

**Kontrolle der Degradation von *messenger* RNAs
in HeLa-Zellen
Charakterisierung UV-induzierter
Stabilisierungsmechanismen**

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe Arno Wilhelm
Geboren am 21.11.1973 in Hannover

2001

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. H. Holtmann am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leitung: Prof. Dr. med. K. Resch) durchgeführt.

Referat : Prof. Dr. H. Holtmann

Korreferat : Prof. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 16.01.2001

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

„The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism.“
THE EMBO JOURNAL 18, 4969-4980 (1999)

„The MAPKKK TAK1 plays a central role in coupling the IL-1 receptor to both, transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation“
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY *in press*, publiziert am 24. Oktober (2000)

Zusammenfassung

Die Proliferation, Differenzierung und biologische Aktivität von Immunzellen, sowie die Kommunikation zwischen ihnen und mit Nicht-Immunzellen wird in Entzündungsprozessen von spezifischen Proteinmediatoren beeinflusst, den Zytokinen. Ihre Genregulation erfolgt unter anderem post-transkriptionell über die Degradationsrate der mRNA. Diese wird durch die Interaktion von *cis*-Elementen des Transkripts, im Falle von Zytokin-mRNAs die AU-reichen Elemente, mit *trans*-regulierenden Proteinen bestimmt. Die post-transkriptionelle Regulation erlaubt eine schnelle Induktion und gleichzeitig eine streng limitierte Synthese.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von inflammatorisch wirkendem Ultravioletten Licht (UV) im Vergleich zum pro-inflammatorischen Zