor und während der Infektion nicht mit Mediumüberständen inkubiert wurden. Die Anzahl und die Größe der Plaques wurden als Maß für die Bildung der Zytokine in den erst infizierten Zelllinien genommen.

6.5.7 Zytotoxizität

Eine Virusinfektion führt letztendlich zu einer Lyse der Zellen. Das Überleben der Zellen hängt von mehreren Faktoren, wie der Virusreplikation und der antiviralen Antwort der Wirtszellen ab. Die Zytotoxizität einer HSV-1-Infektion wurde nach einer 30-stündigen Infektion mit verschiedenen Viruskonzentrationen bestimmt. Hierzu wurden die Viren in einer 96-Well Platte mit verschiedenen MOI in einem RPMI-Medium mit 0,1 % BSA vorgelegt. Dazu wurde die Zellsuspension mit je $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Well pipettiert. Die Infektion verlief

bei 37 °C und 5 % CO₂ für 30 h. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 3,7 % PFA/PBS fixiert, erneut mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen mit dH₂O gewaschen, getrocknet und das verbliebene Kristallviolett im reinen Ethanol gelöst. Danach erfolgte eine OD-Messung bei 590 nm.

7 Ergebnisse

7.1 Die Rolle von MK2 bei der Expression und der Aktivierung von uPA und uPAR

Am Beispiel von TNF α und IL6 wurde gezeigt, dass MK2 in die post-transkriptionelle Regulation von Zytokinen involviert ist (Kotlyarov et al. 1999; Neiningen et al. 2002). Diese Regulation ist von AREs in der 3'nichttranslatierten Region in der Zytokin-mRNA abhängig. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass p38 und ihr Substrat MK2 in die Regulation der Zellmigration involviert sind. Die MK2-defizienten immortalisierten MEFs und die MK2-defizienten primären glatten Muskelzellen zeigten ein signifikant gehemmtes Migrationsverhalten im Vergleich zu den WT Zellen (Kotlyarov et al. 2002). Weitere Untersuchungen sollten auf den Urokinase Plasminogen Aktivator und seinen Rezeptor ausgedehnt werden. Zum einen enthält die mRNA von uPA und uPAR AREs in der 3'nichttranslatierten Region. Zum anderen ist uPA als eine Serinprotease zusammen mit seinem Rezeptor in verschiedene physiologische Prozesse involviert, wie Angiogenese, Tumormetastasierung oder Wundheilung (Witowsky et al. 2003). Verschiedene Tumorzellen zeigen beispielsweise eine erhöhte uPA-Expression (Duffy 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden immortalisierte MEFs, primäre und immortalisierte Makrophagen mit UV-C bzw. mit LPS stimuliert. Diese Stimulationsmethode wurden gewählt, da beide den p38/MK2 Signalweg aktivieren können (Han et al. 1994). Eine Stimulation von uPA durch LPS ist bisher nicht bekannt. Miralles und Kollegen zeigten, dass eine uPA-Stimulierung durch UV-C von JNK und nicht von ERK1/2 und p38 abhängig ist (Miralles et al. 1998a). Als eine positive Kontrolle wurde PMA benutzt, welches in vielen Zellen uPA effizient stimulieren kann (Witowsky et al. 2003). Die PMA-abhängige uPA-Stimulierung scheint durch ERK2 Signalweg reguliert zu werden (Irigoyen et al. 1997; Miralles et al. 1998b)

7.1.1 Die Aktivität des uPA

Die Aktivität des uPA wurde in immortalisierten MEFs analysiert. Vor der Stimulation wurden die Zellen mit dem wasserlöslichen p38-Inhibitor SB203580 (10 μ M) bzw. einer gegenüber p38 nicht aktiven, strukturell ähnlichen Vergleichssubstanz SB202474 (10 μ M) behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit UV-C (20 J/m²) stimuliert und für 24 h in SFM mit bzw. ohne den Inhibitor inkubiert. Anschließend wurden die Proteine aus dem Zellüberstand ausgefällt und die Aktivität von uPA in einem Zymogramm nachgewiesen (Abb. 7-1).

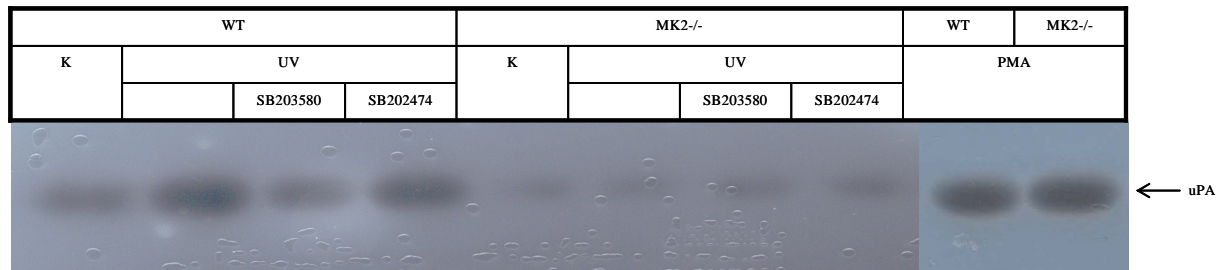


Abbildung 7-1: Die Aktivität von uPA in UV-stimulierten MEFs. Immortalisierte MEFs: WT und MK2^{-/-} wurden mit UV (20 J/m²) stimuliert. Nach einer 24-stündigen Inkubation im SFM, welches den Inhibitor SB203580 (10 µM) oder seine nicht aktive Form SB202474 (10 µM) enthielt, wurden die Proteine aus den Überständen ausgefällt. Mittels eines Zymogramms wurde die Aktivität von uPA nachgewiesen. UV konnte in WT uPA stimulieren. Diese Stimulation konnte mit dem p38-Inhibitor gesenkt werden. In MK2 defizienten Zellen konnte eine Stimulation von uPA nicht detektiert werden. Die Aktivität von uPA in unstimulierten Zellen war in MK2^{-/-} geringer als in WT. Die Stimulation mit 100 nM PMA, welche von p38 nicht abhängig ist, führte in WT und in MK2^{-/-} zu einer erhöhten Aktivität von uPA.

UV-Strahlung konnte in WT Zellen eine signifikante Erhöhung der Aktivität von uPA stimulieren. Eine Inhibierung der p38 führte zu einer Hemmung der uPA-Stimulation. In MK2-defizienten MEFs war bereits in unstimulierten Zellen eine signifikant gesenkte Basalaktivität von uPA zu beobachten. Diese konnte mit UV nicht stimuliert werden. PMA diente in diesem Versuch als eine p38-unabhängige Positivkontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit PMA (100 nM) eine Erhöhung der Aktivität von uPA sowohl in WT als auch in MK2-defizienten Zellen stattfand (Abb. 7-1).

In einem *Rescue*-Versuch sollte untersucht werden, ob eine Rückführung der MK2 in MK2^{-/-} MEFs die Aktivität von uPA und deren Stimulierbarkeit durch UV restaurieren kann. Dazu wurden die MEFs mit pcDNA3-myc-MK2WT und pEGFP-C1 bzw. nur mit pEGFP-C1 transfiziert, wobei pEGFP-C1 als Transfektionskontrolle diente. Die Transfektionseffizienz, welche anhand der GFP-positiven Zellen durch eine mikroskopische Betrachtung geschätzt wurde, lag bei mind. 40 % der gesamten Zellen. Vor der UV-Stimulation erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit SB203580 (10 µM) bzw. mit DMSO, was als Lösungsmittelkontrolle für SB203580 diente. Der Inhibitor bzw. DMSO war in der anschließenden 24-stündigen Inkubation in SFM enthalten. Die Ergebnisse eines repräsentativen Zymogramms sind in der Abb. 7-2 dargestellt.

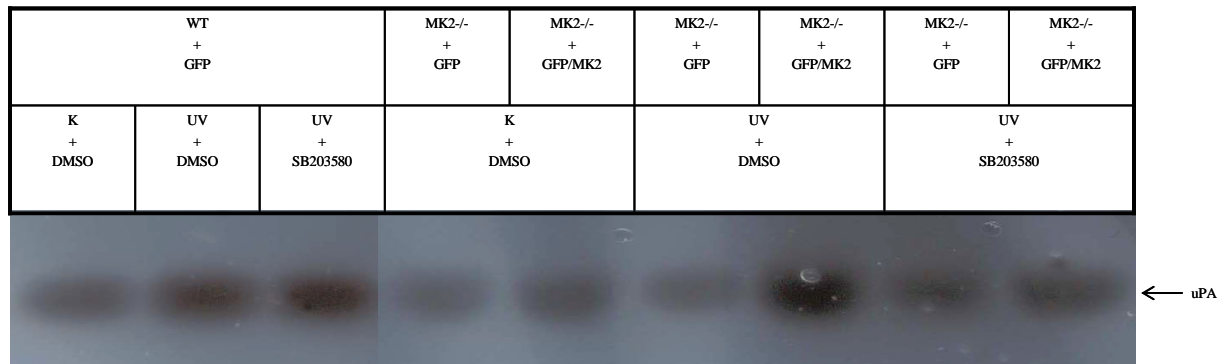


Abbildung 7-2: Restaurierung der uPA-Aktivität durch eine Rückführung der MK2 in die MK2^{-/-} MEFs. Immortalisierte MK2^{-/-} MEFs wurden mit pcDNA3-myc-MK2WT und pEGFP-C1 bzw. nur mit pEGFP-C1 transfiziert. Die WT Zellen wurden mit pEGFP-C1 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit UV (20 J/m²) stimuliert und für 24 h im SFM inkubiert. Eine Stunde vor der Stimulation und während der gesamten Stimulation wurde zu den Zellen SB203580 (10 µM) bzw. DMSO, welches als Lösungsmittel für SB203580 diente, zugegeben. Anschließend wurden die Proteine aus den Zellüberständen ausgefällt und die Aktivität von uPA wurde in einem Zymogramm nachgewiesen. In MK2^{-/-} MEFs, die mit MK2 transfiziert wurden, konnte eine signifikante Stimulation von uPA beobachtet werden. Diese konnte mit SB203580 gehemmt werden.

Durch das Zurückbringen der MK2 in die MK2^{-/-} MEFs konnte die Aktivität von uPA restauriert werden. Der p38-Inhibitor hemmte in diesen Zellen die Aktivität von uPA. In WT Zellen, die als Kontrolle mit GFP transfiziert wurden, konnte eine signifikante Stimulation von uPA beobachtet werden. In den transfizierten WT Zellen wurde keine Inhibierung durch SB203580 beobachtet, was möglicherweise mit der Plasmidpräparation, z. B. einer Kontamination mit LPS zusammenhängen könnte.

In einem weiteren Schritt wurden die Ergebnisse in primären Makrophagen überprüft. Zellen aus dem Knochenmark adulter Mäuse wurden isoliert und durch eine Stimulation mit GM-CSF zu Makrophagen differenziert. Nach ca. einer Woche erreichten die Zellen eine 90%ige Konfluenz und wurden für die Versuche verwendet. Die Stimulation erfolgte mit UV (10 und 20 J/m²) bzw. mit PMA (100 nM). Die Proteine aus den Zellüberständen wurden nach einer 24-stündigen Inkubation in SFM ausgefällt und die uPA-Aktivität wurde in einem Zymogramm detektiert (Abb. 7-3).

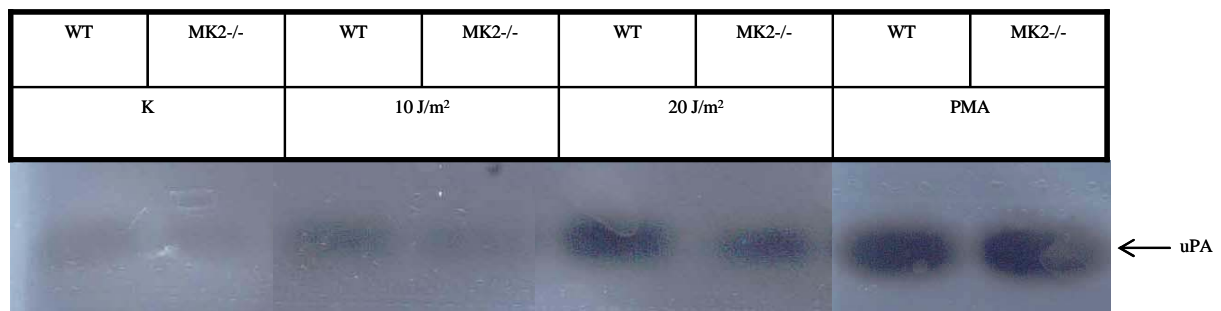


Abbildung 7-3: UV-Stimulation von uPA-Aktivität in primären Makrophagen. Die aus dem Knochenmark adulter Mäuse stammenden primären Makrophagen wurden mit UV (10 bzw. 20 J/m²) bzw. mit PMA (100 nM) stimuliert. Nach einer 24-stündigen Inkubation in SFM wurden die Proteine aus den Zellüberständen ausgefällt und die Aktivität von uPA wurde in einem Zymogramm nachgewiesen. UV stimulierte in WT und in MK2^{-/-} Makrophagen die Aktivität von uPA. Die Stimulation war jedoch in MK2^{-/-} defizienten Zellen signifikant schwächer als in den WT Zellen. PMA stimulierte uPA in WT und in MK2^{-/-} Makrophagen gleich stark.

In primären Makrophagen konnten die Ergebnisse, welche mit immortalisierten MEFs erhalten wurden, bestätigt werden (Abb. 7-3). UV-Strahlung konnte die Aktivität von uPA stimulieren. Im Gegensatz zu immortalisierten MK2^{-/-} MEFs, in denen keine uPA-Stimulation detektiert wurde (Abb. 7-1), konnte in primären MK2-defizienten Makrophagen eine leichte Stimulierung von uPA beobachtet werden. Diese war jedoch signifikant schwächer als in den primären WT Zellen, was mit den Ergebnissen in immortalisierten MEFs korreliert.

7.1.2 Expression von uPA und uPAR auf mRNA-Ebene

Nachdem die Aktivität von uPA mittels Zymogramm präsentiert wurde, sollte seine Expression auf der mRNA-Ebene geprüft werden. Das mRNA-Niveau für uPA und uPAR wurde in immortalisierten Makrophagen untersucht. Hierzu wurden die WT und MK2^{-/-} Zellen mit LPS (1 µg/ml) für 30, 60 und 240 min stimuliert. Danach wurde die RNA isoliert, in einem Formamid/Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Anschließend wurden die uPA- und uPAR-Transkripte in einem Northern Blot detektiert (Abb. 7-4).

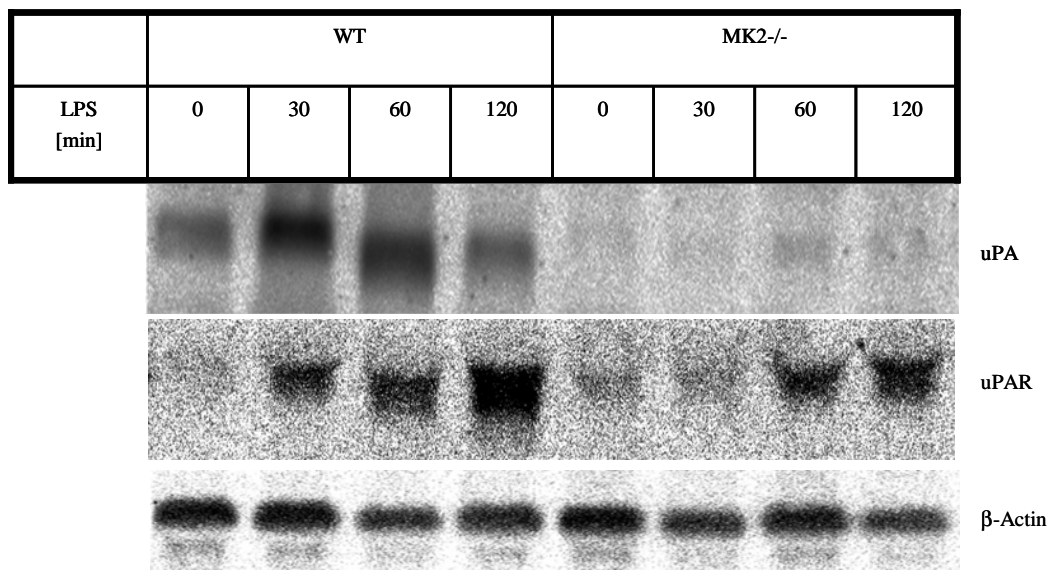


Abbildung 7-4: Northern Blot-Nachweis der LPS-stimulierten Expression von uPA- und uPAR-mRNA. Die immortalisierten Makrophagen WT und MK2^{-/-} wurden mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die RNA wurde isoliert und die mRNA von uPA und uPAR in einem Northern Blot detektiert. Als endogener Standard wurde die mRNA von β-Actin verwendet. Es konnte eine dramatische Senkung der uPA-mRNA in MK2^{-/-} Makrophagen beobachtet werden. Die Menge der uPAR-mRNA war in den MK2^{-/-} Zellen signifikant niedriger als in WT.

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Expression von uPA-mRNA und von uPAR-mRNA nach LPS-Stimulation in WT Zellen erhöht war. Das Maximum von uPA-mRNA wurde bereits nach 30 min erreicht. Nach 240 min konnte keine erhöhte Menge von mRNA detektiert werden. Die Stimulation der Expression von uPAR-mRNA nach einer LPS Behandlung erfolgte, im Vergleich zu uPA-mRNA, deutlich langsamer. Die höchste mRNA-

Menge wurde nach 240 min detektiert. In MK2 defizienten Zellen wurde eine starke Hemmung der uPA-mRNA-Menge und eine schwächere Reduktion der uPAR-mRNA gezeigt.

Es folgte eine Überprüfung der Ergebnisse in primären Makrophagen. Hierzu wurden Zellen aus dem Knochenmark adulter Mäuse isoliert und durch eine Stimulation mit GM-CSF zu Makrophagen differenziert. Nach ca. einer Woche erreichten die Zellen eine 90%ige Konfluenz und wurden für Versuche verwendet. Zusätzlich wurde Aktinomycin D eingesetzt, welches die Transkription blockiert. Das sollte Hinweise auf die Stabilität der mRNAs geben. Neben WT und MK2^{-/-} wurden auch Tristetraprolin TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-} Zellen überprüft. TTP ist ein von MK2 reguliertes Protein, welches an die ARE enthaltenden mRNAs bindet und diese destabilisiert (Dean et al. 2004; Hitti et al. 2006; Tchen et al. 2004). Es sollte überprüft werden, ob TTP auch in die Regulation von uPA-mRNA eingreift, welche ARE in der 3'-nichttranslatierten Region enthält (Abb. 7-5).

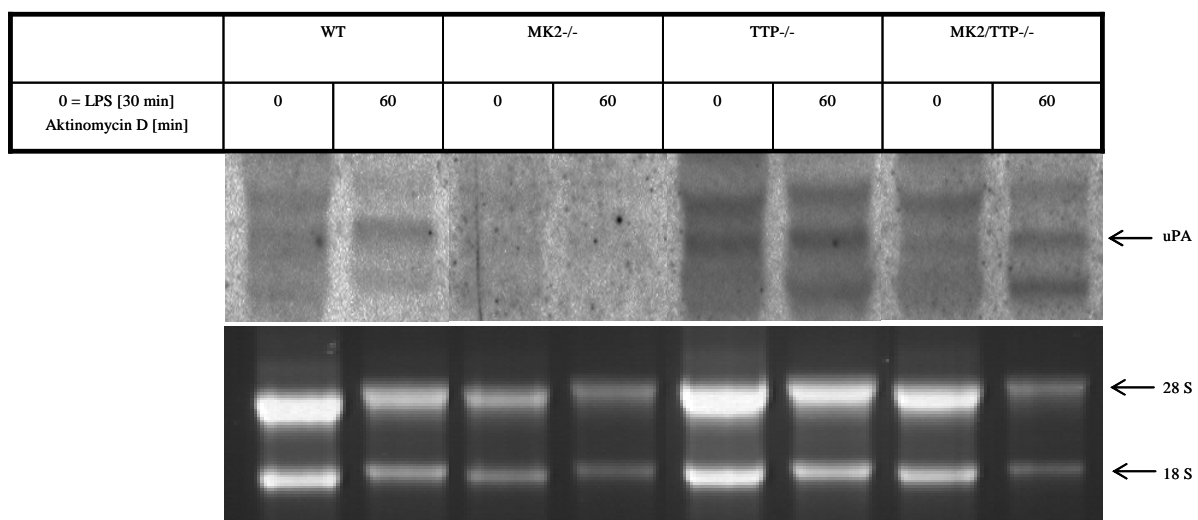


Abbildung 7-5: Die Expression und Stabilität von uPA-mRNA in LPS-stimulierten primären Makrophagen. Die aus dem Knochenmark adulter Mäuse stammenden primären Makrophagen wurden mit LPS (1 µg/ml) für 30 min stimuliert, anschließend wurde Aktinomycin D (2 µg/ml) für weitere 60 min zugegeben. In einem Northern Blot wurde die mRNA von uPA detektiert. In den MK2^{-/-} Zellen konnte nach der LPS-Stimulation keine uPA-mRNA detektiert werden. In den TTP^{-/-} und in den MK2/TTP^{-/-} Zellen war der Level an uPA-mRNA gleich dem in WT-Zellen. Nach dem Transkriptionsstopp durch Aktinomycin D blieb die uPA-mRNA in WT, TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-} stabil.

Die signifikante Reduzierung der uPA-Transkripte in immortalisierten MK2^{-/-} Makrophagen konnte in primären Makrophagen bestätigt werden (Abb. 7-5). Zusätzlich wurde gezeigt, dass beim Fehlen des TTP die Menge von uPA-mRNA nicht verändert wurde. Auch in dem Doppel-*knock-out* konnte keine signifikante Änderung der uPA-mRNA im Vergleich mit WT detektiert werden. Nachdem die Transkription durch Aktinomycin D gehemmt wurde, konnte gezeigt werden, dass die uPA-Transkripte in WT, TTP^{-/-} und in MK2/TTP^{-/-} stabil blieben. Da

die Expression von uPA-mRNA in den MK2^{-/-} Zellen zu gering war, können keine Aussagen über die mRNA Stabilität von uPA in MK2-defizienten Zellen gemacht werden.

7.1.3 Aorta Ring Modell

Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl uPA als auch uPAR in die Angiogenese involviert sind (Blasi and Carmeliet 2002; Pepper 2001). Weiterhin ist auch der p38/MK2-Signalweg sowohl an der Regulation von uPA und von uPAR als auch an der Regulation der Zellmigration beteiligt (Gerthoffer and Gunst 2001; Guay et al. 1997; Han et al. 2002; Hannigan et al. 2001; Hedges et al. 1999; Huang et al. 2000; Kotlyarov et al. 2002; Tran et al. 2003; Yu et al. 2004). Deshalb wurde im nächsten Schritt ein *ex vivo* Modell für die Angiogenese zur Analyse der MK2- und TTP-Defizienz verwendet. Dabei sollte das invasive Verhalten der Endothelzellen aus WT, MK2^{-/-}, TTP^{-/-} und den doppeldefizienten Mäusen verglichen werden. MK5^{-/-} Endothelzellen wurden als eine weitere negative Kontrolle genutzt, da MK5 eine Kinase des ERK3- und nicht des p38-Signalweges ist (Schumacher et al. 2004).

Zunächst wurden Aortastücke aus jeweils zwei WT, MK2^{-/-} und MK5^{-/-} Mäusen isoliert und als dünne Ringe im Matrigel[®] eingebettet. Das Gel wurde mit Endothelzellmedium überschichtet, welches mit EGF (0,1 µg/ml) und ECGS (200 µg/ml) supplementiert wurde. Das Medium wurde jeweils nach drei Tagen erneuert. Die Endothelzellausbreitung wurde nach 14 bzw. 7 und 14 Tagen mikroskopisch dokumentiert (Abb. 7-6 und 7-7).

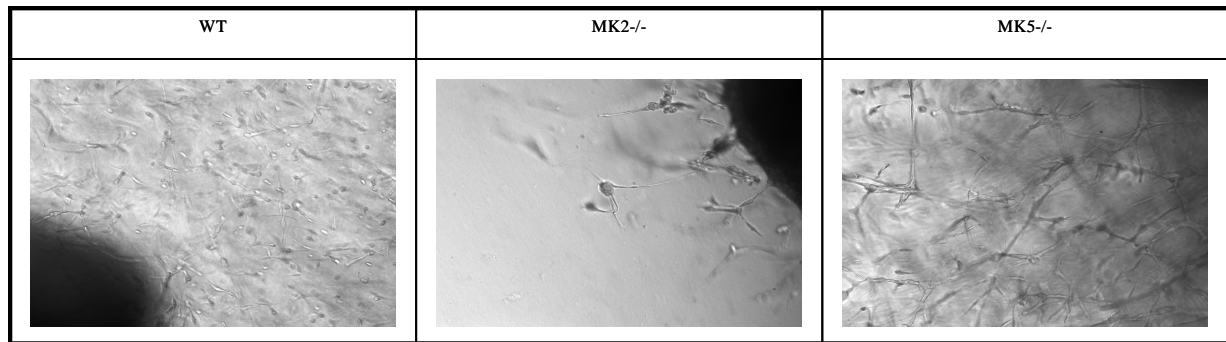


Abbildung 7-6: Das Wachstum von WT, MK2^{-/-} und MK5^{-/-} - Endothelzellen im Matrigel. Die aus den Mäusen präparierten Aortaringe wurden im Matrigel eingebettet und mit Endothelzellmedium, welches EGF (0,1 µg/ml) und ECGS (200 µg/ml) enthält, überschichtet. Das invasive Verhalten der Endothelzellen wurde nach 14 Tagen mikroskopisch dokumentiert. Es wurde jeweils eine repräsentative Abbildung dargestellt. Es konnte eine dramatische Hemmung des Endothelzellwachstums in MK2^{-/-} Mäusen im Vergleich mit WT beobachtet werden. Das Fehlen der MK5 zeigte keine Wirkung auf die Ausbreitung der Endothelzellen.

In MK2-defizienten Mäusen konnte eine signifikante Hemmung des Wachstums und der Ausbreitung der Endothelzellen in diesem Angiogenesemodell beobachtet werden. Während in WT und MK5^{-/-} ein starkes Wachstum und invasives Verhalten der Zellen beobachtet wurde, wuchsen in MK2^{-/-} nur vereinzelte Zellen.

Im einem weiteren Schritt wurden Aortaringe aus WT, MK2^{-/-}, TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-} Mäusen isoliert. Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte wie oben beschrieben. Zusätzlich wurde in diesem Assay der p38-Inhibitor SB203580 (10 µM) und ein spezifischer Inhibitor von uPA, der Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1), (25 ng/ml) eingesetzt.

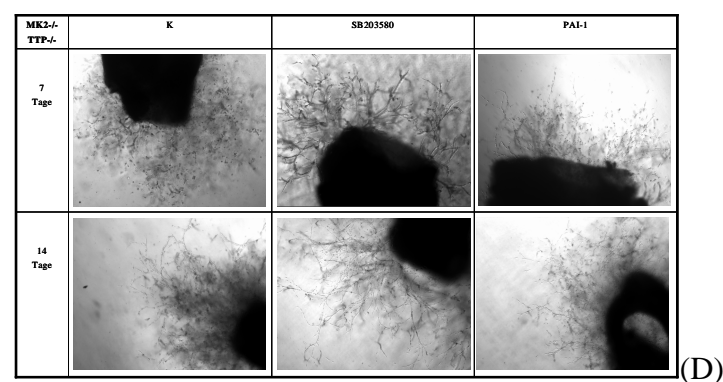
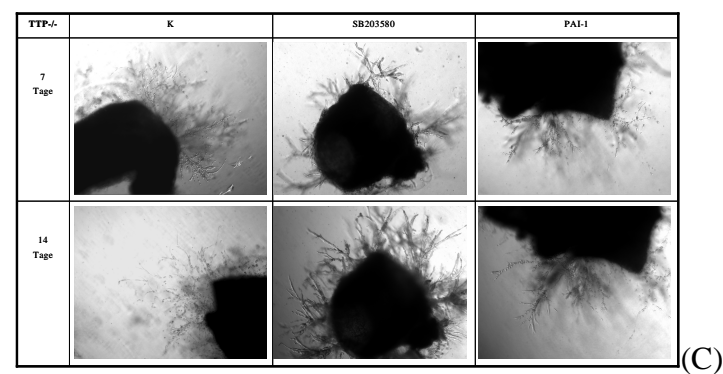
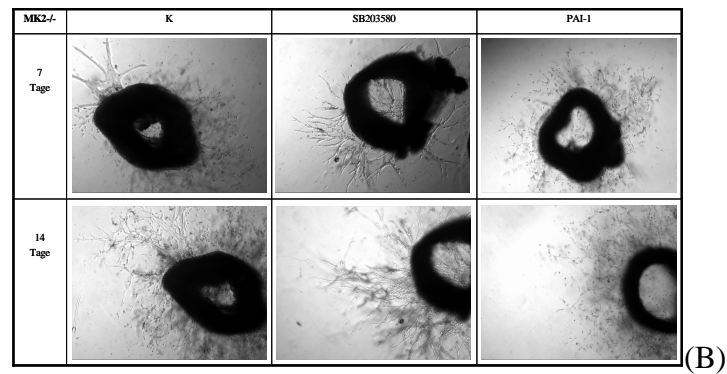
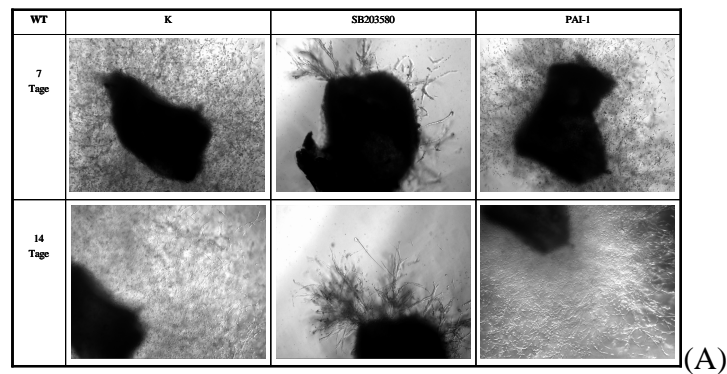


Abbildung 7-7: Das Wachstum der Endothelzellen im Matrigel. Die Aortaringe aus WT (A), MK2^{-/-} (B), TTP^{-/-} (C), und MK2/TTP^{-/-} (D) Mäusen wurden im Matrigel eingebettet und mit Endothelzellmedium, welches EGF (0,1 µg/ml) und ECGS (200 µg/ml) enthielt, überschichtet. Zusätzlich wurde das Medium mit SB203580 (10 µM), PAI-1 (25 ng/ml) oder DMSO, in dem SB203580 gelöst war, supplementiert. Das Wachstum der Endothelzellen wurde nach 7 und nach 14 Tagen mikroskopisch dokumentiert. Es wurde jeweils eine repräsentative Abbildung dargestellt. In MK2^{-/-} Mäusen wurde eine dramatische Hemmung der Endothelzellen beobachtet (B). Das Wachstum der Endothelzellen in TTP^{-/-} (C) und MK2/TTP^{-/-} (D) Mäusen war gehemmt. Eine Inhibierung der p38 durch SB203580 führte in WT zu einer signifikanten Hemmung der Endothelzellen (A). SB203580 zeigte keine Wirkung in dem invasiven Verhalten der Endothelzellen in MK2^{-/-} (B), TTP^{-/-} (C) und MK2/TTP^{-/-} (D). Die veränderte Morphologie der mit SB203580 behandelten WT, MK2^{-/-}, TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-} Zellen ist möglicherweise auf eine Hemmung der glatten Muskelzellen und der Perizyten, welche die Endothelzellen umhüllen, zurückzuführen (A), (B), (C), (D). PAI-1 führte in WT, TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-} zu einer geringen Inhibierung der Endothelzellen (A), (C), (D) und zeigte keine Wirkung in MK2^{-/-} (B).

Das Wachstum und die Ausbreitung der Endothelzellen in TTP^{-/-} und in MK2/TTP^{-/-} Mäusen war im Vergleich zum WT gehemmt, jedoch nicht in dem Maß wie es in MK2^{-/-} Tieren beobachtet wurde. Der spezifische p38-Inhibitor SB203580 konnte die Ausbreitung und das Wachstum der Zellen in WT signifikant hemmen, zeigte jedoch keine Wirkung auf die Endothelzellen in MK2^{-/-}, TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-}. Die Morphologie der mit SB203580 behandelten Zellen war in allen Genotypen verändert, da SB203580 die Umhüllung der Endothelzellen durch glatte Muskelzellen und Perizyten hemmt (Zhu et al. 2003). Dadurch erschienen die mit SB203580 behandelten Zellen glatter, während auf den Kontrollzellen und den mit PAI-1 behandelten Zellen kleinere, morphologisch unterschiedliche Zellen zu beobachten waren. PAI-1 konnte die Ausbreitung der Endothelzellen aus WT, TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-} Mäusen gering hemmen und zeigte keine Wirkung auf das Auswachsen von Endothelzellen aus MK2-defizienten Aortaringen.

Durch den Einsatz von PAI-1 konnte nicht eindeutig demonstriert werden, ob die Ausbreitung der Endothelzellen in dem untersuchten Angiogenesemodell uPA-abhängig ist (Abb. 6-7). Da uPA und andere Komponenten des Urokinase Plasminogen Systems, wie uPAR, Plasmin und PAI-1 auch an der Wundheilung beteiligt sind (Witowsky et al. 2003), sollte die Wirkung von PAI-1 in einem *in-vitro*-Wund-Test überprüft werden. Hierzu wurden in einem Monolayer der immortalisierten WT MEFs Wunden erzeugt. Die Zellen wurden für 24 h in SFM, welches PAI-1 (2,5 ng/ml), SB203580 (10 µM) bzw. DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Die Wunden in dem Zellrasen wurden dann mikroskopisch dokumentiert (Abb. 7-8).

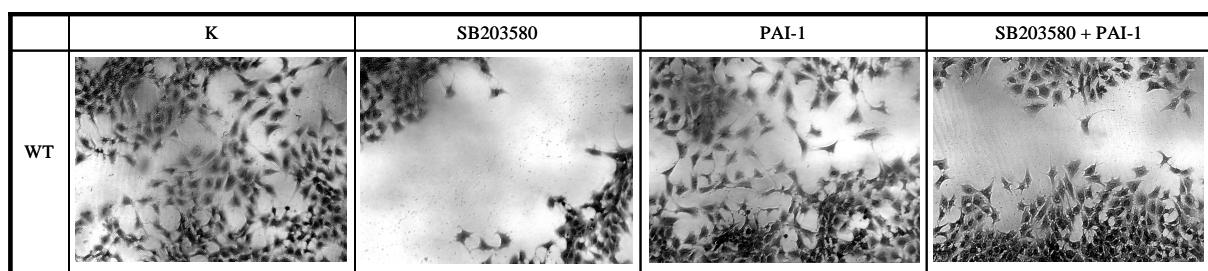


Abbildung 7-8: *In-vitro*-Wund-Test in den immortalisierten WT MEFs. Die Zellen wurden gleichmäßig ausgesät und ca. 12 h vor dem Versuch auf SFM umgesetzt. In dem Zellrasen wurden mit einer Pipettenspitze Wunden erzeugt. Nach einer 24-stündigen Inkubation im SFM, welches SB203580 (10 µM), PAI-1 (2,5 ng/ml) bzw. DMSO das Lösungsmedium für SB203580 enthielt, wurde das Schließen der Wunde mikroskopisch dokumentiert. Eine Inhibierung der p38 führte zu einer signifikanten Hemmung der Wundschließung. Der PAI-1 allein hatte keine Wirkung, zeigte jedoch bei einer gleichzeitigen Inhibierung der p38 eine stimulierende Wirkung.

Die Kontrollzellen konnten die im Zellrasen erzeugte Wunde schließen, was durch eine Inhibierung der p38 verhindert werden konnte. Der Plasminogen Inhibitor (PAI-1) allein zeigte

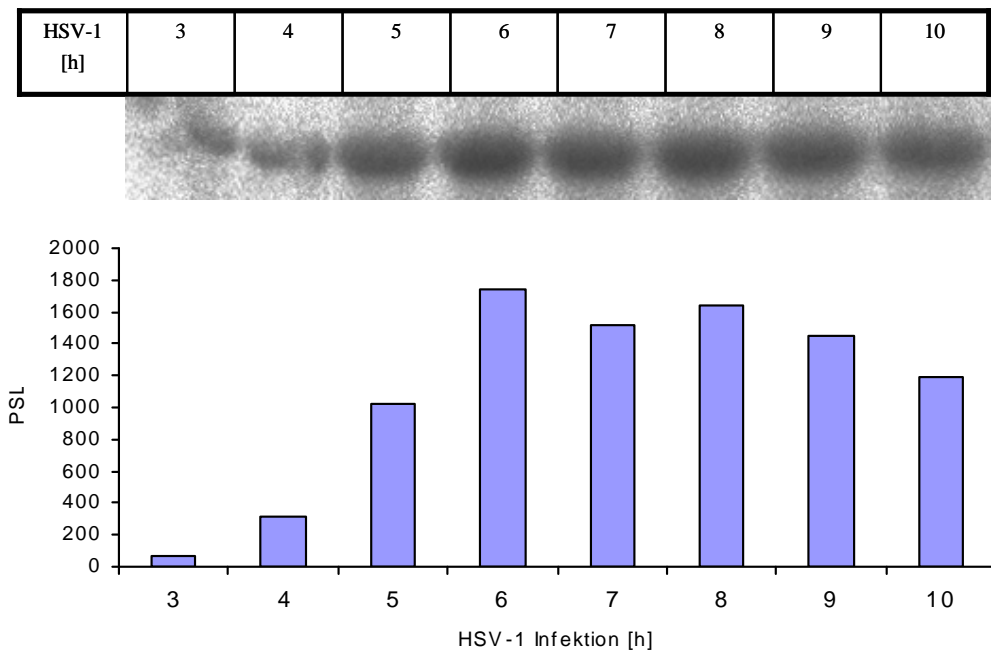
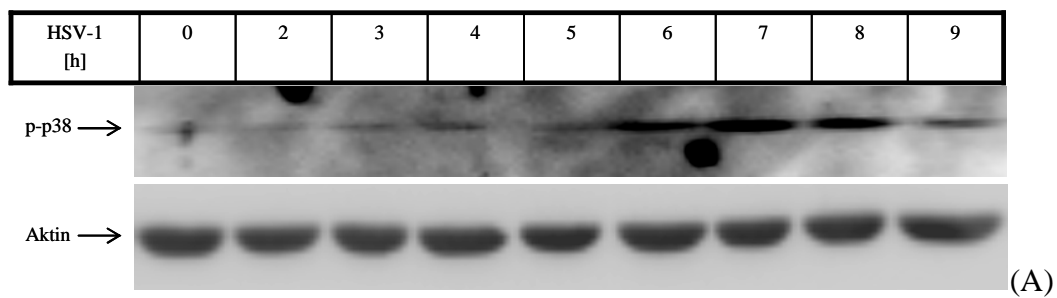
hingegen keine signifikante Wirkung. Bei einer gleichzeitigen Behandlung mit SB203580 wirkte PAI-1 leicht stimulierend auf das Schließen der Wunde.

Sowohl die Ausbreitung der Endothelzellen in dem Aortaringmodell als auch das Schließen der Wunde in dem *in-vitro*-Wund-Test waren stark p38-, jedoch nicht eindeutig uPA-abhängig.

7.2 Die Rolle von MK2 bei der Virusinfektion

7.2.1 Aktivierung von p38 und MK2 durch HSV-1

Viren, wie HSV-1 (Hargrett et al. 2005; Zachos et al. 1999) oder Epstein-Barr Virus (Adamson et al. 2000), sind in der Lage in der Wirtszelle p38 zu aktivieren. Um die Rolle der MK2 bei der HSV-1-Infektion zu untersuchen, sollte zunächst die Aktivierung von p38 und von MK2 durch HSV-1 überprüft werden. Hierzu wurden primäre WT MEFs mit dem HSV-1-Stamm KOSTk12 mit einer MOI von 20 PFU/Zelle für verschiedene Zeitintervalle infiziert und anschließend lysiert. Die Phosphorylierung der p38 wurde mittels Western Blot überprüft. Es wurden spezifische Antikörper benutzt, die ausschließlich die doppelte Phosphorylierung der p38 sowohl am Threonin 180 als auch am Tyrosin 182 erkennen können (Abb. 7-9A). Die Aktivierung von MK2 wurde in einem Kinase Assay detektiert. Hierzu wurde die Phosphorylierung von Hsp25, das ein direktes Substrat für MK2 ist (Kotlyarov and Gaestel 2002), als ein Reporter für die Aktivierung von MK2 verwendet (Abb. 7-9B).



(B)

Abbildung 7-9: Aktivierung von p38 und von MK2 durch HSV-1. Primäre MEFs wurden mit HSV-1-KOSTk12 (20 PFU/Zelle) infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung von p38 wurde mittels Western Blot (A) und die Aktivität von MK2 mittels Kinase Assay (B) untersucht. Die stärkste Phosphorylierung von p38 wurde zwischen 6 und 8 Stunden nach der Infektion detektiert (A). Die höchste MK2-Aktivität lag zwischen 6 und 8 h.

Es konnte bestätigt werden, dass HSV-1 p38 aktivieren kann. Die Phosphorylierung der p38 erreichte ihr Maximum zwischen 6 und 8 Stunden. Die Aktivierung der MK2 war zwischen 6 und 8 Stunden nach der Infektion am höchsten. Somit aktiviert HSV-1-Infektion in primären MEFs den p38/MK2-Signalweg.

7.2.2 Expression von Tristetraprolin (TTP)

Da HSV-1 den p38/MK2-Signalweg aktivieren kann, sollte in einem weiteren Schritt die Expression von TTP, eines der MK2 Substrate, bei einer HSV-1 Infektion überprüft werden. TTP führt zu einer Destabilisierung der AREs in der 3'-nichtranslatierten Region enthaltenden mRNAs (Esclatine et al. 2004b). In unstimulierten Zellen ist die TTP-Expression schwach und kann bei Stress, sowie durch LPS, Arsenit oder PMA stimuliert werden (Carballo et al. 2001; Carrick et al. 2004; Mahtani et al. 2001; Taylor et al. 1996; Tchen et al. 2004).

Zunächst sollte die TTP Expression in infizierten primären und immortalisierten MEFs in einem Western Blot überprüft werden. Hierzu wurden die Zellen für verschiedene Zeitintervalle mit dem HSV-1(KOS)tk12-Stamm mit einer MOI von 20 PFU/Zelle infiziert. Da die TTP^{-/-} Mäuse immer durch eine Kreuzung zweier Heterozygoten (TTP^{+/-}) gezüchtet wurden, wurden hier WT-Kontrollzellen, welche aus den dabei entstandenen TTP^{+/+} Mäusen isoliert wurden, genutzt. Sowohl bei den WT als auch bei den TTP^{+/+} Mäusen handelt es sich um den Black6-Stamm. Die Zellen wurden eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion mit SB203580 (10 μ M) bzw. DMSO, welches als Lösungsmedium für SB203580 diente, behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und TTP in den Proteinlysaten mittels Western Blot detektiert.

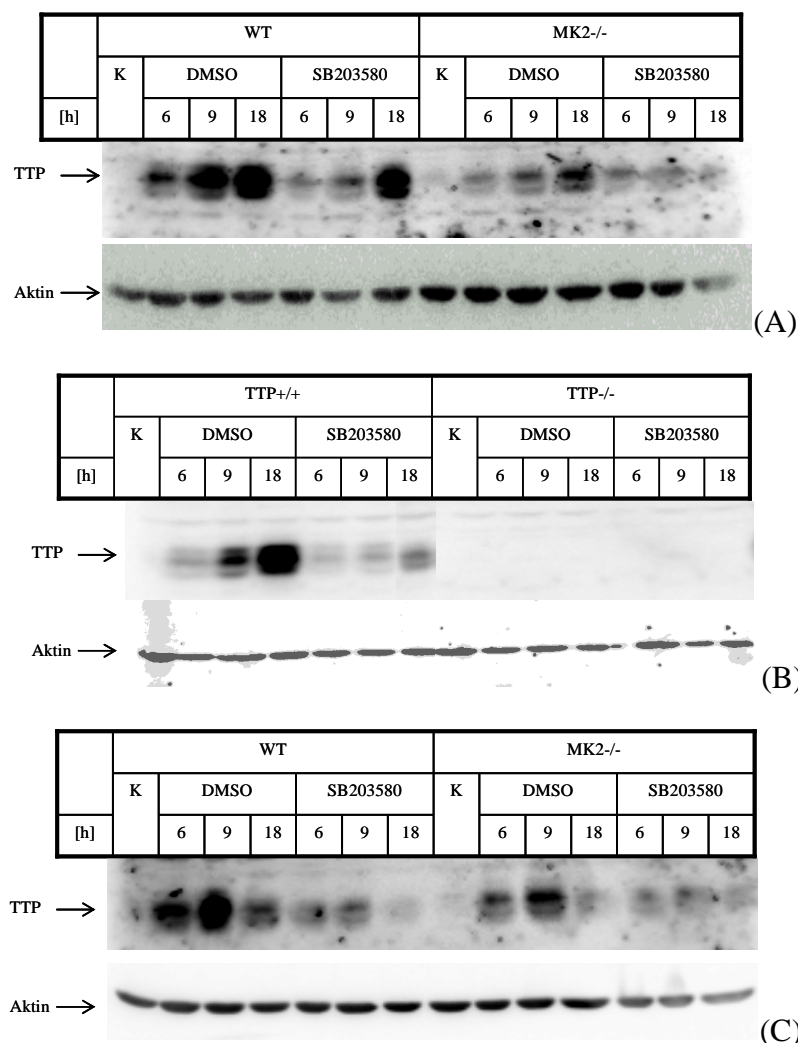


Abbildung 7-10: Expression von TTP in den HSV-1-infizierten MEFs. Primäre WT und MK2^{-/-} MEFs (A), primäre TTP^{+/+} und TTP^{-/-} MEFs (B) und immortalisierte WT und MK2^{-/-} MEFs (C) wurden mit der HSV-1(KOS)tk12 (MOI 20 PFU/Zelle) infiziert. Eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion wurden die Zellen mit SB203580 (10 μ M) bzw. der gleichen Menge von DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von TTP überprüft. Eine HSV-1 Infektion führte zu einer starken TTP-Expression. Diese war in den MK2^{-/-} Zellen signifikant gehemmt. Bei der Inhibierung der p38 mit SB203580 war die TTP-Expression in den WT Zellen gesenkt.

Sowohl in den primären als auch in den immortalisierten WT MEFs simulierte HSV-1 die TTP-Expression (Abb. 7-10). Durch eine Inhibierung der p38 durch SB203580 konnte die

Expression von TTP in den infizierten MEFs signifikant gehemmt werden. In den MK2 defizienten Zellen war die TTP-Expression deutlich schwächer als in den WT Zellen und konnte weiter mit SB203580 inhibiert werden.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Expression von TTP nach einer HSV-1 Infektion in den MEFs fibroblastenspezifisch ist, wurde die Expression von TTP in immortalisierten Makrophagen in einem Western Blot überprüft.

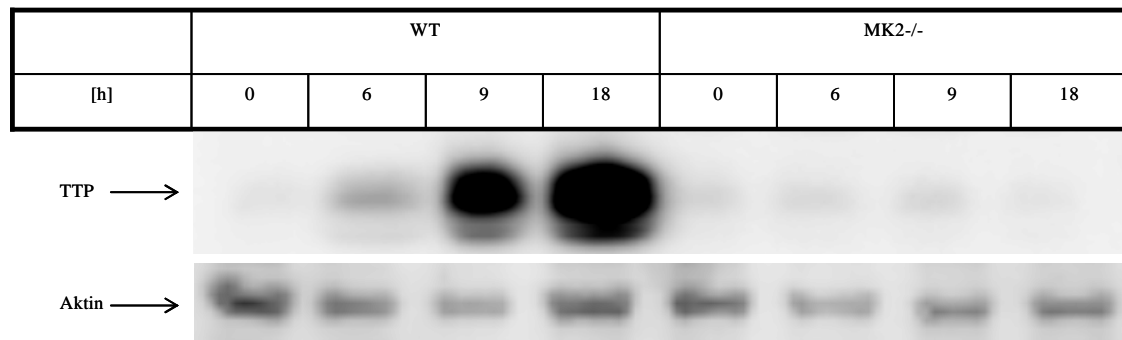


Abbildung 7-11: Expression von TTP in den HSV-1-infizierten immortalisierten Makrophagen. Zellen wurden mit HSV-1(KOS)tk12 (MOI 35 PFU/Zelle) infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von TTP überprüft. Eine HSV-1 Infektion führte zu einer Erhöhung der TTP-Expression. Diese war in den MK2-/- Zellen signifikant gehemmt.

Auch in immortalisierten Makrophagen konnte HSV-1 die Expression von TTP stimulieren. In den MK2-defizienten Zellen dagegen war die TTP-Expression fast vollständig gehemmt (Abb. 7-11).

Zur Überprüfung, ob die beobachtete Stimulation von TTP durch HSV-1(KOS)tk12 von dem speziellen Mutantenstamm abhängt, wurden fünf verschiedenen Stämme von HSV-1 verglichen. Hierzu wurden die primären WT MEFs mit HSV-1-(KOS), HSV-1-(F), HSV-1-(17⁺), HSV-1(KOS)tk12 und einer weiteren Mutante vHSV-(17⁺)blue infiziert. Die Expression von TTP wurde in einem Western Blot qualitativ überprüft.

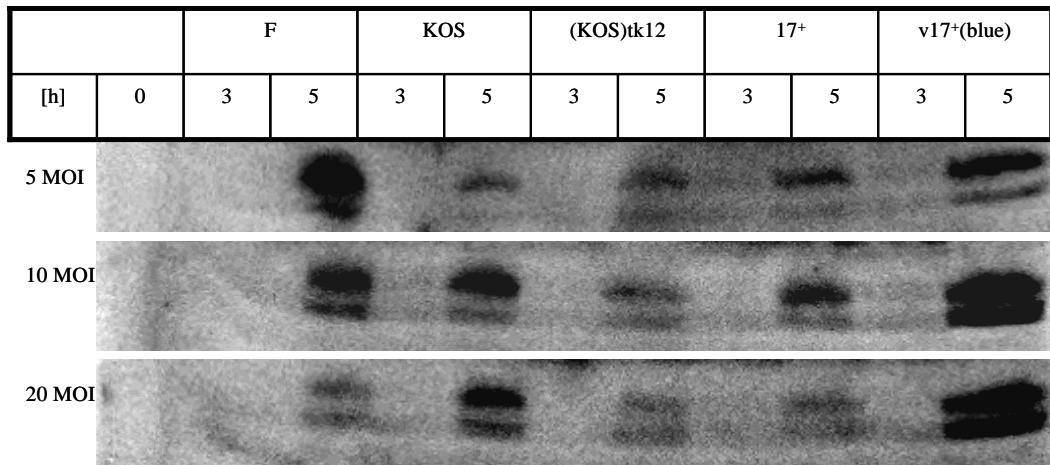


Abbildung 7-12: Expression von TTP in primären MEFs nach einer Infektion mit verschiedenen HSV-1-Stämmen. Primäre WT MEFs wurden mit HSV-1-F, -KOS, -(KOS)tk12, -17⁺ und -v17⁺(blue) jeweils mit MOI 5, 10 oder 20 PFU/Zelle für 3 oder 5 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Expression von TTP überprüft. Alle fünf HSV-1-Stämme konnten eine TTP-Expression stimulieren.

Es konnte gezeigt werden, dass alle fünf Stämme des HSV-1 die TTP-Expression stimulieren können (Abb. 7-12). Die zuvor beobachtete Stimulation von TTP durch HSV-1(KOS)tk12 (Abb. 7-10 und 7-11) ist eindeutig nicht von der speziellen Mutante abhängig.

7.2.3 Nachweis von TTP mRNA in primären WT und MK2^{-/-} MEFs

In einem Northern Blot wurde die mRNA von TTP in infizierten primären WT und MK2^{-/-} MEFs untersucht. Hierzu wurden die Zellen in Anwesenheit des p38-Inhibitors SB203580 oder des DMSO für unterschiedliche Zeitintervalle mit HSV-1-KOS (MOI 20 PFU/Zelle) infiziert. Anschließend wurde die RNA der infizierten Zellen isoliert und mittels Northern Blot die TTP-mRNA detektiert.

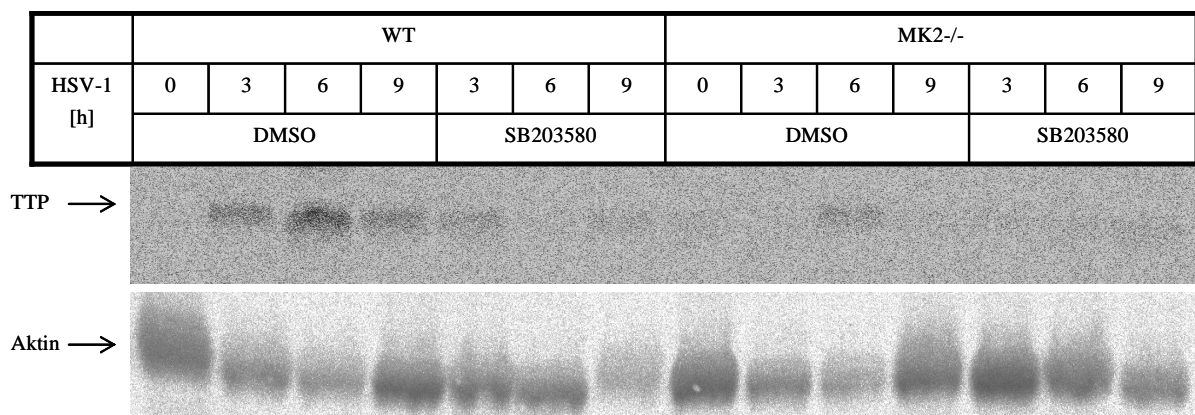


Abbildung 7-13: TTP-mRNA in primären WT und MK2^{-/-} MEFs. Zellen wurden mit HSV-1-KOS (MOI 20 PFU/Zelle) infiziert. Anschließend wurde die RNA isoliert, aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die TTP-mRNA wurde in einem Northern Blot detektiert. Die Transkription von TTP in WT erreichte ihr Maximum 6 h nach der Infektion und konnte mit SB203580 signifikant inhibiert werden. Die TTP-mRNA in den infizierten MK2^{-/-} Zellen war signifikant niedriger. Als Ladungskontrolle wurde die Aktin-mRNA dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge von TTP in mit HSV-1-(KOS)-infizierten WT Zellen nach einer sechsstündigen Infektion am höchsten ist (Abb 7-13). Durch den spezifischen p38 Inhibitor SB203580 konnte das TTP mRNA-Niveau gesenkt werden. In infizierten MK2-/- Zellen konnte nur eine sehr geringe Menge von TTP mRNA detektiert werden, was möglicherweise auf eine gesenkte Stabilität der TTP-mRNA zurückzuführen ist.

7.2.4 Stimulation von TTP durch andere Viren

Es sollte überprüft werden, ob eine Stimulation von TTP HSV-1-spezifisch ist oder ob auch andere Viren TTP stimulieren können und es sich dabei somit um ein generelles Phänomen bei einer Virusinfektion handelt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit dem Masernvirus (MV), dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV) und dem Canine Distemper Virus (CDV) infiziert. Es handelt sich hier um RNA-Viren mit einem einzelsträngigen Genom. Das Masernvirus ist ein humanpathogenes Paramyxovirus. Das CDV ist ein masernähnliches RNA-Virus, das Hunde infiziert. Das VSV gehört zu den Rhabdoviren und infiziert sowohl Tiere wie Pferde, Rinder, Schweine als auch den Menschen. Die HEK293 Zellen wurden nach der Infektion lysiert, die Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Mit spezifischen Antikörpern wurde die Expression von TTP überprüft. Als Ladungskontrolle diente Aktin.

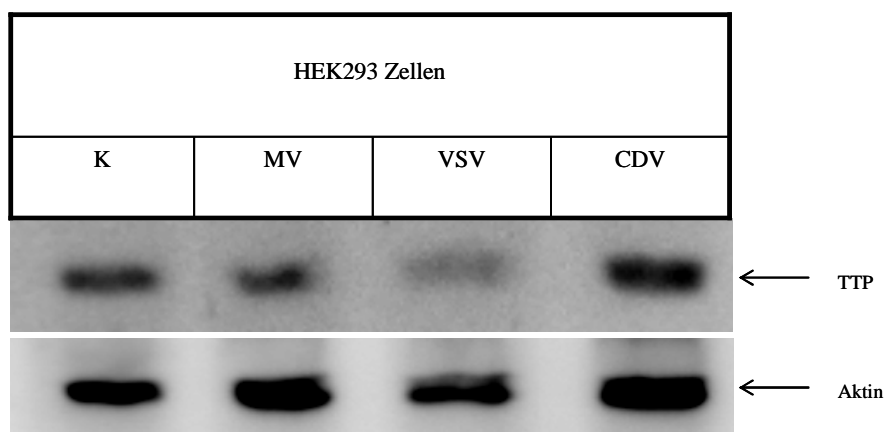


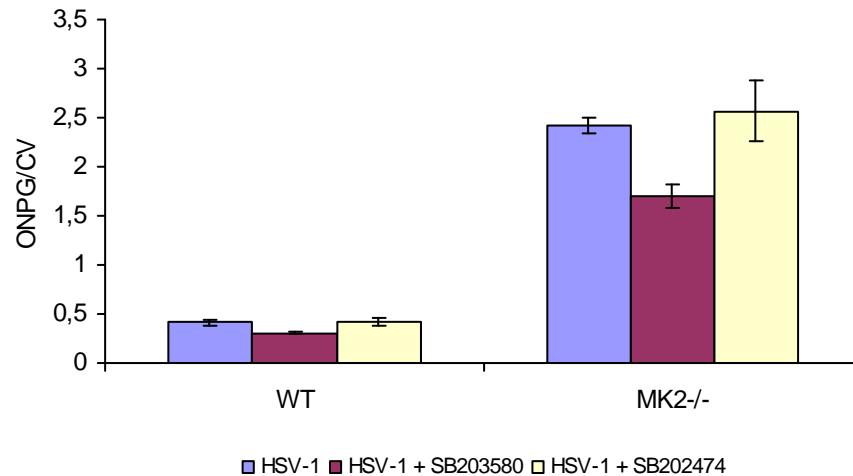
Abbildung 7-14: TTP-Expression in den mit dem Masernvirus (MV), dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV) und dem Canine Distemper Virus (CDV) infizierten und in nicht-infizierten (K) HEK293 Zellen. Zellen wurden infiziert und anschließend lysiert. In einem Western Blot wurde die Expression von TTP überprüft. Als Ladungskontrolle diente die Expression von Aktin. Während eine Infektion mit MV und mit CDV keine Wirkung auf TTP zeigte, konnte VSV die Expression von TTP leicht hemmen.

Durch eine Infektion mit den ausgewählten RNA-Viren konnte im Gegensatz zu HSV-1 keine erhöhte Expression von TTP beobachtet werden. Bei einer Infektion mit dem Masernvirus und dem Canine Distemper Virus wurden keine Veränderungen in der TTP-Expression beobachtet. Vesicular Stomatitis Virus wirkte sich auf die TTP-Expression leicht inhibierend aus (Abb. 7-14). Untypisch in diesem Western Blot ist jedoch die unstimulierte Kontrolle: es ist bekannt,

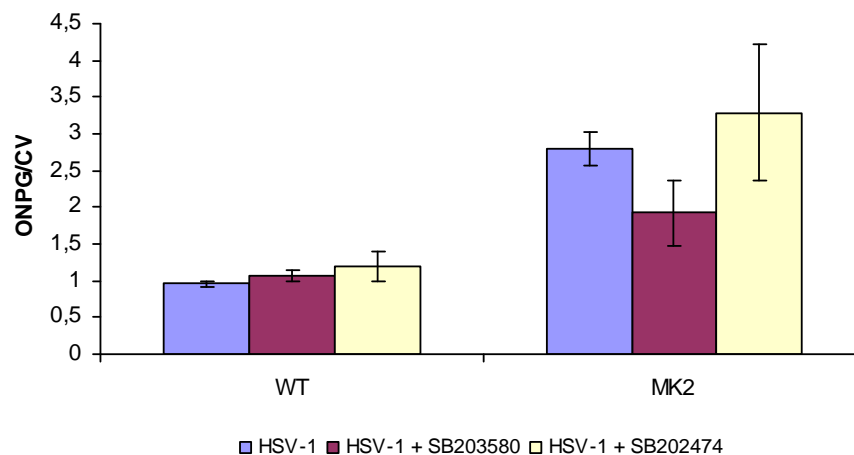
dass TTP in unstimulierten Zellen schwach exprimiert wird (Carballo et al. 2001; Carrick et al. 2004; Mahtani et al. 2001; Taylor et al. 1996; Tchen et al. 2004). Eventuell könnte das mit einer infektionsbedingten Zellkultur oder einer Kontamination des Mediums mit Bakterien (LPS) zusammenhängen.

7.2.5 Viruseintritt

TTP wirkt mRNA-destabilisierend, was die Menge der durch Wirtszellen produzierten antiviralen Zytokine beeinflussen könnte. Das könnte sich bereits beim Viruseintritt in den verschiedenen Zellen bemerkbar machen. Daher wurde im nächsten Schritt in einem Genreporter-Assay untersucht, ob der Viruseintritt in den verschiedenen Zellen WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} verändert ist. Hierzu wurde eine HSV-1(KOS)tk12-Mutante genutzt, die das bakterielle *LacZ*-Gen unter der Kontrolle des ICP4-Promotors besaß. ICP4 ist eines der *immediate-early* (IE)-Proteine, die unmittelbar nach dem Viruseintritt in den Zellen exprimiert werden. Der Viruseintritt mittels β -Gal-Assay wurde zunächst in immortalisierten WT und MK2^{-/-} MEFs und Makrophagen überprüft. Die Zellen wurden zunächst in 24 Well Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 90 % mit HSV-1(KOS)tk12 inokuliert. Nach einer insgesamt fünfstündigen Infektion mit dem HSV-1(KOS)tk12 wurde die β -Gal-Aktivität gemessen. Eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion wurden die Zellen mit dem spezifischen p38 Inhibitor SB203580 (10 μ M) bzw. seiner gegenüber p38 inaktiven Form SB202474 (10 μ M) behandelt. Der Viruseintritt war in den MK2^{-/-} Zellen fünfmal höher als den in den WT Zellen. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind in der Abb. 7-15 zusammengefasst.



A: Viruseintritt in immortalisierten MEFs



B: Viruseintritt in immortalisierten Makrophagen

Abbildung 7-15: Viruseintritt in immortalisierten MEFs und Makrophagen in einem Genreporter-Assay. Zellen wurden in der gleichen Zellzahl am Vortag in 24 Well Platten ausgesät. Bei einer 90%igen Konfluenz wurden die immortalisierten MEFs (A) mit $5 \cdot 10^6$ PFU/Well und die immortalisierten Makrophagen (B) mit $3 \cdot 10^6$ PFU/Well des HSV-1(KOS)tk12 infiziert. Eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion wurden die Zellen mit SB203580 (10 μ M) bzw. einer p38-inaktiven Form SB202474 (10 μ M) behandelt. Nach einer insgesamt 5-stündigen Infektion wurde die β -Gal-Aktivität mittels ONPG-Messung bestimmt. Parallel wurde jeweils eine weitere Platte gleich behandelt und es wurde die Zelldichte mittels Kristallviolett (CV) ermittelt. Für die Auswertung wurde der ONPG-Wert durch die Zelldichte (CV) dividiert. Der Viruseintritt in den MK2^{-/-} MEFs war fünffach höher als in den WT MEFs (A). In den Makrophagen war der Viruseintritt in den MK2^{-/-} Zellen zweieinhalb Mal höher als in WT (B). Der p38-Inhibitor zeigte in den WT Zellen keine und in den MK2^{-/-} Zellen eine schwach senkende Wirkung (A), (B).

Es konnte sowohl in den immortalisierten MEFs als auch in den immortalisierten Makrophagen gezeigt werden, dass der Viruseintritt in MK2 defizienten Zellen im Vergleich zu WT signifikant erhöht ist. Eine Inhibierung der p38 führte in den MK2 defizienten Zellen zu einer leichten Hemmung des Viruseintrittes und zeigte in den WT Zellen keine Wirkung.

Parallel dazu wurde der Viruseintritt in den immortalisierten p38^{+/+} und p38^{-/-} MEFs überprüft.

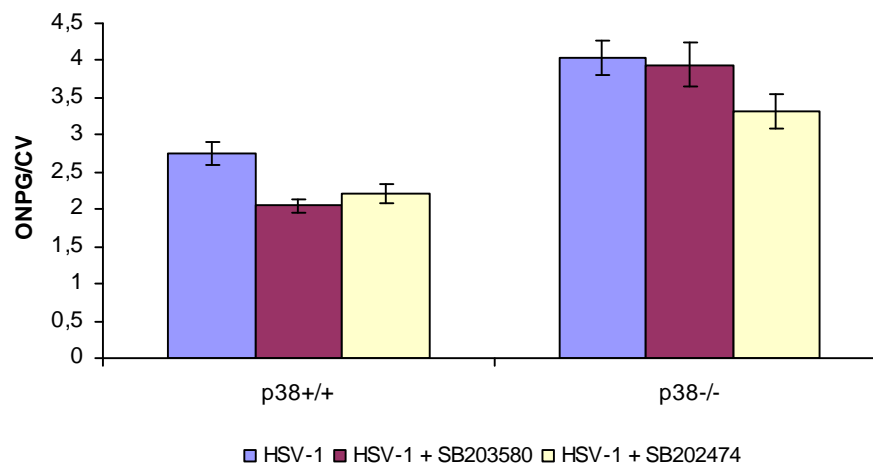
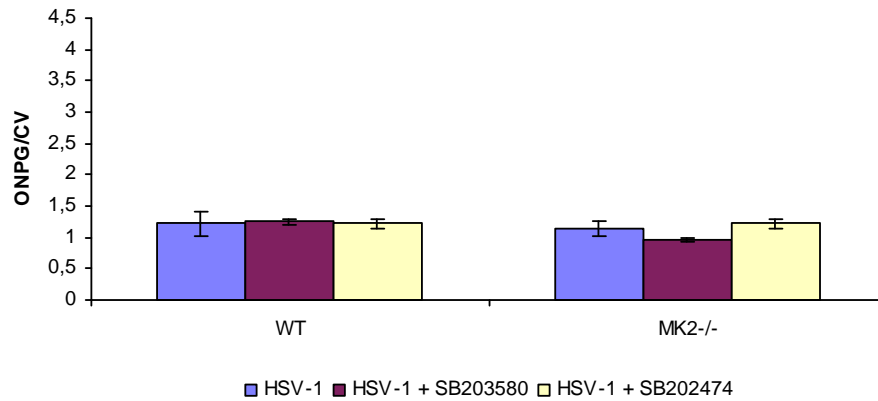


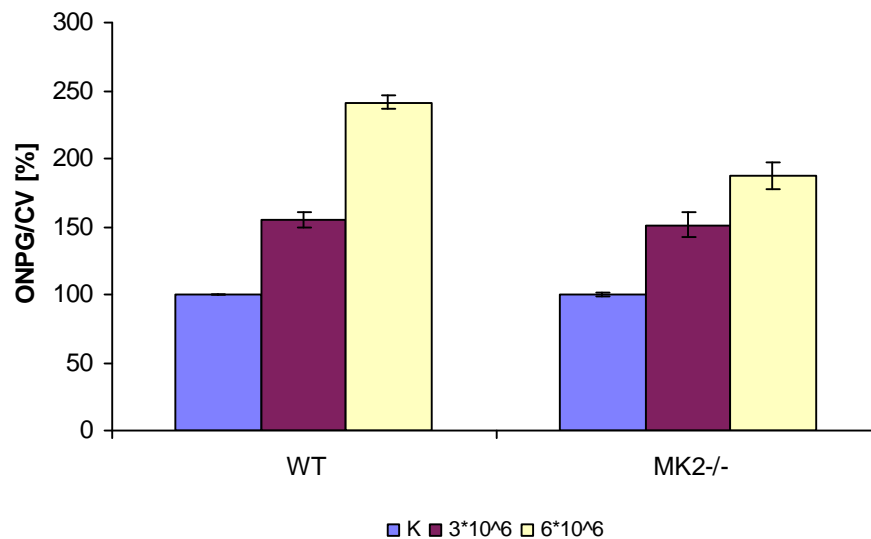
Abbildung 7-16: Viruseintritt in immortalisierten p38^{+/+} und p38^{-/-} MEFs in einem Genreporter-Assay. Zellen wurden in der gleichen Zellzahl am Vortag in 24 Well Platten ausgesät. Bei einer 90%igen Konfluenz wurden die immortalisierten MEFs p38^{+/+} und p38^{-/-} mit $6 \cdot 10^6$ PFU/Well des HSV-1(KOS)tk12 infiziert. Eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion wurden die Zellen mit 10 μ M SB203580 bzw. einer p38-inaktiven Form SB202474 (10 μ M) behandelt. Nach einer insgesamt 5-stündigen Infektion wurde die β -Gal-Aktivität mittels ONPG-Messung bestimmt. Parallel wurde jeweils eine weitere Platte gleich behandelt und die Zelldichte mittels Kristallviolett (CV) ermittelt. Für die Auswertung wurde der ONPG-Wert durch die Zelldichte (CV) dividiert. Der Viruseintritt war in den p38 defizienten Zellen um ca. 50 % im Vergleich zu p38^{+/+} erhöht. SB203580 führte zu einer leichten Hemmung in den p38^{+/+} Zellen. In p38^{-/-} Zellen konnte keine Wirkung beobachtet werden.

Der Viruseintritt in die p38^{-/-} Zellen war um 50 % im Vergleich zu den p38^{+/+} Zellen erhöht (Abb. 7-16). Der SB203580 konnte den Viruseintritt in die p38^{+/+} Zellen nur leicht hemmen und zeigte in p38^{-/-} Zellen keine Wirkung.

Eine weitere Überprüfung erfolgte in primären MEFs und Makrophagen.



(A) Viruseintritt in primären MEFs



(B) Viruseintritt in primären Makrophagen

Abbildung 7-17: Viruseintritt in primären MEFs und Makrophagen in einem Genreporter-Assay. Zellen wurden in der gleichen Zellzahl am Vortag in 24 Well Platten ausgesät. Bei einer 90%igen Konfluenz wurden die primären MEFs (A) mit $5 \cdot 10^6$ PFU/Well und die primären Makrophagen (B) mit $3 \cdot 10^6$ bzw. $6 \cdot 10^6$ PFU/Well des HSV-1(KOS)tk12 infiziert. Eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion wurden die primären MEFs mit $10 \mu\text{M}$ SB203580 bzw. einer p38-inaktiven Form SB202474 ($10 \mu\text{M}$) behandelt (A). Nach einer insgesamt 5-stündigen Infektion wurde die β -Gal-Aktivität mittels ONPG-Messung bestimmt. Parallel wurde jeweils eine weitere Platte gleich behandelt und es wurde die Zelldichte mittels Kristallviolett (CV) ermittelt. Für die Auswertung wurde der ONPG-Wert durch die Zelldichte (CV) dividiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen den WT und den MK2^{-/-} Zellen im Viruseintritt beobachtet werden. Eine Inhibierung der p38 wirkte sich auf den Viruseintritt nicht aus.

Sowohl in primären MEFs als auch in primären Makrophagen konnten keine Unterschiede im Viruseintritt beobachtet werden (Abb. 7-17). Eine Behandlung der Zellen mit SB203580 führte zu keiner signifikanten Veränderung des Viruseintrittes. Damit konnte gezeigt werden, dass die veränderte TTP-Expression in den unterschiedlichen Zellen, WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} keinen Einfluß auf den Viruseintritt hat.

Die Ergebnisse in immortalisierten MEFs wurden in primären Zellen nicht bestätigt. Offensichtlich war der beobachtete Effekt für die immortalisierten Zelllinien spezifisch. Um zu

überprüfen, in wie weit der beobachtete Effekt in immortalisierten Zellen von der Immortalisierung abhing und ausschließlich auf diese Zelllinien beschränkt war, wurden neue Klone von immortalisierten WT und MK2^{-/-} MEFs generiert. Hierzu wurden die primären WT und MK2^{-/-} Zellen mit dem *SV40 T large antigen* (pSV40-Tag) und dem Histidinolresistenzgen (pREP8) kotransfiziert. Die Selektion der nicht transfizierten Zellen erfolgte durch eine Zugabe von Histidinol (3 μ M) zu dem Kulturmedium für ca. drei Wochen. Anschließend wurden mehrere Klone isoliert und weiterkultiviert. In dem Genreporter-Assay wurden Unterschiede zwischen jeweils zwei Klonen eines Genotyps nachgewiesen (Abb. 7-18).

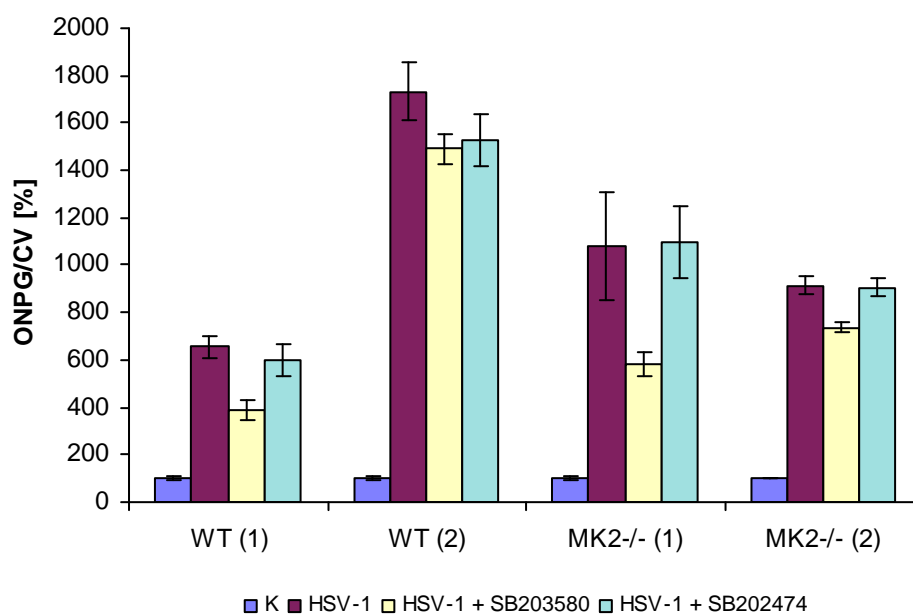


Abbildung 7-18: Viruseintritt in verschiedene Klone der immortalisierten WT und MK2-defizienten MEFs. Durch eine Transfektion mit dem großen T-Antigen des SV40 wurden neue Klone von immortalisierten MEFs generiert. In einem β -Gal-Assay wurde der Viruseintritt verglichen. Eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion wurden die primären MEFs mit SB203580 (10 μ M) bzw. einer p38-inaktiven Form SB202474 (10 μ M) behandelt (A). Nach einer insgesamt 5-stündigen Infektion wurde die β -Gal-Aktivität mittels ONPG-Messung bestimmt. Parallel wurde jeweils eine weitere Platte gleich behandelt und es wurde die Zelldichte mittels Kristallviolett (CV) ermittelt. Für die Auswertung wurde der ONPG-Wert durch die Zelldichte (CV) dividiert. Während die zwei MK2^{-/-} Klone keine signifikanten Abweichungen aufwiesen, unterschieden sich die WT-Klone stark. Der Viruseintritt war in dem neuen Klon ca. dreifach stärker als im alten Klon.

Es konnte gezeigt werden, dass die Transformation der Zellen ihr Verhalten stark beeinflussen kann. Während sich die zwei MK2^{-/-} Klone ähnlich verhielten, variierte der gemessene Viruseintritt in den zwei unterschiedlichen WT-Klonen signifikant.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der p38/MK2-Signalweg offensichtlich keinen Einfluß auf den Viruseintritt hat und die in immortalisierten Zellen beobachteten Effekte mit der Immortalisierung im Zusammenhang stehen.

7.2.6 Plaquebildung

Die Bildung von Plaques ist ein wichtiges morphologisches Merkmal einer Virusinfektion, das früh in der Infektion beobachtet werden kann. Die infizierten Zellen kugeln sich ab und so entstehen sichtbare Plaques. Im weiteren Verlauf der Infektion tritt der cytopathische Effekt ein, d.h. die Zellen lösen sich von der Matrix und von den anderen Zellen ab. Auf diese Weise entstehen zellfreie Areale. Während der Viruseintritt in den WT und MK2^{-/-} Zellen nicht verändert ist, könnten die Vermehrung und die Ausbreitung der Viren in den verschiedenen Genotypen unterschiedlich sein. Deshalb sollte die Bildung und die Größe der Plaques in infizierten primären WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} MEFs verglichen werden. Hierzu wurden die Zellen mit einer Mutante von HSV-1, die das autofluoreszierende GFP exprimiert, mit einer MOI von 0,001 PFU/Zelle infiziert. Die Zellen wurden eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion mit dem Inhibitor SB203580 (10 µM) bzw. mit DMSO behandelt. Nach einer 48-stündigen Infektion wurden die Plaques mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert (Abb. 7-19).

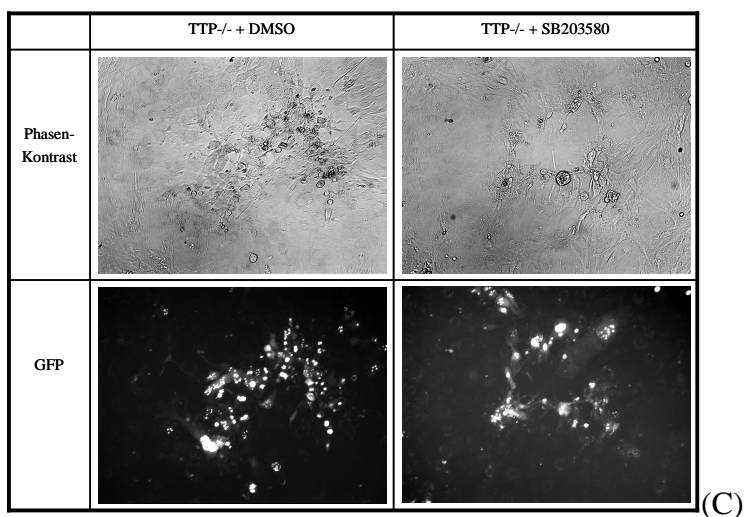
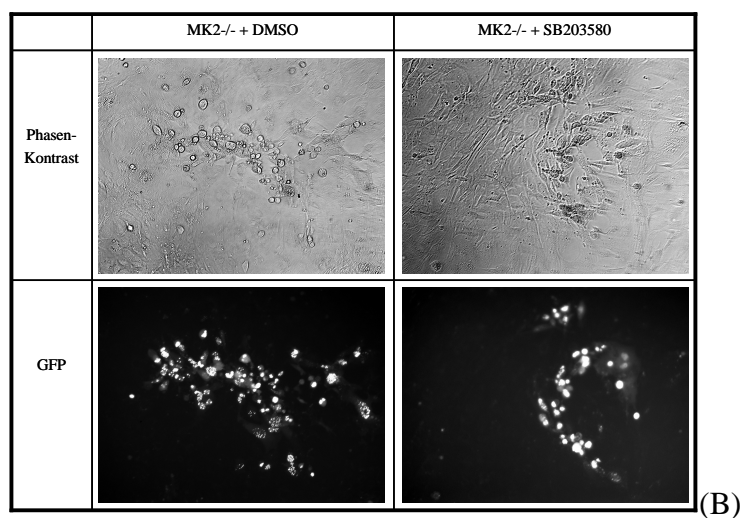
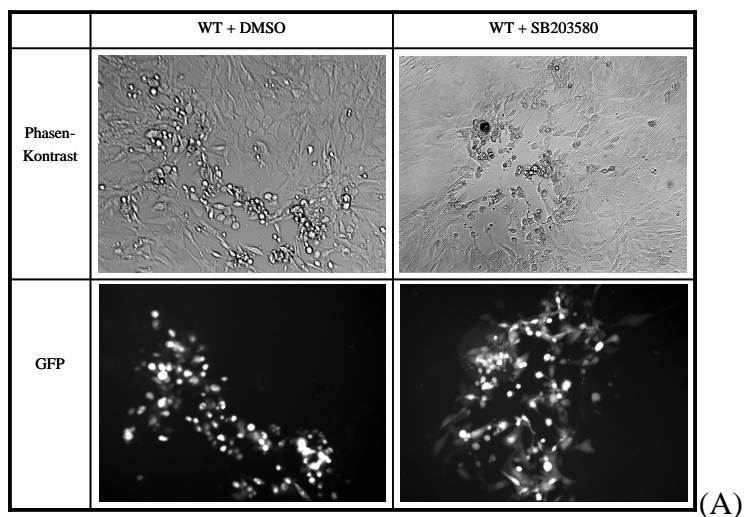


Abbildung 7-19: Bildung von Plaques in primären MEFs. Primäre WT (A), MK2^{-/-} (B) und TTP^{-/-} (C) MEFs wurden mit HSV-1-GFP (MOI 0,001 PFU/Zelle) für 24 h infiziert. Eine Stunde vor der Infektion wurde dem Medium SB203580 (10 μ M) bzw. DMSO, welches als Lösungsmittel für SB203580 diente, zugesetzt. Anschließend wurden die sichtbaren Plaques mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Plaques in WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} Zellen unterschieden sich weder im Bezug auf ihre Anzahl noch im Bezug auf ihre Größe. Eine Hemmung von p38 mit SB203580 führte zu keinen Veränderungen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Plaquebildung in den verschiedenen Zellen festgestellt werden. Eine Inhibierung der p38 wirkte sich weder auf die Anzahl noch die Größe der Plaques aus.

Somit unterschieden sich weder die nach einer sechsstündigen Infektion gemessene virale Genexpression noch die nach einer 48-stündigen Infektion gemessene Plaquebildung in den verschiedenen MEFs. Das weist daraufhin, dass sowohl der Eintritt als auch die Vermehrung der Viren in den verschiedenen Zellen mit einer vergleichbaren Kinetik verlaufen.

7.2.7 Zytokinproduktion und protektive Wirkung der Zellüberstände

Die Bildung von TTP auf der Protein- und der mRNA-Ebene ist in den virusinfizierten MK2-defizienten Zellen im Vergleich zu WT gehemmt (Abb. 7-10, 7-11 und 7-13). Da TTP in die Stabilität von Zytokin-mRNAs involviert und auf der anderen Seite die Produktion von Zytokinen ein Bestandteil einer antiviralen Antwort der Zellen ist, sollte die Zytokinproduktion in den WT, MK2- und TTP-defizienten primären MEFs und Makrophagen in einem *Plaque-Reduction-Assay* untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen mit einer niedrigen MOI von 0,001 PFU/Zelle infiziert, um die Zytokinproduktion zu stimulieren. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die virusfreien Überstände der infizierten Zellen für zwölf Stunden auf einen Monolayer von Verozellen gegeben. Verozellen wurden hierzu gewählt, da sie sich gut mit HSV-1 infizieren lassen und einen sehr guten Zellrasen bilden, was für die Ermittlung der Plaques entscheidend ist. Die Verozellen wurden anschließend mit einer MOI von 0,001 PFU/Zelle infiziert. Nach der einstündigen Inokulation wurden die Zellüberstände der infizierten MEFs bzw. Makrophagen erneut auf die Verozellen gegeben. Die Infektion der Verozellen dauerte 48 h. Die Bildung von Plaques in den Verozellen diente als Maß für die Infektion und als Hinweis für eine eventuelle protektive Wirkung der verschiedenen Zellüberstände. Als eine Kontrolle wurden die STAT1^{+/+} und STAT1^{-/-} MEFs und rekombinantes INF α benutzt.

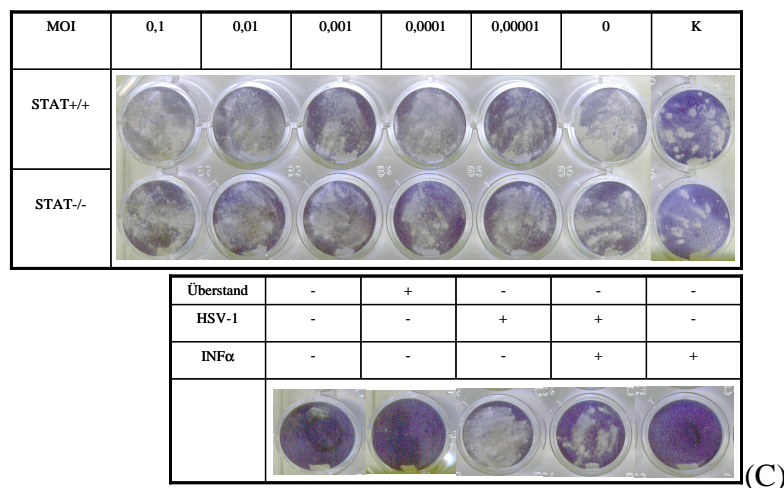
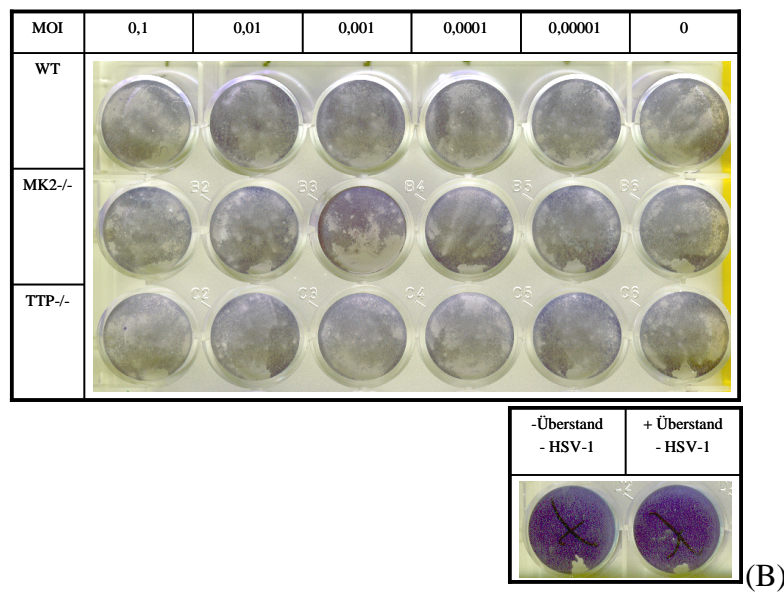
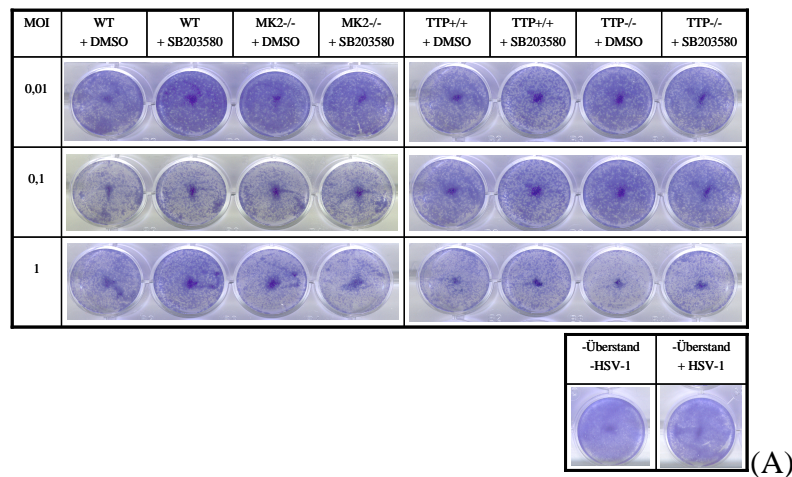


Abbildung 7-20: Plaque-Reduction-Assay zur Ermittlung der Zytokinproduktion in den verschiedenen Zellen. Primäre WT, MK2-/- und TTP-/- MEFs (A), primäre WT, MK2-/- und TTP-/- Makrophagen (B) und immortalisierte STAT1+/+ und STAT1-/- MEFs wurden mit HSV-1-KOS (MOI 1-0 PFU/Zelle) für 48 h infiziert. Die Zellüberstände wurden 20 min bei 55000 g zentrifugiert und auf konfluente Verozellen für 12 h gegeben. Verozellen wurden anschließend mit HSV-1-KOS (MOI 0,001 PFU/Zelle) 1 h inokuliert. Das Inokulum wurde verworfen, die MEF- bzw. Makrophagenüberstände wurden erneut auf die Verozellen gegeben. Nach einer 48-stündigen Infektion wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Es konnte keine protektive Wirkung der Zellüberstände von primären MEFs (A), von primären Makrophagen (B) und von immortalisierten STAT1-MEFs (C) festgestellt werden. Nur eine Behandlung der Verozellen mit dem rekombinanten INF α (200 U/ml) wirkte sich protektiv auf die Verozellen während der HSV-1-Infektion aus.

Es konnte keine protektive Wirkung der Zellüberstände der infizierten WT, MK2- und TTP-defizienten MEFs und Makrophagen beobachtet werden (Abb. 7-20). Es bestand auch kein Unterschied zwischen den STAT1^{+/+} und STAT1^{-/-} Zellen. Eine protektive Wirkung konnte nur bei rekombinantem INF α beobachtet werden (Abb. 7-20C). Durch eine Behandlung mit INF α wurde die Plaquebildung in den Verozellen signifikant inhibiert. Das gab einen Hinweis darauf, dass dieser Test an sich korrekt durchgeführt wurde. Möglicherweise war er jedoch nicht sensitiv genug um eine protektive Wirkung der durch MEFs und Makrophagen produzierten Zytokine zu untersuchen.

7.2.8 Zytotoxizität

Der Viruseintritt und die Bildung von Plaques erlauben noch keine direkte Aussage über die zytopathischen Effekte einer Infektion. Daher sollte im nächsten Schritt in einem Zytotoxizitäts-Assay untersucht werden, in wie weit sich eine HSV-1 Infektion auf das Überleben der WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} MEFs auswirkt. Die Zellen wurden hierzu mit einer MOI von 0-10 PFU/Zelle für 30 h infiziert. Anschließend wurden die toten, abgelösten Zellen ausgewaschen und die Zytotoxizität über die Zellzahl der verbliebenen, adhärenen Zellen mittels Kristallviolett färbung (CV) ermittelt. Es wurde der TCID₅₀-Wert ermittelt, welcher die Viruskonzentration darstellt, bei der 50 % der Zellen überleben. Die nicht infizierten Zellen stellten die Überlebenskontrolle (100 %) dar.

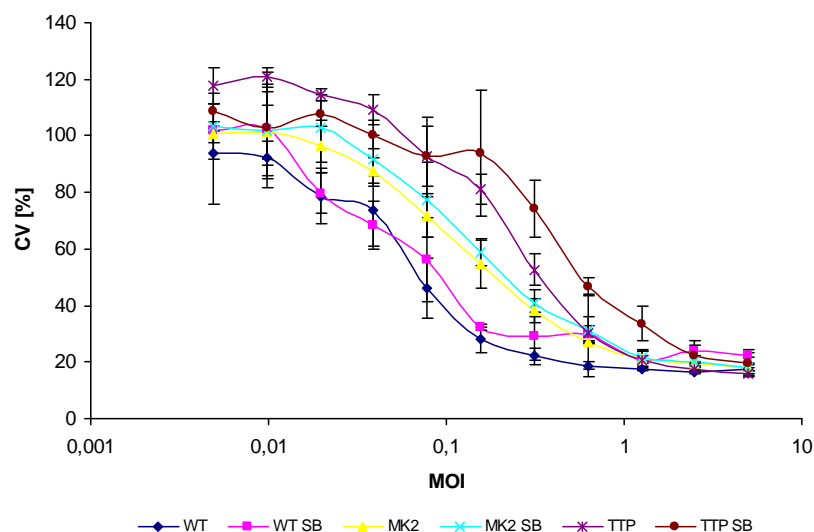


Abbildung 7-21: Der Einfluss einer HSV-1 Infektion auf das Überleben der MEFs. Primäre WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} MEFs wurden mit HSV-1-KOS in einer MOI von 0-10 PFU/Zelle infiziert. Eine Stunde vor der Infektion und während der gesamten Infektion wurden die Zellen mit dem p38 Inhibitor SB203580 (10 μ M) bzw. seinem Lösungsmedium DMSO behandelt. Nach einer 30-stündigen Infektion wurden die Zellen gewaschen, fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Die Resistenz der Zellen gegenüber einer HSV-1 Infektion lag in WT bei TCID₅₀ von 0,078, bei MK2^{-/-} bei 0,313 und bei TTP^{-/-} bei 0,625. Es konnte keine signifikante Veränderung zwischen den mit SB203580 behandelten und nicht behandelten Zellen beobachtet werden.

Die Resistenz der Zellen während einer HSV-1-Infektion war unterschiedlich (Abb. 7-21). Der TCID₅₀-Wert lag bei WT bei einer MOI von 0,078. Bei MK2^{-/-} Zellen war er 3-fach höher und lag bei 0,313 und bei TTP^{-/-} war er 6-fach höher und lag bei 0,625. Während das Fehlen der MK2 die Resistenz der Zellen erhöhte, wirkte sich eine Inhibierung der p38 durch SB203580 in diesem Assay nicht aus.

Die Zytotoxizität der HSV-1-infizierten Zellen korreliert scheinbar mit der TTP-Expression. Die infizierten WT-Zellen, die im Vergleich zu infizierten MK2^{-/-} stärker TTP exprimieren, sind weniger resistent gegenüber einer HSV-1 Infektion als die MK2^{-/-} Zellen. TTP-defizienten Zellen weisen hingegen die höchste Resistenz auf. TTP wird offensichtlich vom Virus zum Umprogrammieren der Wirtszelle genutzt, was sich letztendlich in der Zytotoxizität auswirkt. Da weder der Viruseintritt (7.2.5) noch die Vermehrung der Viren (7.2.6), oder die Zytokinproduktion (7.2.7) in den verschiedenen Zellen verändert sind, könnte es sich eventuell um eine Induktion der Apoptose handeln.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede in der TTP-Menge auf der Protein- und mRNA-Ebene in WT und MK2^{-/-} MEFs und Makrophagen gezeigt werden konnten. Sowohl das Fehlen der MK2 als auch eine Inhibierung der p38 wirkten sich hemmend auf die TTP-Produktion bzw. auf die TTP-mRNA-Stabilität in den infizierten Zellen aus. Eine physiologische Bedeutung der gesenkten TTP-Expression in MK2^{-/-} bzw. des Fehlens von TTP in TTP^{-/-} Zellen konnte in einem Zytotoxizitätstest gezeigt werden. Weder beim Eintritt der Viren, noch bei der Bildung von Plaques, noch bei der Produktion von Zytokinen konnten mit den verwendeten Untersuchungsmethoden Unterschiede im Vergleich zu WT festgestellt werden. Möglicherweise nutzt der Virus das wirtseigene TTP zum Umprogrammieren der Zelle, was die Überlebenschancen der Wirtszellen verändert. Wie im Kapitel 7.2.8 gezeigt, waren die TTP^{-/-} MEFs am meisten und die WT-MEFs am wenigsten resistent gegenüber einer HSV-1-Infektion.

7.3 Einfluss von Immortalisierung auf die UV-stimulierte Apoptose

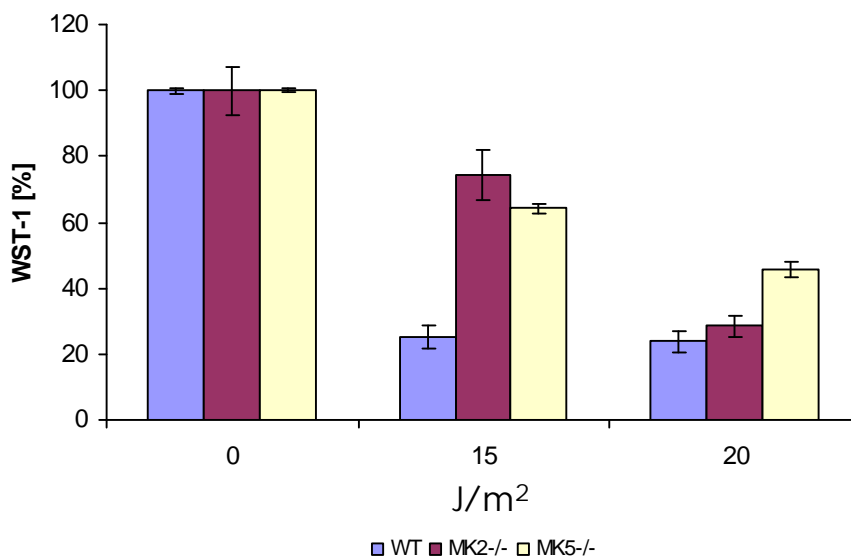
Die meisten experimentellen Arbeiten auf der zellulären Ebene werden in immortalisierten Zellen durchgeführt. Das hat den großen Vorteil, dass die Zellen einfach und schnell kultiviert werden können und in einem ausreichenden Umfang zur Verfügung stehen. Hierzu werden primäre Zellen immortalisiert bzw. transformiert. Immortalisierte Zelllinien weisen ein unbegrenztes exponentielles Wachstumsverhalten auf, während die transformierten Zellen darüber hinaus auch tumorigen sind (Drayton and Peters 2002). Um Zellen eine unbegrenzte Lebensdauer zu verschaffen können sie zum einen mittels Hybridomatechnik mit Tumorzellen

fusioniert werden. Zum anderen werden Virustransformationen, das Einfügen von Onkogenen in das Genom sowie Mutationen von Regulatorgenen des Zellzyklus genutzt. Transformationen können auch durch chemische Agenzien und Gammastrahlen induziert werden (Gudjonsson et al. 2004; Trott et al. 1995). Eine häufig genutzte Technik für die Immortalisierung ist eine Transfektion der Zellen mit Vektoren, die beispielweise Virus-DNA mit spezifischen Genabschnitten, wie *Simian Virus 40 (SV40) Large T Antigen*, E6 und E7 der humanen Papillomaviren oder die adenovirale Proteine E1a und E1b enthalten (Bond et al. 1999; Bright et al. 1997; Hahn 2002; Quinlan 1994; Ruley 1983; Shay and Wright 1989; Sun et al. 1997; Yuan et al. 2002). Transformationen von Zellen können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spontan ablaufen. Dies kann ihre Eigenschaften, wie die Proliferationseigenschaften, die Morphologie, die Differenzierungseigenschaften, die Chromosomenzahl und die Anheftungsfähigkeit bzw. die Fähigkeit in Suspension zu wachsen, ändern (Alberts et al. 2004). So kann auch eine gezielte Transformation die Charakteristik der Zellen verändern.

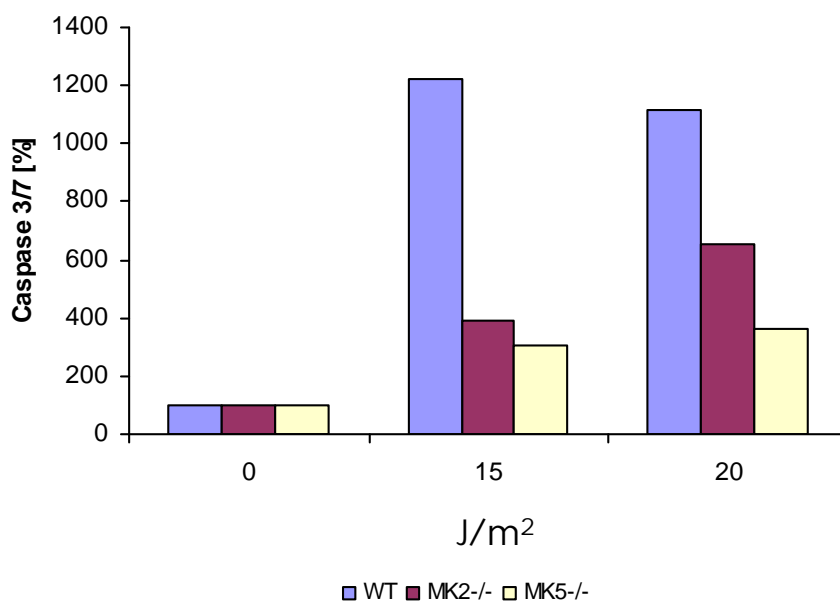
Aus den WT-Mäusen und aus den in unserem Labor generierten MK2- und MK5-*knock out* Mäusen wurden immortalisierte MEF-Zelllinien hergestellt. Die Transformation wurde mit dem viralen großen Tumorantigen (großes T-Antigen) des Simian Virus 40 (SV40) induziert. Das Protein ist für die Replikation der viralen DNA und für die Regulation der Expression viraler Gene essentiell (Rio et al. 1980). Das Protein besitzt zudem die Fähigkeit, Zellen zu transformieren (Srinivasan et al. 1989). Das große T-Antigen bindet an zelluläre Proteine, die zu den Tumorsuppressorproteinen, wie p53 und das Retinoblastoma Protein (pRB), gehören. Lin und Simmons beschrieben, dass eine Transformation von Mauszellen durch SV40 zum Teil darauf zurückzuführen ist, dass die anti-proliferative Aktivität von p53 durch das große T-Antigen des SV40 blockiert wurde (Lin and Simmons 1990).

Alle Untersuchungen, die mit immortalisierten *knock-out* Zellen durchgeführt wurden, müssen sowohl durch einen *Rescue*-Versuch als auch durch eine Überprüfung in primären Zellen bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von MK2 und MK5 auf das Zellsterben untersucht. Apoptose ist ein programmiertes Zellsterben, das durch die Zelle selbst aktiviert wird. Dadurch kann beispielweise in einem gesunden Gewebe die Zellzahl kontrolliert werden. Apoptose kann auch durch diverse Stressfaktoren ausgelöst werden. Die p38-Signalkaskade ist einer der Signalwege, die während der Apoptose aktiviert werden können (Literatur). In dieser Arbeit sollte der Zelltod nach Apoptosestimulation mit UV-C (254 nm) in WT, MK2^{-/-} und MK5^{-/-} MEFs überprüft werden. Die Zellen wurden dabei mit UV (20 J/m²) bestrahlt. Nach 24 Stunden wurden die Caspasen 3 und 7 gemessen und nach einer 72-stündigen Erholungsphase wurde die Zellvitalität in einem WST-1-Test bestimmt. Dieser Test

basiert auf der Spaltung des Tetrazoliumsalzes (WST-1) durch die mitochondrialen Dehydrogenasen zu Formazan, was mit der Zellvitalität korreliert.



(A)



(B)

Abbildung 7-22: Die Zellvitalität und die Aktivität der Caspasen 3/7 in UV-stimulierten WT, MK2^{-/-} und MK5^{-/-} MEFs. Immortalisierte WT, MK2^{-/-} und MK5^{-/-} MEFs wurden mit UV-C (15 und 20 J/m²) behandelt. Nach einer 72-stündigen Inkubation wurde die Zellvitalität im WST-1-Test überprüft (A). Bei 15 J/m² zeigten MK2^{-/-} und MK5^{-/-} eine erhöhte Vitalität. Bei 20 J/m² zeigten die MK5^{-/-} MEFs eine ca. 40 % höhere Vitalität als die WT und MK2^{-/-} Zellen. Nach einer 24-stündigen Erholungsphase wurde die Aktivität der Caspasen 3/7 bestimmt (B). Diese korrelierte negativ mit der Vitalitätsmessung. Bei 20 J/m² war die Aktivität der Caspasen in MK5 defizienten MEFs geringer als in WT und MK2^{-/-}.

In dem WST-1-Assay konnte gezeigt werden, dass die Vitalität der mit UV behandelten immortalisierten WT und MK2^{-/-} MEFs nach einer 72-stündigen Erholungsphase auf 25 % der unbehandelten Zellen abnahm (Abb. 7-22). Die MK5-defizienten Zellen waren resistenter als die WT und MK2^{-/-} Zellen. Sie zeigten eine um 40 % erhöhte Vitalität im Vergleich zu WT

und MK2^{-/-} MEFs. Während bei einer Behandlung mit 15 J/m² sowohl MK2- als auch MK5-defiziente MEFs eine gleich erhöhte Resistenz im Vergleich mit WT zeigten, veränderte sich die Resistenz der *knock-out*-Zellen durch eine Erhöhung der UV-Dosis auf 20 J/m². In einem parallel durchgeführten Caspase3/7-Assay wurde gezeigt, dass die erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit der Zellvitalität negativ korrelierten. Nach einer Bestrahlung mit 15 J/m² war die Caspaseaktivität in den beiden *knock-out* Zellen gesenkt im Vergleich zu WT. Bei einer höheren UV-Dosis von 20 J/m² zeigten die MK2-defizienten Zellen eine erhöhte Caspaseaktivität, während die Caspaseaktivität in den MK5^{-/-} Zellen unverändert niedrig blieb. Das gab einen Hinweis darauf, dass die im WST-1-Assay gezeigten Unterschiede nicht auf eine unterschiedliche Zellproliferation zurückzuführen sind. Da die Aktivität der Caspasen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöht war, handelte es sich um ein apoptotisches Sterben der Zellen. In den *knock-out*-Zellen zeigte sich eine dosisabhängige UV-Resistenz. So stellte sich die Frage, warum gerade die MK5-defizienten Zellen bei der höheren UV-Dosis von 20 J/m² eine erhöhte Resistenz aufweisen und die MK2-defizienten Zellen nicht mehr.

Im nächsten Schritt wurde ein *Rescue*-Versuch durchgeführt, in dem die fehlenden Kinasen mittels einer Transfektion in die Zellen zurückgeführt wurden. Hierzu wurden die Plasmide pcDNA3-myc-MK2WT bzw. pcDNA3-HA-MK5WT genutzt. Als Transfektionskontrolle wurde pEGFP-C1 genutzt. Zwölf Stunden nach der Transfektion wurde über die GFP-Expression die Transfektionseffizienz mikroskopisch überprüft. Bei einer mind. 40%igen Effizienz wurden die Zellen für die UV-Stimulation verwendet. Die Fragestellung lautete, warum nur MK5-defizienten MEFs bei einer höheren der UV-Dosis eine erhöhte Resistenz zeigten, somit wurde in diesem Versuch alleine die Dosis von 20 J/m² gewählt.

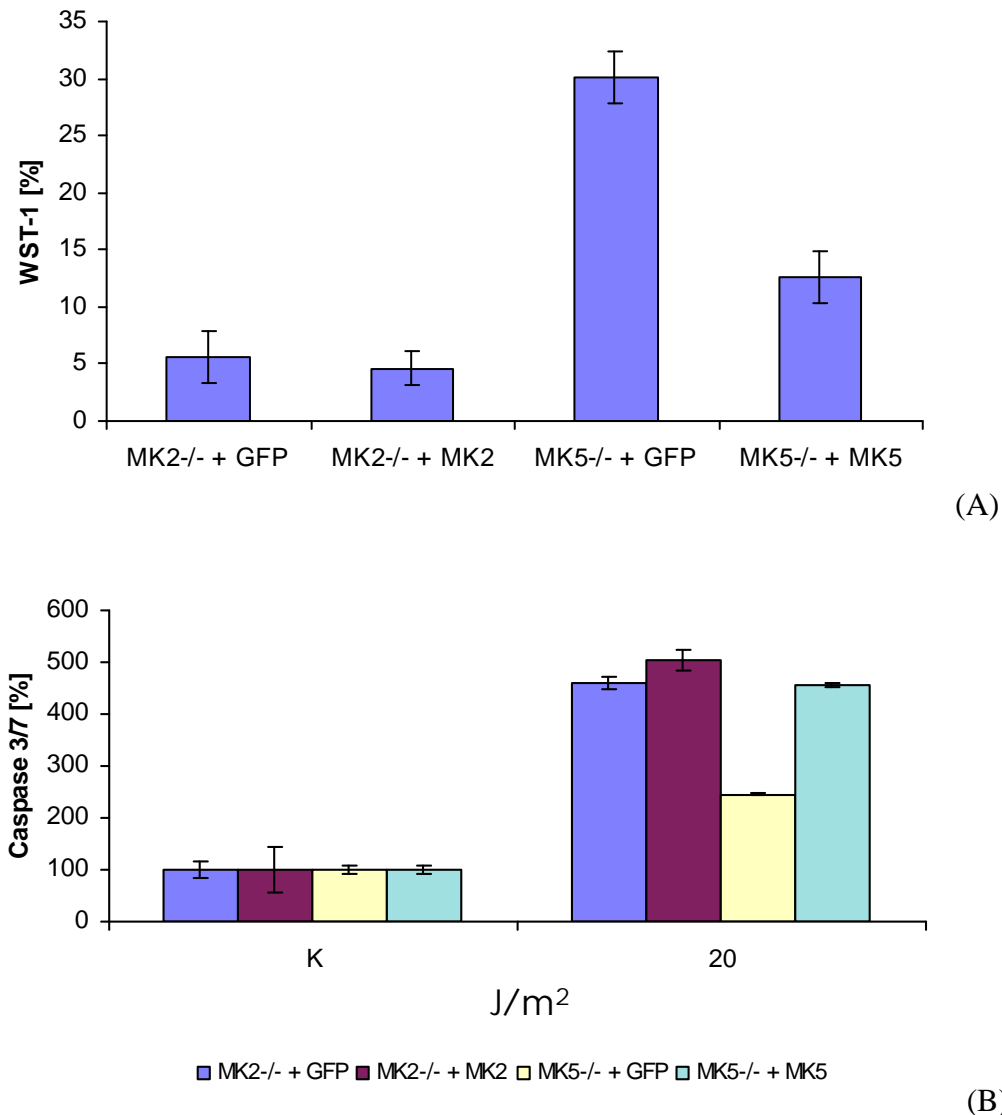


Abbildung 7-23: Die Zellvitalität und die Aktivität der Caspasen 3/7 in UV-stimulierten MK2^{-/-} und MK5^{-/-} MEFs nach einer Rückführung der fehlenden Kinasen. Immortalisierte MK2^{-/-} MEFs wurden mit pcDNA3-myc-MK2WT und MK5^{-/-} MEFs mit pcDNA3-HA-MK5WT transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde pEGFP-C1 benutzt. Die Transfektionseffizienz lag bei ca. 40 %. Anschließend wurden die Zellen mit UV von 20 J/m² stimuliert. Nach 24 h wurden die Caspasen 3/7 (B) und nach 72 h die Zellvitalität (A) gemessen. Das Zurückbringen der MK2 in die MK2^{-/-} Zellen beeinflusste die Zellvitalität und die Caspasenaktivität nicht. Das Zurückbringen der MK5 in die MK5^{-/-} MEFs führte zu einer Senkung der Zellvitalität und einer Erhöhung der Caspasenaktivität.

Eine Transfektion der MK2^{-/-} Zellen mit MK2 veränderte weder ihre Vitalität noch die Caspaseaktivität nach einer UV-Stimulation. Auf der anderen Seite konnte die Überexpression von MK5 in den MK5-defizienten Zellen ihre Vitalität senken (Abb. 7-23A). Gleichzeitig stieg die Aktivität der Caspasen in diesen Zellen (Abb. 7-23B). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Phänotyp in MK5 defizienten Zellen tatsächlich auf diese Kinase zurückzuführen ist.

Eine weitere Überprüfung verlief in primären MEFs. Diese wurden mit UV von 15, 30 und 60 J/m² stimuliert. Nach 72 Stunden wurde der WST-1-Assay durchgeführt.

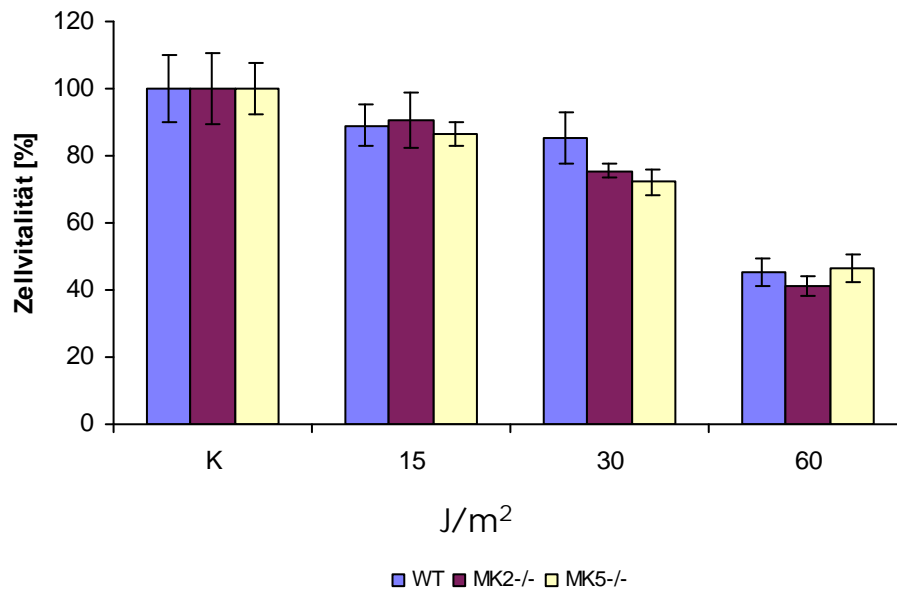


Abbildung 7-24: Primäre WT, MK2-/- und MK5-/- MEFs wurden mit UV-C (15, 30 und 60 J/m²) behandelt. Nach einer 72-stündigen Inkubation wurde die Zellvitalität im WST-1-Test überprüft. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen nach einer UV-Stimulation beobachtet werden.

Eine Überprüfung der Zellvitalität in primären MEFs konnte die Ergebnisse der immortalisierten Zellen nicht bestätigen (Abb. 7-24). Da die Ergebnisse des WST-1-Tests eindeutig waren, wurde auf die Messung der Caspaseaktivität verzichtet. Offensichtlich war der beobachtete Phänotyp in den immortalisierten MEFs auf die Immortalisierung zurückzuführen. Dabei bleibt unklar, warum eine Rückführung der MK5 in die immortalisierten MK5-/- MEFs eine Senkung der Zellvitalität und eine gleichzeitige Erhöhung der Caspaseaktivität hervorrufen konnte. Möglicherweise könnte das mit einem Überexpressionseffekt von MK5 im Zusammenhang stehen.

8 Diskussion

8.1 Die Rolle von MK2 in der Regulation des Urokinase Plasminogen Systems und beim invasiven Verhalten der Endothelzellen

Die Komponenten des Urokinase Plasminogen Systems, uPA, uPAR, PAI-1 und Plasmin sind an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt und spielen somit eine bedeutende Rolle bei der Zellmigration, der Angiogenese oder bei Prozessen der Gewebeerneuerung, wie die Wundheilung oder die Leberregeneration (Witowsky et al. 2003). Zudem sind die Komponenten dieses Systems in Tumoren, wie z.B. Brusttumoren, hoch exprimiert und möglicherweise an der Metastasenbildung beteiligt (Huang et al. 2000). Die wichtigsten Stimuli für uPA sind Wachstumsfaktoren, wie *Fibroblast Growth Factor* (FGF-2) (Miralles et al. 1998b; Witowsky et al. 2003), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Yu et al. 2004); Integrine, wie Vitronectin (Chen et al. 2001); sowie Serum (Miralles et al. 1998b); PMA (Shetty and Idell 2000). UV-Licht wird als uPA-Stimulus diskutiert: uPA wurde als eines der ersten Proteine beschrieben, welches in humanen *Xeroderma Pigmentosum*-Zellen durch UV-Licht induzierbar war (Miskin and Ben-Ishai 1981). UV-C kann drei Gruppen der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 aktivieren und gleichzeitig die Expression von uPA-mRNA in NIH 3T3 murinen Fibroblasten stimulieren, was von JNK und nicht von ERK1/2 oder von p38 abhängig ist (Miralles et al. 1998a).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MK2 eine wichtige Rolle bei der Regulation von uPA und uPAR nach einer UV-C-Stimulation spielt. In mit UV-C stimulierten WT MEFs konnte die Aktivität von uPA erhöht werden. Die Aktivität von uPA konnte in WT Zellen, die mit dem spezifischen Inhibitor von p38 SB203580 behandelt wurden, gesenkt werden. In MK2-defizienten Zellen konnte uPA mit UV-C nicht stimuliert werden. Durch das Zurückbringen der fehlenden Kinase in die MK2^{-/-} MEFs konnte die Aktivität von uPA stimuliert und durch SB203580 inhibiert werden. In einem Northern Blot konnte in MK2^{-/-} Makrophagen nach einer LPS-Stimulation nur eine sehr geringe Menge der endogenen uPA-mRNA und eine signifikant gesenkte Menge der endogenen uPAR-mRNA detektiert werden. Dabei kann eine UV-Stimulation mit der LPS-Stimulation gut verglichen werden, da beide Stimuli den p38-Signalweg aktivieren und diese gewählt wurden, um eine generelle Rolle der p38-Aktivierung für die uPA-Expression zu demonstrieren.

Die meisten Studien über die Regulation von uPA wurden in Tumorzelllinien durchgeführt, da diese eine erhöhte Expression von uPA aufweisen. Es wurde gezeigt, dass die Stabilität der mRNA in bestimmten Tumorzelllinien, wie MDA-MB-231, MDA-MB-436 oder BT-549

signifikant erhöht ist und ihre Halbwertszeit länger als zehn Stunden ist (Tran et al. 2003). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass p38 in diesen Zelllinien konstitutiv aktiv ist (Huang et al. 2000). Montero und Nagamine zeigten in MDA-MB-231 Zellen, dass p38 die uPA-mRNA-Stabilität positiv beeinflussen kann, da eine Behandlung der Zellen mit dem SB203580-Inhibitor die erhöhte mRNA-Menge signifikant senken konnte (Montero and Nagamine 1999). Eine Überexpression der konstitutiv aktiven Form von MK2 in den mit SB203580 behandelten MDA-MB-231 Zellen führte erneut zu einer Stimulierung von uPA, was die Regulation des uPA durch MK2 bestätigte (Han et al. 2002). Han und Kollegen demonstrierten, dass die über MK2 vermittelte Stabilität der uPA-mRNA von den AREs in der 3'-nichtranslatierten Region abhängt (Han et al. 2002). Für die Stabilisierung der uPA-mRNA in den Tumorzelllinien spielt das ARE-mRNA bindende Protein HuR eine Rolle (Tran et al. 2003). Tran und Kollegen zeigten, dass durch eine Verringerung von HuR mittels RNAi-Technik eine Reduktion der mRNA-Menge von uPA und von uPAR erzielt werden konnte. Die Interaktion zwischen uPA-mRNA und HuR scheint von p38 und von ihrem Substrat der MK2 abhängig zu sein. Eine konstitutiv aktive Form von MK2 konnte die Akkumulation von HuR im Cytoplasma beeinflussen, was zu einer erhöhten Stabilität der uPA-mRNA führte (Tran et al. 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten sie, dass HuR und MK2 die Expression von uPA und uPAR auf der posttranskriptionellen Ebene regulieren können. In dieser Arbeit wurden eine signifikante Reduktion von uPA-Aktivität sowie Reduktion von uPAR-mRNA in MK2 defizienten MEFs und Makrophagen gezeigt. Da die mRNA sowohl von uPA als auch von uPAR in MK2-/- Zellen nur schwach detektierbar war, gibt das einen Hinweis darauf, dass die RNA schwach transkribiert wurde oder instabil war. Somit wurde die p38/MK2-abhängige Regulation der endogenen uPA und uPAR in nicht tumorartigen Zellen auf der Ebene der mRNA erstmal gezeigt.

Die Rolle von MK2 in der Regulation von uPA- und uPAR-mRNA ist mit der Regulation von IL-6-mRNA vergleichbar. MK2 defiziente Zellen zeigten nach einer LPS-Stimulierung eine Reduktion der IL-6-mRNA und des Proteins im Vergleich zu WT. Es konnte gezeigt werden, dass die IL-6-mRNA durch MK2 stabilisiert wird (Neininger et al. 2002).

MK2 kann sich über die Regulation eines ihrer Substrate, des TTP negativ auf die Stabilität der ARE enthaltenden mRNAs auswirken. TTP ist ein ARE-mRNAs destabilisierendes Protein, deren Expression und mRNA-destabilisierende Aktivität beim Stress stimuliert wird (Dean et al. 2004; Hitti et al. 2006; Tchen et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass MK2 und TTP an der Regulation der Translation und der Stabilität von TNF α beteiligt sind (Hitti et al. 2006). MK2 ist für die TTP-mRNA-Stabilität essentiell und kann TTP am Serin 52 und 178

phosphorylieren. Das phosphorylierte TTP weist jedoch eine gesenkte Affinität zu AREs auf (Hitti et al. 2006). Dadurch sind MK2 und TTP, welche stabilisierend oder destabilisierend auf die mRNA wirken, nicht gleichzeitig aktiv. Die aktivierte MK2 stabilisiert die TTP-mRNA und das Protein, inhibiert aber gleichzeitig seine Aktivität (Hitti et al. 2006). Für diese Hypothese könnte sprechen, dass die uPA-mRNA in den MK2^{-/-} Zellen niedrig war, da hier TTP durch die MK2 nicht inhibiert werden konnte. Wenn p38 und MK2 zu ihrer basalen Aktivität zurückkehren, wird TTP aktiv und ist in der Lage ARE enthaltende mRNAs zu destabilisieren (Hitti et al. 2006). Dieser Mechanismus erlaubt es, eine inflammatorische Antwort schnell auszuschalten.

Für TTP^{-/-} Makrophagen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Menge der uPA-Transkripte nach einer LPS-Stimulation eventuell der Menge in WT Zellen entsprach. Im Gegensatz dazu ist die TNF α -mRNA in TTP^{-/-} Zellen nach einer LPS-Stimulation im Vergleich zu WT erhöht (Hitti et al. 2006). Das Fehlen von TTP bedeutet keine Destabilisierung der mRNA durch TTP, was möglicherweise zu einer erhöhten TNF α -mRNA führt. Es könnte sein, dass im Falle von uPA auch andere mRNA destabilisierende Faktoren dazu führen, dass die mRNA in TTP^{-/-} nicht erhöht ist oder dass TTP grundsätzlich an der uPA-Regulation nicht beteiligt ist.

Wenn in den MK2-defizienten Zellen zusätzlich das TTP deletiert wurde, hatte das zu Folge, dass die TNF α -mRNA-Menge in LPS stimulierten Makrophagen im Vergleich zu WT erhöht war (Hitti et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit waren die Transkripte von uPA in mit LPS stimulierten MK2/TTP^{-/-} Makrophagen im Vergleich zu WT nicht signifikant verändert. In diesen Zellen findet weder eine Stabilisierung über MK2 noch eine Destabilisierung durch TTP statt. Das könnte einen weiteren Hinweis darauf geben, dass MK2 und TTP nicht die einzigen uPA-regulierenden Proteine sind. Hitti und Kollegen beobachteten, dass in mit LPS stimulierten TTP^{-/-} und MK2/TTP^{-/-} Makrophagen eine weitere Inhibierung von TNF α durch SB203580 stattfindet (Hitti et al. 2006). Das spricht für eine TNF α -regulierende Rolle anderer p38-Substrate. Es wurden eine Reihe von ARE-bindenden Faktoren, wie HuR, AUF2, FBP1, FBP2, TIA-1 und TIAR beschrieben, die hier in Frage kommen könnten (Dean et al. 2004; Neining et al. 2002).

Es wurden weitere Proteine identifiziert, die an die ARE-Sequenzen der uPA Transkripte spezifisch binden. Ein 40-kDa-Protein, das *heterogenes nuklear ribonucleoprotein C* (hnRNP C) konnte sowohl in der Epithelzelllinie LLCPK1 als auch in der Tumorzelllinie MDA-MB-231 die ARE in der uPA-mRNA binden und dadurch zu einer Stabilisierung beitragen, was PKC abhängig war (Nanbu et al. 1997). Shimba und Kollegen beschrieben ein cytoplasmatisches

50-kDa-Protein, welches in Leberzellen an die 3'-UTR des uPA-Transkriptes bindet und dieses stabilisiert (Shimba et al. 2000). In der cytoplasmatischen Fraktion der nicht-malignen Epithelzellen der Lunge und in der nuklearen Fraktion der tumorartigen Epithelialzellen der Lunge wurde ein 30-kDa-mRNA bindendes Protein gefunden. Seine cytoplasmatische Lokalisation korrelierte mit einer kurzen Halbwertszeit der uPA-mRNAs, während das Protein in den tumorartigen Zellen, die vermehrt uPA exprimieren, in der nuklearen Fraktion nachzuweisen war. Dieses Protein bindete an einen 66-Nukleotide-Protein-bindenden Fragment im UTR der uPA-Transkripte (Shetty and Idell 2000). Diese Literaturdaten geben Hinweise auf eine Reihe weiterer Proteine, die in die Regulation von uPA-mRNA involviert sind. Die Regulation der uPA-mRNA-Stabilität ist AREs abhängig, wird jedoch - neben p38 - auch von anderen Kinasen, wie PKC reguliert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass MK2 eine wichtige Rolle bei der Regulation von uPA und uPAR auf der Ebene der mRNA Stabilität in UV-stimulierten Zellen spielt. MK2 kann sich stabilisierend bzw. destabilisierend über weitere Faktoren, möglicherweise HuR und TTP auswirken. Es wurden auch weitere Proteine, beispielsweise hnRNP C beschrieben, die an die AREs der uPA-mRNA binden und diese stabilisieren. Möglicherweise ist auch dieser Prozess p38-abhängig. uPA wurde neben anderen Proteinen, wie z. B. TNF α , IL-3 oder IL6, deren mRNA-Stabilität durch p38 reguliert wird, beschrieben (Brook et al. 2000; Lee et al. 1994; Ming et al. 2001; Montero and Nagamine 1999; Shi and Gaestel 2002). Frevel und Kollegen konnten diese Befunde in einer LPS-stimulierten humanen Monozytenzelllinie THP-1 nicht bestätigen (Frevel et al. 2003). In einem *AU-rich gene array* zeigten sie beispielweise für TNF α , dass seine mRNA eine sehr kurze Halbwertszeit hatte, welche SB203580 unabhängig war. Diese Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Studien könnte auf unterschiedliche Zellsysteme, wie humane Blutmonozyten, HeLa- oder NIH-3T3-Zellen, oder auf experimentelle Unterschiede zurückzuführen sein. Zuletzt kann eine p38-abhängige mRNA-Stabilisierung oder -Destabilisierung von der Stimulation abhängig sein. Die Beobachtung, dass manche AREs-beinhalten mRNA durch LPS stimulierbar, jedoch nicht p38-abhängig sind, könnte vielleicht damit begründet werden, dass LPS über den *toll-like receptor 4* (TLR4) in der Lage ist, neben p38 auch TAK1 und *nuclear factor- κ B* zu aktivieren (Chow et al. 1999; Lee et al. 2000). Ming und Kollegen untersuchten in den NIH-3T3 Zellen die Stabilität der IL3-mRNAs, welche AREs in der 3'-UTR beinhalten. Sie postulierten, dass die IL3-mRNA in unstimulierten Zellen durch konstitutiv aktives TTP destabilisiert und in stimulierten Zellen über Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3-K) und p38 stabilisiert wird (Ming et al. 2001). Dabei zeigen sie, dass die p38-abhängige Stabilisierung nicht durch eine TTP-Inaktivierung sondern

über eine HuR-Aktivierung ablief. Das würde bedeuten, dass p38 sich in unterschiedlichen Modellen stabilisierend bzw. destabilisierend auf die mRNAs auswirken kann. Die Mechanismen der mRNA-Stabilität scheinen sehr kompliziert zu sein und sind offensichtlich von den Stimuli, den Zellsystemen und den angewandten experimentellen Methoden abhängig.

MK2 wirkt sich offensichtlich auf die Regulation der uPA- und uPAR-Expression, welche u. a. eine Rolle bei der Zellmigration, der Angiogenese oder der Wundheilung spielen, aus. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der MK2 zu einer Reduktion der Filopodienbildung in Makrophagen und zu einer signifikanten Hemmung der Zellmigration in MEFs und in primären glatten Muskelzellen führt (Kotlyarov et al. 2002). Aufgrund dieser Befunde wurde die Rolle der MK2 in einem *ex vivo* Angiogenesemodell, dem Aorta Ring Assay, weiter untersucht. Hier wurden das Wachstum und das invasive Verhalten der Endothelzellen, die aus isolierten Aortaringen der verschiedenen Mäuse in das Matrigel auswuchsen, verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung der Endothelzellen im Matrigel in den MK2^{-/-}-Mäusen stark gehemmt war. Auch in den TTP^{-/-} und MK2^{-/-}/TTP^{-/-} Mäusen wuchsen die Endothelzellen schwächer als im WT, jedoch stärker als in MK2^{-/-}.

Im Rattenmodell hemmte SB203580 die Ausbildung von glatten Muskelzellen und den Perizyten, welche die Endothelzellen umhüllen, und zeigte keine Wirkung auf die mit Angiopoetin-1 stimulierten Endothelzellen (Zhu et al. 2003). Durch eine Inhibierung der p38 konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Hemmung der umhüllenden Zellen, den Perizyten, in allen untersuchten Genotypen beobachtet werden (Abb. 7-7). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass p38 in dem untersuchten Mausmodell eine auch Rolle an dem Wachstum und der Ausbreitung der Endothelzellen beteiligt ist. Da die Endothelzellen in MK2^{-/-} Mäusen stark gehemmt waren, scheint die Regulation der Endothelzellen vom p38/MK2-Signalweg abhängig zu sein. Da diese Endothelzellen mit dem spezifischen Inhibitor von p38 nicht weiter gehemmt werden konnten, kann die Rolle weiterer p38-Substrate für diese Regulation ausgeschlossen werden. Die Endothelzellen der MK2^{-/-} Aortaringe waren von den anderen Zellen umhüllt, welche ihrerseits durch SB203580 in ihrem Wachstum inhibiert wurden. Das deutet darauf hin, dass die MK2 selbst nicht an der Regulation der umhüllenden Muskelzellen und den Perizyten beteiligt ist. Für die Regulation der umhüllenden Zellen könnten andere p38-Substrate, wie z. B. MK3, zuständig sein. MK3 ist eins der p38-Substrate, welches eine 75%ige Homologie mit der MK2 aufweist. Bis jetzt ist jedoch kein Phänotyp dieser Kinase bekannt. Eine Überprüfung des Wachstums und der Ausbreitung der Endothelzellen und der Perizyten der generierten MK3-*knockout*-Mäuse (Telliez, JB und Ronkina, N unveröffentlicht) in dem Aorta-Modell wäre daher sinnvoll.

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass MK2 eine wichtige Rolle bei der Regulation von uPA und uPAR spielt. Der an seinen Rezeptor gebundene uPA ist als eine Serinprotease u. a. an der Angiogenese beteiligt. So stellte sich die Frage, ob MK2 über uPA oder auch über andere Substrate an der Regulation der Endothelzellen beteiligt ist? Devy und Kollegen zeigten in einem Aorta-Ring-Assay im Mausmodell, dass die Vaskularisation in den uPA^{-/-}, den uPAR^{-/-}, den tPA^{-/-} und in den tPA/uPA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT nicht dramatisch verändert war (DEVY et al. 2002). Das Fehlen mancher Komponenten des Plasminogen Systems, wie uPA, uPAR oder tPA, kann offensichtlich durch andere Proteine kompensiert werden (Bajou et al. 2001). Bei einer Deletion der MK2 sind die Stabilität der uPA-mRNA und die Proteinmenge von uPA signifikant gesenkt und gleichzeitig kommt es zu einer starken Hemmung des Endothelzellwachstums. Das Fehlen von uPA allein führt im Aorta Ring Assay zu keiner Veränderung im Wachstum der Endothelzellen. In MK2-defizienten Mäusen fand offensichtlich keine Kompensation durch andere Komponenten des Plasminogen Systems statt. Zum einen könnte es sein, dass MK2 auch in die Regulation anderer Komponenten, wie tPA, Plasminogen oder Plasminogen Inhibitor 1 bzw. 2 (PAI-1 bzw. PAI-2), involviert ist. Interessanterweise konnten Yu und Kollegen in einem *yeast tree-hybrid system* TTP als ein PAI-2-mRNA-bindendes Protein identifizieren (Yu et al. 2003). Zum anderen kann es sein, dass MK2 auch andere Faktoren reguliert, die an der Angiogenese beteiligt aber vom Urokinase Plasminogen System unabhängig sind.

Devy und Kollegen zeigten parallel, dass die Vaskularisation in PAI-1^{-/-} Mäusen komplett unterbunden und in Plasminogen^{-/-} Mäusen signifikant gehemmt war. Eine Zugabe von Serum oder von rekombinantem PAI-1 konnte die Vaskularisation in den PAI-1^{-/-} Mäusen wiederherstellen. Die Wirkung des PAI-1 ist stark dosisabhängig. In physiologischen nanomolaren Konzentrationen (0,1-100 ng/ml) hat PAI-1 eine pro-angiogene und in hohen mikromolaren Konzentrationen eine anti-angiogene Wirkung (DEVY et al. 2002). Sollte die Reduktion der Vaskularisation in MK2^{-/-} Mäusen an der Proteinsenkung von uPA und PAI-1 liegen, könnte eine Behandlung mit PAI-1 in einer physiologischen Konzentration das Wachstum der Endothelzellen stimulieren. In der vorliegenden Arbeit wurde PAI-1 in einer physiologischen Konzentration von 25 ng/ml eingesetzt, zeigte jedoch keine pro-angiogene Wirkung in MK2^{-/-} Mäusen. Das bedeutet, dass der Inhibitor in der Abwesenheit der MK2 und bei der gesenkten Menge von uPA und möglicherweise von uPAR des Systems die Vaskularisation nicht wieder herstellen konnte. Daraus folgt, dass MK2 offensichtlich auch für die Regulation anderer Komponenten des Urokinase Plasminogen Systems oder anderer Faktoren zuständig ist.

Es konnte hier nicht eindeutig gezeigt werden, dass der in dem Aorta Ring Assay beobachtete Phänotyp in MK2^{-/-} Mäusen von uPA abhängig ist. Da das Wachstum der Endothelzellen in uPA^{-/-} Mäusen in einem ähnlichen Assay nicht beeinträchtigt war (DEVY et al. 2002) und eine Zugabe von PAI-1 zu den MK2^{-/-} Aortaringen zu keiner Veränderung bei dem Endothelzellwachstum führte, müssten neben uPA auch noch weitere Komponenten des Systems oder andere Faktoren, die ebenfalls von der MK2 reguliert werden, an diesem Prozess beteiligt sein.

8.2 Die Rolle von MK2 in der Virusinfektion

Organismen haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, die sie und weitere benachbarte Zellen bei einer viralen Infektion schützen, wie z.B. die Produktion von Zytokinen und Interferonen. So bewirkt eine primäre HSV-Infektion im Wirtsorganismus eine starke Zytokinantwort: es werden Interferone, wie IFN- α/β , IFN- γ und Zytokine, wie IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , und GM-CSF sezerniert (Mogensen and Paludan 2001b). Diese werden zunächst von den infizierten Zellen produziert und können sowohl benachbarte Zellen als auch Immunzellen, wie Makrophagen, zu einer weiteren Synthese und Sekretion von Zytokinen und Interferonen stimulieren, was eine Vervielfachung der primären Produktion zur Folge hat. Eine lang anhaltende inflammatorische Antwort ist jedoch auch für den Wirtsorganismus schädlich. Die TTP-defizienten Mäuse, in denen es zu einer latent gesteigerten TNF-Produktion kommt, erkranken dadurch an Arthritis, Dermatitis, Cachexie, Hyperplasie und sterben früh (Carrick et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass das HSV-1 in der Lage ist, die TTP-Expression zu stimulieren (Esclatine et al. 2004a; Esclatine et al. 2004b; Esclatine et al. 2004c; Taddeo et al. 2002; Taddeo et al. 2004). Diese Literaturdaten konnten in der vorliegenden Arbeit in immortalisierten und primären MEFs und Makrophagen bestätigt werden (Kapitel 6.2.2 und 6.2.3). Eine HSV-1-Infektion führte in primären und immortalisierten WT MEFs und in immortalisierten WT Makrophagen zu einer starken Expression von TTP. Diese Stimulation war nicht vom Virusstamm abhängig, da fünf verschiedene HSV-1-Stämme, KOS, 17⁺, F, (KOS)tk12, HSV-1-Bac, das TTP stimulieren konnten. Der spezifische Inhibitor von p38 SB203580 konnte die TTP-Expression auf der Protein- und auf der mRNA-Ebene signifikant hemmen. Die Expression von TTP auf der Ebene des Proteins und der mRNA in MK2 defizienten Zellen war stark reduziert. Das korreliert mit den Beobachtungen von Hitti und Kollegen, dass MK2 eine TTP stabilisierende Rolle spielt (Hitti et al. 2006). Die TTP-Expression konnte in MK2^{-/-} Zellen weiterhin mit SB203580 gesenkt werden. Das spricht dafür, dass entweder p38 selbst oder auch andere Substrate von p38 an der Regulation von TTP beteiligt sind.

Mäuse sind nach einer TNF-Behandlung vor einer HSV-1-Infektion geschützt (Rossol-Voth et al. 1991). Mit LPS stimulierte und anschließend mit HSV-1 infizierte humane Monozyten zeigen eine erhöhte TNF-Produktion und eine gesenkte Anfälligkeit für eine HSV-1-Infektion (Cipollaro de L'Ero et al. 1998). So könnte es sein, dass TTP^{-/-} Mäuse durch die erhöhte TNF α -Menge resistenter gegenüber einer Infektion sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von TTP durch HSV-1 von MK2 abhängig ist. In MK2-defizienten MEFs war die Expression von TTP nach einer HSV-1 Infektion signifikant gesenkt im Vergleich zu WT. Möglicherweise wirkt sich eine HSV-1 Infektion wie eine LPS Stimulation aus. Nach einer LPS-Behandlung kommt es durch p38/MK2-Aktivierung zur erhöhten Zytokinproduktion. MK2 reguliert dabei die Translation und die Stabilität von Zytokin-mRNAs (Kotlyarov and Gaestel 2002). Gleichzeitig wird auch TTP-Expression stimuliert, das TTP durch MK2 phosphoryliert und stabilisiert. Die TTP-Phosphorylierung hemmt dabei dessen mRNA-destabilisierende Funktion (Hitti et al. 2006). Es wurde postuliert, dass erst dann, wenn p38 und MK2 nicht mehr aktiv sind, TTP dephosphoryliert und dadurch aktiviert wird und dann bestimmte ARE-enhaltende mRNAs destabilisieren kann. Dadurch wird gewährleistet, dass die inflammatorische Antwort zur rechten Zeit ausgeschaltet werden kann. Es wäre denkbar, dass Zellen sich mit Hilfe dieses Mechanismus auch bei einer HSV-1 Infektion vor einer lang andauernden erhöhten Zytokinproduktion schützen. In primären MEFs erreichte das phosphorylierte p38 sein Maximum nach einer achtstündigen Infektion, die Phosphorylierung von Hsp25/27 durch MK2 war ebenfalls nach acht Stunden am höchsten und nach zehn Stunden immer noch deutlich messbar. Das würde dafür sprechen, dass TTP - nach der Theorie von Hitti - frühestens zehn Stunden nach einer Infektion mRNAs destabilisieren konnte. Vielleicht stellt das ein ausgewogenes Verhältnis zwischen einem antiviralen Schutz und einem Ausschalten der Zytokinproduktion zur rechten Zeit dar.

Vieren haben verschiedene Strategien entwickelt, um der zellulären, antiviralen Antwort entgegenzuwirken. Die Expression der meisten zellulären Gene ist während einer Virusinfektion gesenkt (Smiley 2004). Das *virion host shutoff* Protein (*vhs*), kodiert durch das Gen UL₄₁, ist eines der HSV-1-Proteine, das in diesen Prozessen eine Rolle spielt (Esclatine et al. 2004a; Esclatine et al. 2004b; Esclatine et al. 2004c; Taddeo et al. 2002; Taddeo et al. 2004). Studien haben gezeigt, dass die mRNA-Degradation selektiv und eventuell sequenzspezifisch ist (Esclatine et al. 2004a; Esclatine et al. 2004b; Esclatine et al. 2004c; Taddeo et al. 2002; Taddeo et al. 2004). Von der *vhs*-abhängigen mRNA-Degradation sind viele ARE-enhaltende mRNAs betroffen. Diese Sequenzen sind in mRNAs, die für Onkogene,

Transkriptionsfaktoren und Zytokine kodieren, charakteristisch (Chen and Shyu 1995). Eine *vhs*^{-/-} HSV-1-Mutante, bei der die *vhs*-abhängige mRNA-Degradation nicht stattfinden kann, war signifikant effektiveres Immunogen als der *vhs*^{+/+} Stamm (Smiley 2004). Offensichtlich wirkt das *vhs* als virale RNase, um der zellulären Immunantwort zu entgehen. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die TTP Stimulation von *vhs* abhängig ist. Denkbar wäre, dass HSV-1 die TTP-Stimulation als eine zusätzliche Strategie entwickelte, um die Zytokinantwort bei der Infektion verstärkt auszuschalten und dadurch die eigene Replikation zu verbessern. Laut Hitti tritt die mRNA-destabilisierende Wirkung von TTP nach einer LPS-Stimulation erst ein, wenn p38/MK2 nicht mehr aktiv sind (Hitti et al. 2006). Sollte dieser Mechanismus auch bei einer HSV-Infektion zutreffen, wäre eine TTP-Stimulation durch HSV-1 als eine Strategie zum Abschwächen der Zytokinproduktion nicht haltbar. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MK2 nach einer Infektion von 10 Stunden immer noch Hsp27 phosphorylieren konnte, d.h. aktiv war. Das bedeutet, dass TTP in den ersten Stunden der Infektion inaktiv war und keine Degradation der Zytokin-mRNAs hervorrufen konnte. Somit wäre auszuschließen, dass HSV-1 durch eine TTP-Stimulation die eigene Replikation sichern sollte. Vermutlich handelt es sich hier eher um einen zellulären Mechanismus, der die Zytokinantwort nach der Infektion, ähnlich wie nach einer LPS-Stimulation, ausschaltet.

Auf der anderen Seite stimulieren ausgewählte RNA-Viren, das Canine Distemper Virus (CDV) und das Masernvirus (MV), die TTP Expression nicht. Wenn TTP nicht stimuliert wird, übernehmen möglicherweise andere ARE-bindende Faktoren, wie AUF2, FBP1, FBP2, TIA-1 und TIAR eine ähnliche Funktion, oder diese Viren nutzen andere Strategien, die nichts mit mRNA-Stabilität zu tun haben (Dean et al. 2004; Neiningen et al. 2002). Möglicherweise wird der p38/MK2-Signalweg durch diese Viren nicht aktiviert, weshalb auch TTP nicht stimuliert wird. Das Vesicular Stomatitis Virus (VSV) konnte hingegen die TTP-Expression hemmen. Es könnte sein, dass durch eine TTP-Hemmung die Zytokinantwort nach der Infektion über längere Zeit aufrechterhalten wird, was sich letztendlich zusätzlich schädigend auf die infizierten Zellen auswirkt.

Die Rolle der MK2 bzw. des TTP bei der HSV-1 Infektion sollte in biologischen Assays, die auf der Zytokinproduktion basieren, untersucht werden. Zunächst wurde der Viruseintritt untersucht, da dieser u.a. über Rezeptoren der TNF Rezeptor Familie vermittelt wird (Montgomery et al. 1996). Es wurde beschrieben, dass eine Inhibierung der viralen Replikation durch TNF besonders durch eine Hemmung des Viruseintrittes gewährleistet wird (Herbein and O'brien 2000). Weil in LPS stimulierten Zellen eine dramatische Senkung der TNF α -Produktion beobachtet wurde (Kotlyarov et al. 1999), wäre ein erhöhter Viruseintritt in MK2

defizienten Zellen denkbar. In immortalisierten MEFs und Makrophagen war der Viruseitritt in die MK2^{-/-} Zellen fünffach bzw. dreifach stärker als in WT Zellen. Leider hat sich dieser Effekt in primären Zellen nicht bestätigt. Durch eine Generierung neuer Klone immortalisierter MEFs wurden Hinweise dafür gefunden, dass der Phänotyp der immortalisierten Zellen möglicherweise auf die Transformation zurückzuführen ist. In primären MEFs konnten keine Unterschiede in der viralen Expression beobachtet werden, was auch mit der Bildung und der Größe der Plaques korrelierte.

Im Weiteren wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, um quantitativ das Sterben der verschiedenen Zellen bei einer HSV-1-Infektion zu ermitteln. Das Zellsterben tritt nach einer erfolgreichen Virusreplikation ein und stellt somit das Ergebnis aller viralen und zellulären Mechanismen, welche auch die Zytokinproduktion beinhalten, dar. In der Regel sollte sich eine erhöhte Zytokinproduktion auch autokrin bemerkbar machen und den Zellen eine erhöhte Resistenz gegen eine Infektion verleihen. Die MK2^{-/-} und TTP^{-/-} Zellen zeigten in diesem Assay eine erhöhte Resistenz. Es wäre zu erwarten, dass es in MK2^{-/-} Zellen, bei denen eine dramatische Reduktion von TNF α , IL6 und IL10 beobachtet wurde (Kotlyarov and Gaestel 2002; Kotlyarov et al. 1999), zu einer gesenkten Resistenz der Zellen nach einer Infektion kommt. Beispielweise wurde gezeigt, dass MK2^{-/-} Mäuse eine gesenkte Resistenz gegenüber einer *Listeria monocytogenes* Infektion aufweisen (Lehner et al. 2002). Eine effiziente zelluläre Abwehr ist von einer intakten inflammatorischen Antwort abhängig. Die mit HSV-1 infizierten MK2^{-/-} Zellen zeigten jedoch eine vierfach höhere Resistenz im Vergleich zu WT. Parallel zeigten die TTP-defizienten MEFs eine achtfach höhere Resistenz. Die TTP^{-/-} Mäuse weisen eine erhöhte Konzentration an TNF α im Blut auf (Carrick et al. 2004). Diese erhöhte Konzentration an TNF α und möglicherweise an anderen Zytokinen könnte diesen Zellen eine bessere Resistenz vermittelt haben. TNF α behandelte Zellen weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer HSV-1 Infektion auf (Rossol-Voth et al. 1991). Somit geht dieses Ergebnis mit den Literaturdaten konform. Konsequenterweise könnte erwartet werden, dass die MK2^{-/-} Zellen eine verminderte Resistenz gegen HSV-1 im Vergleich zu WT aufweisen. Diese überlebten jedoch besser als WT. Das Ergebnis in MK2^{-/-} Zellen lässt vermuten, dass das beobachtete Zellensterben nicht allein auf die Produktion von Zytokinen, wie TNF α zurückzuführen ist. Eine Virusinfektion kann in den Zellen Apoptose auslösen. Eine Induktion der Apoptose in der frühen Phase der Infektion würde jedoch eine Virusreplikation limitieren, daher haben viele Viren Strategien entwickelt, die Apoptose zu inhibieren (Zachos et al. 2001). Auf der anderen Seite können manche Viren Apoptose in der späten Phase der Infektion stimulieren, was die Verbreitung der Viren erleichtert (Teodoro and Branton 1997). HSV-1

kann eine apoptotische DNA-Fragmentierung und Zellsterben inhibieren (Koyama and Miwa 1997) und gleichzeitig das antiapoptotische Protein Bcl-2 stimulieren (Zachos et al. 2001). HSV-1 hemmt dabei die p38-abhängige Destabilisierung von Bcl-2, was mit gesenkter Apoptose und erhöhter Replikation korreliert (Zachos et al. 2001). So könnte es sein, dass dieser Prozess in den MK2^{-/-} Zellen gestört ist und die Zellen dadurch besser überleben.

In einem *Plaque Reduction Assay* sollte die gesamte Zytokinproduktion in den verschiedenen Zellen untersucht werden. Die Überstände infizierter Zellen, die möglicherweise Zytokine enthielten, wurden auf infizierte Verozellen gegeben. Sollten die Überstände unterschiedliche Zytokinmengen beinhalten, könnte sich das in dem Ausmaß der Infektion in den Verozellen bemerkbar machen. Die Infektion der Verozellen verlief jedoch unabhängig von den verschiedenen Überständen gleich. Es konnten weder Unterschiede zwischen Zellkulturüberständen der MEFs noch der Makrophagen festgestellt werden. Auch in der Kontrolle mit STAT1^{+/+} und STAT1^{-/-} MEFs konnten in diesem Assay keine Unterschiede beobachtet werden. STAT1^{-/-} MEFs produzieren zwar kein IFN α , können aber weiterhin IFN β produzieren. In diesem Assay wird ein Gemisch aller antiviralen Zytokine gemessen. So kann es sein, dass die Produktion mancher Zytokine inhibiert ist, diese werden aber von anderen antiviralen Substanzen, anderen Zytokinen ausgeglichen. Diese Hypothese wird besonders dadurch verstärkt, dass das rekombinante IFN α signifikant eine protektive Wirkung auf die infizierten Verozellen zeigte.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine HSV-1 Infektion den p38/MK2-Signalweg aktiviert. Auch eine Stimulation von TTP-Expression konnte beobachtet werden. Die Stimulation von TTP durch HSV-1 scheint durch einen ähnlichen Mechanismus reguliert zu werden, wie eine LPS stimulierte TTP-Expression. Mit der erhöhten Menge von TNF in TTP-defizienten Mäusen korreliert die Beobachtung, dass TTP^{-/-} MEFs eine sechsfach höhere Resistenz im Vergleich zu WT gegenüber einer HSV-1 Infektion aufwiesen. Obwohl in MK2^{-/-} die Produktion mancher Zytokine, wie TNF α , IL-6, IL-10 reduziert ist (Kotlyarov et al. 1999), zeigten die MK2^{-/-} MEFs eine dreifach höhere Resistenz im Vergleich zu WT. Das könnte eventuell mit einer gestörten Apoptose zusammenhängen. Weder der Viruseintritt noch die im Plaque Assay untersuchte Zytokinproduktion wiesen Unterschiede zwischen WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} Zellen auf. Möglicherweise sollten in diesem Zusammenhang einzelne Zytokine untersucht werden, statt die gesamten sezernierten antiviralen Faktoren in einer Messung zu verfolgen.

8.3 Physiologische Bedeutung der Immortalisierung von Zellen

Primäre Zellen haben in Kultur eine begrenzte Lebensdauer, d.h. sie stellen nach einer endlichen Zahl von Zellteilungen ihr Wachstum ein. Beispielweise teilen sich menschliche Fibroblasten in der Kultur ca. 50 mal (HAYFLICK and MOORHEAD 1961), während murine Zellen bereits nach 8-10 Zellteilungen das Replikationslimit erreichen. Dies korreliert mit der Verkürzung der Telomere. In humanen Zellen findet eine Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung statt und es wird angenommen, dass das mit dem beobachteten Replikationslimit zusammenhängt (Harley et al. 1990). Es wurde gezeigt, dass durch eine Überexpression der Telomerase eine Immortalisierung humaner Zellen erzielt werden kann (Bodnar et al. 1998; Steinert et al. 2000). Dieses Enzym verhindert die Telomerverkürzung, indem es mehrere Wiederholungen der Sequenz „TTAGGG“ an die Chromosomenenden anfügt. Die begrenzte Teilungsfähigkeit primärer Zellen, auch Zellalterung genannt, stellt den wesentlichen Nachteil dieser Zellen dar. So sind Zelllinien in vielen naturwissenschaftlichen Disziplinen zu einem wichtigen Werkzeug geworden, da sie praktisch in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen. Ein weiterer Vorteil der Zelllinien sind ihre konstanten Eigenschaften, während sich verschiedene Chargen oder Passagen primärer Zellen häufig stark voneinander unterscheiden. Für die Etablierung einer Zelllinie müssen Mechanismen, die das Replikationspotential der Zellen abschwächen, außer Kraft gesetzt werden. Das kann in der Kultur spontan durch Mutationen von Tumorsuppressoren oder durch eine Überexpression viraler Onkogene geschehen. In dem s.g. 3T3-Protokoll wurde beschrieben, dass es in murinen embryonalen Fibroblasten durch eine bestimmte Art von Passagieren zu spontanen Mutationen kommt, die manchen dieser Zellen eine weitere Proliferation ermöglicht (Todaro and Green 1963). Später wurde gezeigt, dass in Zellen, die nach dem 3T3-Protokoll immortalisiert wurden, bestimmte Tumorsuppressoren, wie p53 (Harvey and Levine 1991; Rittling and Denhardt 1992), p16Ink4a oder p19Arf (Kamijo et al. 1997) inaktiviert wurden. In den meisten Fällen werden jedoch gezielte Immortalisierungen mit Hilfe viraler Onkogene durchgeführt, wie beispielweise *Simian Virus 40 (SV40) Large T Antigen*, E6 und E7 der humanen Papillomaviren oder die adenovirale Proteine E1a und E1b. Allgemein kann man sagen, dass diese Onkogene Tumorsuppressoren, wie das p53 und das Retinoblastoma Protein (pRB), inaktivieren. Zellen, die durch Onkogene immortalisiert wurden, werden als transformierte Zelllinien bezeichnet, da sie tumorigen sind (Drayton and Peters 2002).

Onkogene lösen in den Zellen, neben der Immortalisierung, enorme Veränderungen aus und beeinflussen ihre Physiologie. Nach einer Transformation können verschiedene morphologische und physiologische Veränderungen, wie abgeschwächte Abhängigkeit von

Wachstumsfaktoren, Verlust der Kontaktinhibition, Fähigkeit zum Wachstum im Weichagar, Abrundungen des Zellkörpers und Stressfaser, beobachtet werden. Somit können sich transformierte Zellen von ihren Vorläuferzellen deutlich unterscheiden.

In dieser Arbeit konnten signifikante Unterschiede zwischen den primären und den immortalisierten Zellen in zellulären Assays, wie der Viruseintritt- oder der Zellproliferation- und der Caspase 3/7-Messung, nach einer UV-Stimulation gezeigt werden. Die Ergebnisse, die mit immortalisierten Zellen reproduzierbar und durch einen *Rescue*-Versuch gesichert waren, konnten in primären Zellen nicht bestätigt werden. In einem weiteren Schritt wurden durch das Einbringen des *Simian Virus 40 (SV40) Large T Antigen* in die primären MEFs neue Klone von immortalisierten MEFs generiert und untereinander verglichen. Während die Zellproliferation der mit UV induzierten Klone gleich war, konnten signifikante Unterschiede beim Viruseintritt gezeigt werden. Dadurch wurde besonders deutlich, dass eine Transformation die Physiologie der Zellen grundlegend verändern kann und dass auch Unterschiede zwischen einzelnen Klonen immortalisierten Zellen bestehen können. Eventuell ist das darauf zurückzuführen, ob und wie die Onkogene in das Genom der Zellen integriert wurden.

Im Weiteren konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die auf die gleiche Art isolierten RNA-Mengen aus primären Zellen wesentlich niedriger waren als die isolierten RNA-Mengen aus immortalisierten Zellen. Ronkina konnte zeigen, dass die MK3-Menge auf der Protein- und mRNA-Ebene signifikant höher in primären als in immortalisierten MEFs ist (Ronkina, N, unveröffentlicht). So konnte die Proteinkinase MK3 in primären MEFs schwach in den WT und in den MK2^{-/-} Zellen sowohl auf der Protein- als auch der mRNA-Ebene detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in den immortalisierten WT MEFs - auch bei einer zweifachen Proteinmenge im Vergleich zu primären MEFs - kein MK3 detektiert werden. Auch die detektierte Menge in immortalisierten MK2^{-/-} MEFs war schwächer als in den primären MK2^{-/-} MEFs.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die generelle Frage, ob immortalisierte Zellen ein gutes Modell für die Aufklärung physiologischer Fragestellungen sind. Zelllinien mit einem konstitutiv exprimierten Onkogen eignen sich nur bedingt für Untersuchungen molekularer Prozesse, da das Onkogen oder seine Effektoren mit diesen Prozessen interferieren können. Zum einen unterscheiden sich immortalisierte und primäre Zellen, zum anderen können sich verschiedene Klone der immortalisierten Zellen unterschiedlich verhalten. Primäre Zellen stellen jedoch keine perfekte Alternative dar, da sie eine begrenzte Lebensdauer aufweisen und verschiedene Chargen und Passagen dieser Zellen unterschiedlich sind. So sollten möglichst

junge primäre Zellen in der gleichen Passage verwendet werden. Versuche in Zellkultur *in vitro* sollten letztendlich durch *in vivo* Experimente bestätigt werden.

Es wurde eine modernisierte Methode der Immortalisierungen, die s.g. konditionale Immortalisierung, welche eine strikte transkriptionelle Regulation des immortalisierenden Gens ermöglicht, entwickelt. Hierzu wurde ein modifiziertes Tet-abhängiges autoregulierendes System genutzt, welches alle nötigen Komponenten für Regulation, Selektion und Immortalisation (*Simian Virus 40 (SV40) Large T Antigen*) auf einem Plasmid pRITA (Reversible Immortalisierung mittels TAg) besaß (May et al. 2004). Trotz Basalexpression der rekombinanten Gene dieses Systems konnte eine sehr stringente Proliferationskontrolle erreicht werden. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die pRITA-Zellen sich weiterhin stark von den primären unterscheiden. Trotzdem bringt dieses System einen Vorteil mit sich, eine effizientere Kontrolle des immortalisierenden Gens, und damit auch dessen Einfluß auf die Zelle.

9 Ausblick

MK2 ist an der Regulation von uPA und uPAR auf der Ebene der mRNA-Stabilität beteiligt. TTP ist eines der Proteine, die die mRNA-Stabilität von uPA negativ beeinflussen. Neben TTP gibt es auch andere MK2-abhängige Faktoren, die die Transkription und/oder die Stabilität von uPA regulieren. Es sollten weitere Proteine, wie AUF2, FBP1, FBP2, TIA-1 und TIAR bei der Regulation von uPA und uPAR untersucht werden, da diese an die AREs binden können (Dean et al. 2004; Neining et al. 2002).

Da nicht eindeutig gezeigt werden konnte, dass uPA für das verminderte Endothelzellwachstum in einem Angiogenesemodell verantwortlich ist, müssten andere Komponenten des Urokinase Plasminogen Systems, wie uPAR, Plasminogen, PAI-1 und PAI-2 im weiteren auf der Protein- und der mRNA-Ebene untersucht werden. Auch andere Faktoren, die an der Angiogenese beteiligt sind, und möglicherweise AREs die in der 3'-nichttranslatierten mRNA enthalten sind, wären in diesem Zusammenhang von Bedeutung. In der Literatur sind kontroverse Daten über die p38-abhängige uPA-mRNA-Regulation zu finden (Frevel et al. 2003; Montero and Nagamine 1999). Es muß beachtet werden, dass sich p38 - in Abhängigkeit vom Stimulus oder vom Zellsystem - stabilisierend oder destabilisierend auf uPA-mRNA auswirken kann.

In dem Aorta Ring Modell sollte neben dem PAI-1, welches der wichtigste Inhibitor des uPA/uPAR-Komplexes ist, auch PAI-2 untersucht werden. Vitronectin kann an den uPA-Rezeptor binden und dadurch die Zellmigration stimulieren.

Die Aktivierung sowohl von p38 als auch von TTP durch HSV-1 wurde in dieser Arbeit bestätigt. Die TTP-Regulation in HSV-1 infizierten Makrophagen verlief ähnlich wie in LPS stimulierten Makrophagen. Vesicular Stomatitis Virus, ein RNA-Virus, inhibierte die Expression von TTP. Möglicherweise handelt es sich hier um einen viralen Mechanismus, der die Zellschädigung und dadurch die Verbreitung der Viren verstärkt. Eine weitergehende Untersuchung dieses Mechanismus wäre auch aus medizinisch-therapeutischen Gründen sinnvoll.

Offensichtlich führt eine Deletion von TTP zu einer erhöhten Resistenz gegen HSV-1 im Vergleich zu WT und MK2^{-/-}. Überraschenderweise waren auch die MK2^{-/-} Zellen resistenter als WT. Eine Untersuchung der Apoptose parallel zu einer Messung der Zellvitalität der infizierten Zellen sollte zunächst erfolgen. Auch die Stabilität und die Halbwertszeit des Bcl-2 Proteins in den MK2^{-/-} Zellen sollte untersucht werden.

Da beim Vergleich der protektiven Wirkung der Überstände infizierter Zellen keine Unterschiede festgestellt werden konnten, sollten mögliche Unterschiede in der Zytokinproduktion von WT, MK2^{-/-} und TTP^{-/-} Zellen durch eine Messung der einzelnen Zytokine untersucht werden.

Alle weiteren Untersuchungen sollten möglichst in primären Zellen, wie MEFs, Makrophagen oder Endothelzellen durchgeführt werden.

10 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M.: Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Dev.* 17: 2481-2495, 2003
- Adams, R., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R., and Nebreda, A.: Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* 6: 109-16, 2000
- Adamson, A. L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R. A., Mauser, A., Swenson, J., and Kenney, S.: Epstein-Barr Virus Immediate-Early Proteins BZLF1 and BRLF1 Activate the ATF2 Transcription Factor by Increasing the Levels of Phosphorylated p38 and c-Jun N-Terminal Kinases. *J. Virol.* 74: 1224-1233, 2000
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.: Molekularbiologie der Zelle, 2004
- Alfano, D., Franco, P., Vocca, I., Gambi, N., Pisa, V., Mancini, A., Caputi, M., Carriero, M., Iaccarino, I., and Stoppelli, M.: The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* 93: 205-11, 2005
- Allen, M., Svensson, L., Roach, M., Hambor, J., McNeish, J., and Gabel, C. A.: Deficiency of the Stress Kinase p38{alpha} Results in Embryonic Lethality: Characterization of the Kinase Dependence of Stress Responses of Enzyme-deficient Embryonic Stem Cells. *J. Exp. Med.* 191: 859-870, 2000
- Ambrosino, C., Mace, G., Galban, S., Fritsch, C., Vintersten, K., Black, E., Gorospe, M., and Nebreda, A. R.: Negative Feedback Regulation of MKK6 mRNA Stability by p38{alpha} Mitogen-Activated Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* 23: 370-381, 2003
- Ankel, H., Westra, D., Welling-Wester, S., and Lebon, P.: Induction of interferon-alpha by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors. *Virology* 251: 317-26, 1998
- Argast, G., Fausto, N., and Campbell, J.: Inhibition of RIP2/RICK/CARDIAK activity by pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAPK. *Mol Cell Biochem* 268: 129-40, 2005
- Atfi, A., Buisine, M., Mazars, A., and Gespach, C.: Induction of Apoptosis by DPC4, a Transcriptional Factor Regulated by Transforming Growth Factor-beta through Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase (SAPK/JNK) Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 24731-24734, 1997
- Badger, A., Bradbeer, J., Votta, B., Lee, J., Adams, J., and Griswold, D.: Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 1453-1461, 1996
- Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Schmitt, P. M., Albert, V., Praus, M., Lund, L. R., Frandsen, T. L., Brunner, N., Dano, K., Fusenig, N. E., Weidle, U., Carmeliet, G., Loskutoff, D., Collen, D., Carmeliet, P., Foidart, J. M., and Noel, A.: The Plasminogen Activator Inhibitor PAI-1 Controls In Vivo Tumor Vascularization by Interaction with Proteases, Not Vitronectin: Implications for Antiangiogenic Strategies. *J. Cell Biol.* 152: 777-784, 2001
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H., and Marshall, C.: Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* 8: 1049-57, 1998
- Ben-Levy, R., Leighton, I., Doza, Y., Attwood, P., Morrice, N., Marshall, C., and Cohen, P.: Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* 14: 5920-5930, 1995
- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G.: Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein

- HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* 269: 20780-20784, 1994
- Blasi, F. and Carmeliet, P.: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 932-43, 2002
- Blasi, F., Vassalli, J., and Dano, K.: Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J. Cell Biol.* 104: 801-804, 1987
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C.-P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., and Wright, W. E.: Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 279: 349-352, 1998
- Bond, J. A., Houghton, M. F., Rowson, J. M., Smith, P. J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., and Wyllie, F. S.: Control of Replicative Life Span in Human Cells: Barriers to Clonal Expansion Intermediate Between M1 Senescence and M2 Crisis. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3103-3114, 1999
- Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54, 1976
- Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., and Gustin, M. C.: An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259: 1760-3, 1993
- Bright, R., Vocke, C., Emmert-Buck, M., Duray, P., Solomon, D., Fetsch, P., Rhim, J., Linehan, W., and Topalian, S.: Generation and genetic characterization of immortal human prostate epithelial cell lines derived from primary cancer specimens. *Cancer Res.* 57: 995-1002, 1997
- Brook, M., Sully, G., Clark, A., and Saklatvala, J.: Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett* 483: 57-61, 2000
- Bulavin, D., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L., Anderson, C., Appella, E., and Fornace, A.: Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* 36: 343-50, 2004
- Butt, E., Immler, D., Meyer, H. E., Kotlyarov, A., Laa{beta}, K., and Gaestel, M.: Heat Shock Protein 27 Is a Substrate of cGMP-dependent Protein Kinase in Intact Human Platelets. PHOSPHORYLATION-INDUCED ACTIN POLYMERIZATION CAUSED BY HSP27 MUTANTS. *J. Biol. Chem.* 276: 7108-7113, 2001
- Caenepeel, S., Charyczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T., and Manning, G.: The mouse kinome: Discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *PNAS* 101: 11707-11712, 2004
- CAMPS, M., NICHOLS, A., and ARKINSTALL, S.: Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J* 14: 6-16, 2000
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., and Arkininstall, S.: Catalytic Activation of the Phosphatase MKP-3 by ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Science* 280: 1262-1265, 1998
- Carballo, E., Cao, H., Lai, W. S., Kennington, E. A., Campbell, D., and Blackshear, P. J.: Decreased Sensitivity of Tristetraprolin-deficient Cells to p38 Inhibitors Suggests the Involvement of Tristetraprolin in the p38 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 42580-42587, 2001
- Carballo, E., Lai, W. S., and Blackshear, P. J.: Feedback Inhibition of Macrophage Tumor Necrosis Factor- α Production by Tristetraprolin. *Science* 281: 1001-1005, 1998
- Carrick, D., Lai, W., and Blackshear, P.: The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 248-64, 2004
- Chang, L. and Karin, M.: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001

- Chen, C. and Shyu, A.: AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20: 465-70, 1995
- Chen, J., Baskerville, C., Han, Q., Pan, Z. K., and Huang, S.: alpha v Integrin, p38 Mitogen-activated Protein Kinase, and Urokinase Plasminogen Activator Are Functionally Linked in Invasive Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 276: 47901-47905, 2001
- Cherrington, J. M. and Mocarski, E. S.: Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol* 63: 1435-40, 1989
- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., and Gusovsky, F.: Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 274: 10689-10692, 1999
- Christie, G. R., Williams, D. J., MacIsaac, F., Dickinson, R. J., Rosewell, I., and Keyse, S. M.: The Dual-Specificity Protein Phosphatase DUSP9/MKP-4 Is Essential for Placental Function but Is Not Required for Normal Embryonic Development. *Mol. Cell. Biol.* 25: 8323-8333, 2005
- Chu, Y., Solski, P. A., Khosravi-Far, R., Der, C. J., and Kelly, K.: The Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 Have Unique Substrate Specificities and Reduced Activity in Vivo toward the ERK2 sevenmaker Mutation. *J. Biol. Chem.* 271: 6497-6501, 1996
- Cipollaro de L'Ero, G., Marcatili, A., Folgore, A., Donnarumma, G., and Petrillo, G.: TNF-alpha expression and herpes simplex infection in human monocytes treated with growth hormone, prolactin and insulin. *New Microbiol* 21: 213-20, 1998
- Clark, A.: Post-transcriptional regulation of pro-inflammatory gene expression. *Arthritis Res* 2: 172-4, 2000
- Clifton, A., Young, P., and Cohen, P.: A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* 392: 209-14, 1996
- Cowan, K. J. and Storey, K. B.: Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.* 206: 1107-1115, 2003
- Cubellis, M., Wun, T., and Blasi, F.: Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J* 9: 1079-85, 1990
- Cuenda, A. and Dorow, D.: Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem J* 333 (Pt 1): 11-5, 1998
- Darnell, J. E., Jr.: STATs and Gene Regulation. *Science* 277: 1630-1635, 1997
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R.: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-21, 1994
- de Laszlo, S., Visco, D., Agarwal, L., Chang, L., Chin, J., Croft, G., Forsyth, A., Fletcher, D., Frantz, B., Hacker, C., Hanlon, W., Harper, C., Kostura, M., Li, B., Luell, S., MacCoss, M., Mantlo, N., O'Neill, E., Orevillo, C., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Sahly, Y., Sidler, K., and O'Keefe, S.: Pyrroles and other heterocycles as inhibitors of p38 kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 8: 2689-94, 1998
- De Zutter, G. S. and Davis, R. J.: Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *PNAS* 98: 6168-6173, 2001
- Dean, J., Sully, G., Clark, A., and Saklatvala, J.: The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* 16: 1113-21, 2004
- Denhardt, D.: Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318 (Pt 3): 729-47, 1996

- DEVY, L., BLACHER, S., GRIGNET-DEBRUS, C., BAJOU, K., MASSON, V., GERARD, R. D., GILS, A., CARMELIET, G., CARMELIET, P., DECLERCK, P. J., NOEL, A., and FOIDART, J.-M.: The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J* 16: 147-154, 2002
- Dhanasekaran, N.: Cell signaling: an overview. *Oncogene* 17: 1329-30, 1998
- Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E.: Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17: 1447-55, 1998
- Dickinson, R., Williams, D., Slack, D., Williamson, J., Seternes, O., and Keyse, S.: Characterization of a murine gene encoding a developmentally regulated cytoplasmic dual-specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase. *Biochem J* 364: 145-55, 2002
- Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., and Sodeik, B.: Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport. *Mol. Biol. Cell* 13: 2795-2809, 2002
- Dowd, S., Sneddon, A., and Keyse, S.: Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *J. Cell Sci.* 111: 3389-3399, 1998
- Drayton, S. and Peters, G.: Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev* 12: 98-104, 2002
- Duffy, M. J.: The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Current Pharmaceutical Design* 10: 39-49, 2004
- Durbin, J., Hackenmiller, R., Simon, M., and Levy, D.: Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84: 443-50, 1996
- Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenstrom, P., Heuchel, R., Heldin, N.-E., ten Dijke, P., Heldin, C.-H., and Landstrom, M.: Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-beta)-induced Apoptosis of Prostate Cancer Cells Involves Smad7-dependent Activation of p38 by TGF-beta-activated Kinase 1 and Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 3. *Mol. Biol. Cell* 14: 529-544, 2003
- Engel, K., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.: Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.* 17: 3363-3371, 1998
- Engel, K., Plath, K., and Gaestel, M.: The MAP kinase-activated protein kinase 2 contains a proline-rich SH3-binding domain. *FEBS Lett* 336: 143-7, 1993
- Engel, K., Schultz, H., Martin, F., Kotlyarov, A., Plath, K., Hahn, M., Heinemann, U., and Gaestel, M.: Constitutive Activation of Mitogen-activated Protein Kinase-activated Protein Kinase 2 by Mutation of Phosphorylation Sites and an A-helix Motif. *J. Biol. Chem.* 270: 27213-27221, 1995
- English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M.: New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253: 255-70, 1999
- Enquist, L., Husak, P., Banfield, B., and Smith, G.: Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* 51: 237-347, 1998
- Esclatine, A., Taddeo, B., Evans, L., and Roizman, B.: The herpes simplex virus 1 UL41 gene-dependent destabilization of cellular RNAs is selective and may be sequence-specific. *PNAS* 101: 3603-3608, 2004a
- Esclatine, A., Taddeo, B., and Roizman, B.: Herpes Simplex Virus 1 Induces Cytoplasmic Accumulation of TIA-1/TIAR and both Synthesis and Cytoplasmic Accumulation of Tristetraprolin, Two Cellular Proteins That Bind and Destabilize AU-Rich RNAs. *J. Virol.* 78: 8582-8592, 2004b
- Esclatine, A., Taddeo, B., and Roizman, B.: The UL41 protein of herpes simplex virus mediates selective stabilization or degradation of cellular mRNAs. *PNAS* 101: 18165-18170, 2004c

- Estreicher, A., Muhlhauser, J., Carpentier, J., Orci, L., and Vassalli, J.: The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J. Cell Biol.* 111: 783-792, 1990
- Fjeld, C., Rice, A., Kim, Y., Gee, K., and Denu, J.: Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 6749-6757, 2000
- Freshney, N., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J.: Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78: 1039-49, 1994
- Frevel, M. A. E., Bakheet, T., Silva, A. M., Hissong, J. G., Khabar, K. S. A., and Williams, B. R. G.: p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent and -Independent Signaling of mRNA Stability of AU-Rich Element-Containing Transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 23: 425-436, 2003
- Galdiero, S., Vitiello, M., D'Isanto, M., Di Niola, E., Peluso, L., Raieta, K., Pedone, C., Galdiero, M., and Benedetti, E.: Induction of signaling pathways by herpes simplex virus type 1 through glycoprotein H peptides. *Biopolymers* 76: 494-502, 2004
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Spear, P. G.: Entry of Alpha herpesviruses Mediated by Poliovirus Receptor-Related Protein 1 and Poliovirus Receptor. *Science* 280: 1618-1620, 1998
- Gerthoffer, W. T. and Gunst, S. J.: Signal Transduction in Smooth Muscle: Invited Review: Focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91: 963-972, 2001
- Ghiso, J. A. A., Alonso, D. F., Farias, E. F., Gomez, D. E., and Bal de Kier Joffe, E.: Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur. J. Biochem.* 263: 295-304, 1999
- Groom, L., Sneddon, A., Alessi, D., Dowd, S., and Keyse, S.: Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J.* 15: 3621-3632, 1996
- Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Belnap, D. M., Baumeister, W., and Steven, A. C.: Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302: 1396-8, 2003
- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J., Huot, J., and Landry, J.: Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci.* 110: 357-368, 1997
- Gudjonsson, T., Villadsen, R., Ronnov-Jessen, L., and Petersen, O.: immortalization protocols used in cell culture models of human breast morphogenesis. *Cell Mol Life Sci* 61: 2523-34, 2004
- Gum, R. and Young, P.: Identification of two distinct regions of p38 MAPK required for substrate binding and phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 284-9, 1999
- Hahn, W.: immortalization and transformation of human cells. *Mol Cells* 13: 351-61, 2002
- Hammonds, T. R., Denyer, S. P., Jackson, D. E., and Irving, W. L.: Studies to show that with podophyllotoxin the early replicative stages of herpes simplex virus type 1 depend upon functional cytoplasmic microtubules. *J. Med. Microbiol.* 45: 167-172, 1996
- Han, J., Lee, J., Tobias, P., and Ulevitch, R.: Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J. Biol. Chem.* 268: 25009-25014, 1993
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J.: A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265: 808-11, 1994
- Han, Q., Leng, J., Bian, D., Mahanivong, C., Carpenter, K. A., Pan, Z. K., Han, J., and Huang, S.: Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 Pathway Promotes Urokinase Plasminogen

- Activator mRNA Stability in Invasive Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 277: 48379-48385, 2002
- Hanks, S. and Hunter, T.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9: 576-596, 1995
- Hannigan, M. O., Zhan, L., Ai, Y., Kotlyarov, A., Gaestel, M., and Huang, C.-K.: Abnormal Migration Phenotype of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2-/- Neutrophils in Zigmond Chambers Containing Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Gradients. *J. Immunol.* 167: 3953-3961, 2001
- Hargett, D., McLean, T., and Bachenheimer, S. L.: Herpes Simplex Virus ICP27 Activation of Stress Kinases JNK and p38. *J. Virol.* 79: 8348-8360, 2005
- Harley, C., Futcher, A., and Greider, C.: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-60, 1990
- Harvey, D. and Levine, A.: p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes & Dev.* 5: 2375-2385, 1991
- HAYFLICK, L. and MOORHEAD, P.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621, 1961
- Hazzalin, C., Cuenda, A., Cano, E., Cohen, P., and Mahadevan, L.: Effects of the inhibition of p38/RK MAP kinase on induction of five fos and jun genes by diverse stimuli. *Oncogene* 15: 2321-31, 1997
- Hedges, J. C., Dechert, M. A., Yamboliev, I. A., Martin, J. L., Hickey, E., Weber, L. A., and Gerthoffer, W. T.: A Role for p38MAPK/HSP27 Pathway in Smooth Muscle Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 274: 24211-24219, 1999
- Herbein, G. and O'Brien, W. A.: Tumor Necrosis Factor (TNF)-{alpha} and TNF Receptors in Viral Pathogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 241-257, 2000
- Herlaar, E. and Brown, Z.: p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 5: 439-47, 1999
- Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A. D., Radzioch, D., Clark, A. R., Blackshear, P. J., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.: Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 Regulates Tumor Necrosis Factor mRNA Stability and Translation Mainly by Altering Tristetraprolin Expression, Stability, and Binding to Adenine/Uridine-Rich Element. *Mol. Cell. Biol.* 26: 2399-2407, 2006
- Hu, M. C.-T., Wang, Y.-p., Mikhail, A., Qiu, W. R., and Tan, T.-H.: Murine p38-delta Mitogen-activated Protein Kinase, a Developmentally Regulated Protein Kinase That Is Activated by Stress and Proinflammatory Cytokines. *J. Biol. Chem.* 274: 7095-7102, 1999
- Huang, C., Ma, W.-Y., Maxiner, A., Sun, Y., and Dong, Z.: p38 Kinase Mediates UV-induced Phosphorylation of p53 Protein at Serine 389. *J. Biol. Chem.* 274: 12229-12235, 1999
- Huang, S., Jiang, Y., Li, Z., Nishida, E., Mathias, P., Lin, S., Ulevitch, R., Nemerow, G., and Han, J.: Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b. *Immunity* 6: 739-49, 1997
- Huang, S., New, L., Pan, Z., Han, J., and Nemerow, G. R.: Urokinase Plasminogen Activator/Urokinase-specific Surface Receptor Expression and Matrix Invasion by Breast Cancer Cells Requires Constitutive p38alpha Mitogen-activated Protein Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* 275: 12266-12272, 2000
- Huttunen, P., Hyypia, T., Vihinen, P., Nissinen, L., and Heino, J.: Echovirus 1 infection induces both stress- and growth-activated mitogen-activated protein kinase pathways and regulates the transcription of cellular immediate-early genes. *Virology* 250: 85-93, 1998
- Irigoyen, J. P., Besser, D., and Nagamine, Y.: Cytoskeleton Reorganization Induces the Urokinase-type Plasminogen Activator Gene via the Ras/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 1904-1909, 1997

- Janknecht, R. and Hunter, T.: Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.* 16: 1620-1627, 1997
- Jensen, P., Christensen, E., Ebbesen, P., Gliemann, J., and Andreasen, P.: Lysosomal degradation of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator is enhanced by its inhibitors in human trophoblastic choriocarcinoma cells. *Cell Regul* 1: 1043-56, 1990
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., and Han, J.: Characterization of the Structure and Function of a New Mitogen-activated Protein Kinase (p38beta). *J. Biol. Chem.* 271: 17920-17926, 1996
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R. J., and Han, J.: Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Group Mitogen-activated Protein Kinases, p38delta. *J. Biol. Chem.* 272: 30122-30128, 1997
- Johnson, G. L. and Lapadat, R.: Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 298: 1911-1912, 2002
- Juo, P., Kuo, C., Reynolds, S., Konz, R., Raingeaud, J., Davis, R., Biemann, H., and Blenis, J.: Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases [published erratum appears in Mol Cell Biol 1997 Mar;17(3):1757]. *Mol. Cell. Biol.* 17: 24-35, 1997
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M., Quelle, D., Downing, J., Ashmun, R., Grosveld, G., and Sherr, C.: Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91: 649-59, 1997
- Karin, M. and Lin, A.: NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-7, 2002
- Keyse, S.: Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12: 186-92, 2000
- Khanna, K., Lepisto, A., Decman, V., and Hendricks, R.: Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol* 16: 463-9, 2004a
- Khanna, K., Lepisto, A., and Hendricks, R.: Immunity to latent viral infection: many skirmishes but few fatalities. *Trends Immunol* 25: 230-4, 2004b
- Kjoller, L.: The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility. *Biol Chem* 383: 5-19, 2002
- Klapper, P. and Cleator, G.: Herpes simplex virus. *Intervirology* 40: 62-71, 1997
- Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Carballo, E., Alexopoulou, L., Blackshear, P. J., Gaestel, M., Davis, R., Flavell, R., and Kollias, G.: Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J.* 20: 3760-3770, 2001
- Koppers-Lalic, D., Rijsewijk, F. A. M., Verschuren, S. B. E., van Gaans-van den Brink, J. A. M., Neisig, A., Rensing, M. E., Neefjes, J., and Wiertz, E. J. H. J.: The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 82: 2071-2081, 2001
- Kotlyarov, A. and Gaestel, M.: Is MK2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2) the key for understanding post-transcriptional regulation of gene expression? *Biochem Soc Trans* 30: 959-63, 2002
- Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H., and Gaestel, M.: MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* 1: 94-7, 1999
- Kotlyarov, A., Yannoni, Y., Fritz, S., Laass, K., Telliez, J.-B., Pitman, D., Lin, L.-L., and Gaestel, M.: Distinct Cellular Functions of MK2. *Mol. Cell. Biol.* 22: 4827-4835, 2002
- Kovarik, P., Stoiber, D., Eyers, P. A., Menghini, R., Neininger, A., Gaestel, M., Cohen, P., and Decker, T.: Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-

- activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *PNAS* 96: 13956-13961, 1999
- Koyama, A. and Miwa, Y.: Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J. Virol.* 71: 2567-2571, 1997
- Kracht, M. and Saklatvala, J.: Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* 20: 91-106, 2002
- Krump, E., Sanghera, J., Pelech, S., Furuya, W., and Grinstein, S.: Chemotactic Peptide N-formyl-Met-Leu-Phe Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and MAPK-activated Protein Kinase-2 in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 272: 937-944, 1997
- Kumar, S., McDonnell, P., Gum, R., Hand, A., Lee, J., and Young, P.: Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 533-8, 1997
- Kummer, J. L., Rao, P. K., and Heidenreich, K. A.: Apoptosis Induced by Withdrawal of Trophic Factors Is Mediated by p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 20490-20494, 1997
- Kurt-Jones, E., Belko, J., Yu, C., Newburger, P., Wang, J., Chan, M., Knipe, D., and Finberg, R.: The role of toll-like receptors in herpes simplex infection in neonates. *J Infect Dis* 191: 746-8, 2005
- Kurt-Jones, E. A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M. M., Knipe, D. M., and Finberg, R. W.: Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *PNAS* 101: 1315-1320, 2004
- Laemmli, U.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5, 1970
- Lai, W. S. and Blackshear, P. J.: Interactions of CCCH Zinc Finger Proteins with mRNA. TRISTETRAPROLIN-MEDIATED AU-RICH ELEMENT-DEPENDENT mRNA DEGRADATION CAN OCCUR IN THE ABSENCE OF A POLY(A) TAIL. *J. Biol. Chem.* 276: 23144-23154, 2001
- Lai, W. S., Carballo, E., Strum, J. R., Kennington, E. A., Phillips, R. S., and Blackshear, P. J.: Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4311-4323, 1999
- Lasa, M., Mahtani, K. R., Finch, A., Brewer, G., Saklatvala, J., and Clark, A. R.: Regulation of Cyclooxygenase 2 mRNA Stability by the Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Signaling Cascade. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4265-4274, 2000
- Lavoie, J., Hickey, E., Weber, L., and Landry, J.: Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* 268: 24210-24214, 1993
- Lawrence, C., Botting, C., Antrobus, R., and Coote, P.: Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 24: 3307-3323, 2004
- Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J.-F., Moller, N. P. H., and Ullrich, A.: ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *PNAS* 93: 4355-4359, 1996
- Lee, J., Laydon, J., McDonnell, P., Gallagher, T., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M., Heys, J., and Landvatter, S.: A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372: 739-46, 1994
- Lee, J., Mira-Arbibe, L., and Ulevitch, R. J.: TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* 68: 909-915, 2000
- Lehner, M. D., Schwoebel, F., Kotlyarov, A., Leist, M., Gaestel, M., and Hartung, T.: Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2-Deficient Mice Show

- Increased Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection. *J. Immunol.* 168: 4667-4673, 2002
- Li, Y., Batra, S., Sassano, A., Majchrzak, B., Levy, D. E., Gaestel, M., Fish, E. N., Davis, R. J., and Plataniias, L. C.: Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MKK) 3 and MKK6 by Type I Interferons. *J. Biol. Chem.* 280: 10001-10010, 2005
- Li, Y., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D. K., Levy, D. E., Gaestel, M., Nebreda, A. R., Fish, E. N., and Plataniias, L. C.: Role of p38{alpha} Map Kinase in Type I Interferon Signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 970-979, 2004
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R., and Han, J.: The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 334-40, 1996
- Lim, S. P. and Garzino-Demo, A.: The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Up-Regulates the Promoter Activity of the Beta-Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein 1 in the Human Astrocytoma Cell Line U-87 MG: Role of SP-1, AP-1, and NF-kappa B Consensus Sites. *J. Virol.* 74: 1632-1640, 2000
- Lin, J. and Simmons, D.: Transformation by simian virus 40 does not involve the mutational activation of p53 to an oncogenic form. *Virology* 176: 302-5, 1990
- Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P. M., and Hiscott, J.: Essential Role of Interferon Regulatory Factor 3 in Direct Activation of RANTES Chemokine Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19: 959-966, 1999
- Lisnock, J., Tebben, A., Frantz, B., O'Neill, E., Croft, G., O'Keefe, S., Li, B., Hacker, C., de Laszlo, S., Smith, A., Libby, B., Liverton, N., Hermes, J., and LoGrasso, P.: Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity. *Biochemistry* 37: 16573-81, 1998
- Mabit, H., Nakano, M. Y., Prank, U., Saam, B., Dohner, K., Sodeik, B., and Greber, U. F.: Intact Microtubules Support Adenovirus and Herpes Simplex Virus Infections. *J. Virol.* 76: 9962-9971, 2002
- Mahtani, K. R., Brook, M., Dean, J. L. E., Sully, G., Saklatvala, J., and Clark, A. R.: Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Controls the Expression and Posttranslational Modification of Tristetraprolin, a Regulator of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Stability. *Mol. Cell. Biol.* 21: 6461-6469, 2001
- Manning, G., Plowman, G., Hunter, T., and Sudarsanam, S.: Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 27: 514-20, 2002a
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S.: The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298: 1912-1934, 2002b
- Margolis, D., Rabson, A., Straus, S., and Ostrove, J.: Transactivation of the HIV-1 LTR by HSV-1 immediate-early genes. *Virology* 186: 788-91, 1992
- Marozin, S., Prank, U., and Sodeik, B.: Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *J. Gen. Virol.* 85: 775-786, 2004
- May, T., Hauser, H., and Wirth, D.: Transcriptional control of SV40 T-antigen expression allows a complete reversion of immortalization. *Nucleic Acids Res.* 32: 5529-5538, 2004
- McLaughlin, M. M., Kumar, S., McDonnell, P. C., Van Horn, S., Lee, J. C., Livi, G. P., and Young, P. R.: Identification of Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase-activated Protein Kinase-3, a Novel Substrate of CSBP p38 MAP Kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 8488-8492, 1996
- Melchjorsen, J., Sorensen, L. N., and Paludan, S. R.: Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. *J. Leukoc. Biol.* 74: 331-343, 2003
- Mettenleiter, T.: Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res* 92: 197-206, 2003
- Mettenleiter, T. C.: Herpesvirus Assembly and Egress. *J. Virol.* 76: 1537-1547, 2002

- Ming, X.-F., Stoecklin, G., Lu, M., Looser, R., and Moroni, C.: Parallel and Independent Regulation of Interleukin-3 mRNA Turnover by Phosphatidylinositol 3-Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5778-5789, 2001
- Miralles, F., Parra, M., Caelles, C., Nagamine, Y., Felez, J., and Munoz-Canoves, P.: UV Irradiation Induces the Murine Urokinase-Type Plasminogen Activator Gene via the c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathway: Requirement of an AP1 Enhancer Element. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4537-4547, 1998a
- Miralles, F., Ron, D., Baiget, M., Felez, J., and Munoz-Canoves, P.: Differential Regulation of Urokinase-type Plasminogen Activator Expression by Basic Fibroblast Growth Factor and Serum in Myogenesis. REQUIREMENT OF A COMMON MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE PATHWAY. *J. Biol. Chem.* 273: 2052-2058, 1998b
- Miskin, R. and Ben-Ishai, R.: Induction of Plasminogen Activator by UV Light in Normal and Xeroderma Pigmentosum Fibroblasts. *PNAS* 78: 6236-6240, 1981
- Mogensen, T. and Paludan, S.: Virus-cell interactions: impact on cytokine production, immune evasion and tumor growth. *Eur Cytokine Netw* 12: 382-90, 2001a
- Mogensen, T. H. and Paludan, S. R.: Molecular Pathways in Virus-Induced Cytokine Production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 131-150, 2001b
- Mohler, K., Sleath, P., Fitzner, J., Cerretti, D., Alderson, M., Kerwar, S., Torrance, D., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., and Weerawarna, K.: Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* 370: 218-20, 1994
- Montero, L. and Nagamine, Y.: Regulation by p38 Mitogen-activated Protein Kinase of Adenylate- and Uridylate-Rich Element-mediated Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) Messenger RNA Stability and uPA-dependent in Vitro Cell Invasion. *Cancer Res.* 59: 5286-5293, 1999
- Montgomery, R., Warner, M., Lum, B., and Spear, P.: Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87: 427-36, 1996
- Muda, M., Boschert, U., Smith, A., Antonsson, B., Gillieron, C., Chabert, C., Camps, M., Martinou, I., Ashworth, A., and Arkinstall, S.: Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase, MKP-4. *J. Biol. Chem.* 272: 5141-5151, 1997
- Muda, M., Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., Rodrigues, N., Davies, K., Ashworth, A., and Arkinstall, S.: The Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-3 N-terminal Noncatalytic Region Is Responsible for Tight Substrate Binding and Enzymatic Specificity. *J. Biol. Chem.* 273: 9323-9329, 1998
- Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A., and Arkinstall, S.: The Dual Specificity Phosphatases M3/6 and MKP-3 Are Highly Selective for Inactivation of Distinct Mitogen-activated Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 27205-27208, 1996
- Mudgett, J. S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N. A., Yang, L., Gopal, S., and Shen, M. M.: Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *PNAS* 97: 10454-10459, 2000
- Nanbu, R., Montero, L., D'Orazio, D., and Nagamine, Y.: Enhanced stability of urokinase-type plasminogen activator mRNA in metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells and LLC-PK1 cells down-regulated for protein kinase C--correlation with cytoplasmic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C. *Eur. J. Biochem.* 247: 169-174, 1997
- Natale, D., Paliga, A., Beier, F., D'Souza, S., and Watson, A.: p38 MAPK signaling during murine preimplantation development. *Dev Biol* 268: 76-88, 2004
- Nebreda, A. and Porras, A.: p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25: 257-60, 2000
- Neininger, A., Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Winzen, R., Eckert, R., Volk, H.-D., Holtmann, H., Kollias, G., and Gaestel, M.: MK2 Targets AU-rich Elements and

- Regulates Biosynthesis of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 Independently at Different Post-transcriptional Levels. *J. Biol. Chem.* 277: 3065-3068, 2002
- Neininger, A., Thielemann, H., and Gaestel, M.: FRET-based detection of different conformations of MK2. *EMBO Rep.* 2: 703-708, 2001
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato, Y., Parry, G. C. N., and Han, J.: PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J.* 17: 3372-3384, 1998
- Ni, H., Wang, X., Diener, K., and Yao, Z.: MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 492-6, 1998
- Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U., and Helenius, A.: Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4922-4931, 2000
- Olson, D., Pollanen, J., Hoyer-Hansen, G., Ronne, E., Sakaguchi, K., Wun, T., Appella, E., Dano, K., and Blasi, F.: Internalization of the urokinase-plasminogen activator inhibitor type-1 complex is mediated by the urokinase receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 9129-9133, 1992
- Ono, K. and Han, J.: The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12: 1-13, 2000
- Ossowski, L.: In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J. Cell Biol.* 107: 2437-2445, 1988
- Ossowski, L. and Aguirre-Ghiso, J.: Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 12: 613-20, 2000
- Ossowski, L., Biegel, D., and Reich, E.: Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell* 16: 929-40, 1979
- Ossowski, L. and Reich, E.: Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell* 35: 611-9, 1983
- Paludan, S. R. and Mogensen, S. C.: Virus-Cell Interactions Regulating Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Macrophages Infected with Herpes Simplex Virus. *J. Virol.* 75: 10170-10178, 2001
- Patel, A., Hanson, J., McLean, T., Olgiate, J., Hilton, M., Miller, W., and Bachenheimer, S.: Herpes simplex type 1 induction of persistent NF-kappa B nuclear translocation increases the efficiency of virus replication. *Virology* 247: 212-22, 1998
- Pepper, M., Vassalli, J., Montesano, R., and Orci, L.: Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 105: 2535-2541, 1987
- Pepper, M. S.: Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator-Plasmin Systems in Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1104-1117, 2001
- Pietersma, A., Tilly, B., Gaestel, M., de Jong, N., Lee, J., Koster, J., and Sluiter, W.: p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 44-8, 1997
- Platanias, L.: The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol Ther* 98: 129-42, 2003
- Plow, E., Freaney, D., Plescia, J., and Miles, L.: The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J. Cell Biol.* 103: 2411-2420, 1986
- Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A. M., Ambrosino, C., Benito, M., and Nebreda, A. R.: p38{alpha} Mitogen-activated Protein Kinase Sensitizes Cells to Apoptosis Induced by Different Stimuli. *Mol. Biol. Cell* 15: 922-933, 2004
- Qi, M. and Elion, E. A.: MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* 118: 3569-3572, 2005

- Quinlan, M.: Enhanced proliferation, growth factor induction and immortalization by adenovirus E1A 12S in the absence of E1B. *Oncogene* 9: 2639-47, 1994
- Rio, D., Robbins, A., Myers, R., and Tjian, R.: Regulation of Simian Virus 40 Early Transcription in vitro by a Purified Tumor Antigen. *PNAS* 77: 5706-5710, 1980
- Rittling, S. and Denhardt, D.: p53 mutations in spontaneously immortalized 3T12 but not 3T3 mouse embryo cells. *Oncogene* 7: 935-42, 1992
- Roizman, B. and Knipe, D. M.: Herpes simplex viruses and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, and e. al. (eds.): *Fundamental Virology, 4th edition*, pp. 2399-2459, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2001
- Rong, B., Libermann, T., Kogawa, K., Ghosh, S., Cao, L., Pavan-Langston, D., and Dunkel, E.: HSV-1-inducible proteins bind to NF-kappa B-like sites in the HSV-1 genome. *Virology* 189: 750-6, 1992
- Rossol-Voth, R., Rossol, S., Schutt, K., Corridori, S., de Cian, W., and Falke, D.: In vivo protective effect of tumour necrosis factor alpha against experimental infection with herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 72: 143-147, 1991
- Roulston, A., Marcellus, R., and Branton, P.: Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 53: 577-628, 1999
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.: A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78: 1027-37, 1994
- Ruley, H.: Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304: 602-6, 1983
- Sainz, B., Jr and Halford, W. P.: Alpha/Beta Interferon and Gamma Interferon Synergize To Inhibit the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* 76: 11541-11550, 2002
- Santoro, M. G., Rossi, A., and Amici, C.: NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: NF- κ B and virus infection: who controls whom. *EMBO J.* 22: 2552-2560, 2003
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T.: Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13: 539-48, 2000
- SAURIN, A. T., MARTIN, J. L., HEADS, R. J., FOLEY, C., MOCKRIDGE, J. W., WRIGHT, M. J., WANG, Y., and MARBER, M. S.: The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J* 14: 2237-2246, 2000
- Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., and Weber, M. J.: MP1: A MEK Binding Partner That Enhances Enzymatic Activation of the MAP Kinase Cascade. *Science* 281: 1668-1671, 1998
- Schmid, I., Krall, W., Uittenbogaart, C., Braun, J., and Giorgi, J.: Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13: 204-8, 1992
- Schmitz, M., Mattioli, I., Buss, H., and Kracht, M.: NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 5: 1348-58, 2004
- Schumacher, S., Laass, K., Kant, S., Shi, Y., Visel, A., Gruber, A. D., Kotlyarov, A., and Gaestel, M.: Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J.* 23: 4770-4779, 2004
- Shalom-Barak, T., Quach, J., and Lotz, M.: Interleukin-17-induced Gene Expression in Articular Chondrocytes Is Associated with Activation of Mitogen-activated Protein Kinases and NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 273: 27467-27473, 1998

- Shapiro, L., Puren, A. J., Barton, H. A., Novick, D., Peskind, R. L., Shenkar, R., Gu, Y., Su, M. S.-S., and Dinarello, C. A.: Interleukin 18 stimulates HIV type 1 in monocytic cells. *PNAS* 95: 12550-12555, 1998
- Shaulian, E. and Karin, M.: AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131-6, 2002
- Shay, J. and Wright, W.: Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 184: 109-18, 1989
- Shetty, S. and Idell, S.: Post-transcriptional Regulation of Urokinase mRNA. IDENTIFICATION OF A NOVEL UROKINASE mRNA-BINDING PROTEIN IN HUMAN LUNG EPITHELIAL CELLS IN VITRO. *J. Biol. Chem.* 275: 13771-13779, 2000
- Shi, Y. and Gaestel, M.: In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem* 383: 1519-36, 2002
- Shi, Y., Kotlyarov, A., Laass, K., Gruber, A. D., Butt, E., Marcus, K., Meyer, H. E., Friedrich, A., Volk, H.-D., and Gaestel, M.: Elimination of Protein Kinase MK5/PRAK Activity by Targeted Homologous Recombination. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7732-7741, 2003
- Shimba, S., Hayashi, M., Sone, H., Yonemoto, J., and Tezuka, M.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces binding of a 50 kDa protein on the 3' untranslated region of urokinase-type plasminogen activator mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 441-8, 2000
- Shiozaki, K. and Russell, P.: Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378: 739-43, 1995
- Sithanandam, G., Latif, F., Duh, F., Bernal, R., Smola, U., Li, H., Kuzmin, I., Wixler, V., Geil, L., and Shrestha, S.: 3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1996 Apr;16(4):1880]. *Mol. Cell. Biol.* 16: 868-876, 1996
- Slack, D. N., Seternes, O.-M., Gabrielsen, M., and Keyse, S. M.: Distinct Binding Determinants for ERK2/p38alpha and JNK MAP Kinases Mediate Catalytic Activation and Substrate Selectivity of MAP Kinase Phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 276: 16491-16500, 2001
- Smiley, J., Elgadi, M., and Saffran, H.: Herpes simplex virus vhs protein. *Methods Enzymol* 342: 440-51, 2001
- Smiley, J. R.: Herpes Simplex Virus Virion Host Shutoff Protein: Immune Evasion Mediated by a Viral RNase? *J. Virol.* 78: 1063-1068, 2004
- Sodeik, B., Ebersold, M. W., and Helenius, A.: Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *J. Cell Biol.* 136: 1007-1021, 1997
- Spear, P.: Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6: 401-10, 2004
- Srinivasan, A., Peden, K., and Pipas, J.: The large tumor antigen of simian virus 40 encodes at least two distinct transforming functions. *J. Virol.* 63: 5459-63, 1989
- Steinert, S., Shay, J., and Wright, W.: Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1095-8, 2000
- Stewart, A., Dowd, S., Keyse, S., and McDonald, N.: Crystal structure of the MAPK phosphatase Pyst1 catalytic domain and implications for regulated activation. *Nat. Struct.* 6: 174-181, 1999
- Stokoe, D., Campbell, D., Nakielnny, S., Hidaka, H., Leever, S., Marshall, C., and Cohen, P.: MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* 11: 3985-3994, 1992a

- Stokoe, D., Caudwell, B., Cohen, P., and Cohen, P.: The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J* 296 (Pt 3): 843-9, 1993
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D., Cohen, P., and Gaestel, M.: Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* 313: 307-13, 1992b
- Sun, Q., Tang, S., Pater, M., and Pater, A.: Different HPV16 E6/E7 oncogene expression patterns in epithelia reconstructed from HPV16-immortalized human endocervical cells and genital keratinocytes. *Oncogene* 15: 2399-408, 1997
- Suzutani, T., Nagamine, M., Shibaki, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Daikoku, T., Nishiyama, Y., and Azuma, M.: The role of the UL41 gene of herpes simplex virus type 1 in evasion of non-specific host defence mechanisms during primary infection. *J. Gen. Virol.* 81: 1763-1771, 2000
- Taddeo, B., Esclatine, A., and Roizman, B.: The patterns of accumulation of cellular RNAs in cells infected with a wild-type and a mutant herpes simplex virus 1 lacking the virion host shutoff gene. *PNAS* 99: 17031-17036, 2002
- Taddeo, B., Esclatine, A., and Roizman, B.: Post-transcriptional processing of cellular RNAs in herpes simplex virus-infected cells. *Biochem Soc Trans* 32: 697-701, 2004
- Tak, P. P. and Firestein, G. S.: NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107: 7-11, 2001
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S.: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-76, 2003
- Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A., Johnson, R., and Karin, M.: Requirement for p38 α in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 102: 221-31, 2000
- Tamura, S., Hanada, M., Ohnishi, M., Katsura, K., Sasaki, M., and Kobayashi, T.: Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* 269: 1060-1066, 2002
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N.: IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19: 623-55, 2001
- Tanoue, T., Moriguchi, T., and Nishida, E.: Molecular Cloning and Characterization of a Novel Dual Specificity Phosphatase, MKP-5. *J. Biol. Chem.* 274: 19949-19956, 1999
- Taylor, G., Carballo, E., Lee, D., Lai, W., Thompson, M., Patel, D., Schenkman, D., Gilkeson, G., Broxmeyer, H., Haynes, B., and Blackshear, P.: A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 4: 445-54, 1996
- Tchen, C. R., Brook, M., Saklatvala, J., and Clark, A. R.: The Stability of Tristetraprolin mRNA Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase p38 and by Tristetraprolin Itself. *J. Biol. Chem.* 279: 32393-32400, 2004
- Teodoro, J. and Branton, P.: Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* 71: 1739-1746, 1997
- Theodosiou, A., Smith, A., Gillieron, C., Arkinstall, S., and Ashworth, A.: MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene* 18: 6981-8, 1999
- Todarò, G. J. and Green, H.: QUANTITATIVE STUDIES OF THE GROWTH OF MOUSE EMBRYO CELLS IN CULTURE AND THEIR DEVELOPMENT INTO ESTABLISHED LINES. *J. Cell Biol.* 17: 299-313, 1963
- Tong, L., Pav, S., White, D., Rogers, S., Crane, K., Cywin, C., Brown, M., and Pargellis, C.: A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol* 4: 311-6, 1997
- Topp, K., Bisla, K., Saks, N., and Lavail, J.: Centripetal transport of herpes simplex virus in human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Neuroscience* 71: 1133-44, 1996

- Torcia, M., De Chiara, G., Nencioni, L., Ammendola, S., Labardi, D., Lucibello, M., Rosini, P., Marlier, L. N. J. L., Bonini, P., Sbarba, P. D., Palamara, A. T., Zambrano, N., Russo, T., Garaci, E., and Cozzolino, F.: Nerve Growth Factor Inhibits Apoptosis in Memory B Lymphocytes via Inactivation of p38 MAPK, Prevention of Bcl-2 Phosphorylation, and Cytochrome c Release. *J. Biol. Chem.* 276: 39027-39036, 2001
- Tran, H., Maurer, F., and Nagamine, Y.: Stabilization of Urokinase and Urokinase Receptor mRNAs by HuR Is Linked to Its Cytoplasmic Accumulation Induced by Activated Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7177-7188, 2003
- Trgovcich, J., Johnson, D., and Roizman, B.: Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class II Proteins Are Regulated by the Products of the $\{\gamma\}$ 134.5 and UL41 Genes of Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 76: 6974-6986, 2002
- Trott, D. A., Cuthbert, A. P., Overell, R. W., Russo, I., and Newbold, R. F.: Mechanisms involved in the immortalization of mammalian cells by ionizing radiation and chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16: 193-204, 1995
- Valladares, A., Alvarez, A. M., Ventura, J. J., Roncero, C., Benito, M., and Porras, A.: p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates Tumor Necrosis Factor- $\{\alpha\}$ -Induced Apoptosis in Rat Fetal Brown Adipocytes. *Endocrinology* 141: 4383-4395, 2000
- Warner, M., Geraghty, R., Martinez, W., Montgomery, R., Whitbeck, J., Xu, R., Eisenberg, R., Cohen, G., and Spear, P.: A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246: 179-89, 1998
- Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D. I., Bodary, S. C., Rosenberg, S., Doyle, M. V., and Chapman, H. A.: Regulation of Integrin Function by the Urokinase Receptor. *Science* 273: 1551-1555, 1996
- Whitbeck, J., Peng, C., Lou, H., Xu, R., Willis, S., Ponce de Leon, M., Peng, T., Nicola, A., Montgomery, R., Warner, M., Soulika, A., Spruce, L., Moore, W., Lambris, J., Spear, P., Cohen, G., and Eisenberg, R.: Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J. Virol.* 71: 6083-6093, 1997
- Whitmarsh, A. and Davis, R.: Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23: 481-5, 1998
- Witowsky, J., Abell, A., Johnson, N. L., Johnson, G. L., and Cuevas, B. D.: MEKK1 Is Required for Inducible Urokinase-type Plasminogen Activator Expression. *J. Biol. Chem.* 278: 5941-5946, 2003
- Yu, H., Stasinopoulos, S., Leedman, P., and Medcalf, R. L.: Inherent Instability of Plasminogen Activator Inhibitor Type 2 mRNA Is Regulated by Tristetraprolin. *J. Biol. Chem.* 278: 13912-13918, 2003
- Yu, J., Bian, D., Mahanivong, C., Cheng, R. K., Zhou, W., and Huang, S.: p38 Mitogen-activated Protein Kinase Regulation of Endothelial Cell Migration Depends on Urokinase Plasminogen Activator Expression. *J. Biol. Chem.* 279: 50446-50454, 2004
- Yuan, H., Veldman, T., Rundell, K., and Schlegel, R.: Simian Virus 40 Small Tumor Antigen Activates AKT and Telomerase and Induces Anchorage-Independent Growth of Human Epithelial Cells. *J. Virol.* 76: 10685-10691, 2002
- Zachos, G., Clements, B., and Conner, J.: Herpes Simplex Virus Type 1 Infection Stimulates p38/c-Jun N-terminal Mitogen-activated Protein Kinase Pathways and Activates Transcription Factor AP-1. *J. Biol. Chem.* 274: 5097-5103, 1999
- Zachos, G., Koffa, M., Preston, C. M., Clements, J. B., and Conner, J.: Herpes Simplex Virus Type 1 Blocks the Apoptotic Host Cell Defense Mechanisms That Target Bcl-2 and Manipulates Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase To Improve Viral Replication. *J. Virol.* 75: 2710-2728, 2001

- Zarubin, T. and Han, J.: Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15: 11-8, 2005
- Zhang, Y., Zhou, L., and Miller, C. A.: A splicing variant of a death domain protein that is regulated by a mitogen-activated kinase is a substrate for c-Jun N-terminal kinase in the human central nervous system. *PNAS* 95: 2586-2591, 1998
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J., and Han, J.: Regulation of the MEF2 Family of Transcription Factors by p38. *Mol. Cell. Biol.* 19: 21-30, 1999
- Zhu, W., Han, J., and Nicosia, R.: Requisite role of p38 MAPK in mural cell recruitment during angiogenesis in the rat aorta model. *J Vasc Res* 40: 140-8, 2003
- Zhuang, S., Demirs, J. T., and Kochevar, I. E.: p38 Mitogen-activated Protein Kinase Mediates Bid Cleavage, Mitochondrial Dysfunction, and Caspase-3 Activation during Apoptosis Induced by Singlet Oxygen but Not by Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* 275: 25939-25948, 2000
- Zu, Y., Wu, F., Gilchrist, A., Ai, Y., Labadia, M., and Huang, C.: The primary structure of a human MAP kinase activated protein kinase 2. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1118-24, 1994

11 Lebenslauf

Name: Katarzyna Ewa Schewe
Geburtsdatum: 10.06.1975
Geburtsort: Czestochowa (Polen)
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Seit November 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität des Saarlandes, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Lehrstuhl von Prof. R. W. Hartmann

Juli 2002 - August 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudentin an der Medizinischen Hochschule Hannover, Zentrum Biochemie, Institut Physiologische Chemie, Lehrstuhl von Prof. M. Gaestel.
Thema der Dissertation:
„Untersuchung der Rolle der MK2-Funktion bei der Migration von Endothelzellen, der Regulation von Urokinase Plasminogen Aktivator und der Herpes Simplex Virus 1 Infektion“

April 1998 - März 2002 Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg (Abschluss mit Auszeichnung).
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Biochemie von Prof. I. Witte zum Thema: „Mechanismen und Folgen der synergistischen Wirkung von oxidativem Stress und Umweltchemikalien am Beispiel von Wasserstoffperoxid und 4-Chloranilin auf menschliche Fibroblasten“

Oktober 1996 - März 1998 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians Universität München

Oktober 1995 - September 1996 Studienkolleg des Freistaats Bayern an der Ludwig-Maximilians Universität München

September 1994 - August 1995 Au-pair-Aufenthalt in München

September 1990 - Juni 1994 Besuch des Maria-Skłodowska-Curie-Lyzeums in Piotrków Trybunalski (Abitur)

September 1982 - Juni 1990 Besuch einer Grundschule in Piotrków Trybunalski

12 Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Hilfe und die Unterstützung vieler Mitarbeiter des Institutes für Physiologische Chemie und des Institutes für Virologie, und mein Dank gehört den vielen Menschen, die mich auf dem Weg begleitet haben.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei

Professor Matthias Gaestel für das interessante Thema, seine Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit und die vielen Hinweise und Korrekturen bei der Entstehung der Niederschrift der Arbeit.

Professor Walter Müller für sein offenes Ohr und seine tatkräftige Unterstützung bei allen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Problemen, die mich durch alle Tiefpunkte und Probleme hindurch auf Kurs gehalten haben.

Dr. Alexey Kotlyarov für die Forschungsfreiräume und sein Vertrauen ebenso wie für die intensive Betreuung.

Dr. Beate Sodeik für Ihre Unterstützung bei allen virologischen Arbeiten, die vielen fruchtbaren Diskussionen, ihre herzliche Art und für die Möglichkeit, in ihrem Labor zu arbeiten.

Kathrin Laaß für das geduldige Aufspüren vieler Rechtschreibfehler bei der Durchsicht des Manuskripts - und dafür, dass sie die Seele des Labors ist. Wenn es Kathrin nicht gäbe, müsste sie erfunden werden!

Katinka Döhner für die Hilfe bei der Viruspräparation und für die vielen anderen Unterstützungen meiner virologischen Arbeiten, ihre Kritik und Anregungen beim Entstehen des Manuskripts.

allen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Professor Gaestel, für eine wunderbare Atmosphäre, Eure Hilfsbereitschaft und Freundschaft. Insbesondere möchte ich Natascha Ronkina, Dorothea Krone, Stefani Schumacher, Corinna Meier, Edward Hitti, Maria Schubert, Jessica Schwermann, Tobias Thomas, Shashi Kant, Anastassiaa Vertii, Tatiana Iakovleva, Carsten Frank, Christopher Tiedje, Anette Becker, Dirk Hoffmann und Ulrike Wedermeyer hervorheben.

Ute Prank, die mich wunderbar in die Welt der virologischen Arbeiten eingeführt hat und mir immer hilfsbereit mit Rat und Tat beiseite stand. Gleichzeitig möchte ich mich bei allen Virologie-Mitarbeitern, insbesondere Andre Wolfstein, Claus Henning-Nagel, Kristina Theusner und Kathrin Rode, für die nette und freundliche Atmosphäre und unermüdliche Unterstützung danken.

Karsten Heidrich, der mir bei allen kleinen und großen Computerproblemen unermüdbar geholfen hat und immer ein gutes Wort für mich hatte.

Annalisa Mancini, Sabine Klebba-Färber, Regina Willms, Tino Karnath, Steffan Sikorra, Gustav Meyer, Rainer Niedenthal und allen anderen Mitarbeiter des Instituts Physiologische Chemie für die ständige Hilfsbereitschaft, die netten Stunden in der Kaffeeküche und die gute Laune.

Brunhilde Engel und Monika Sell, die mir immer wunderbar bei der Umschiffung der vielen kleinen und großen bürokratischen und organisatorischen Klippen geholfen haben und immer ein nettes Wort für mich hatten.

Maria Richter für ihre mütterliche Fürsorge und dafür, dass sie den Laboralltag so wunderbar erleichtert.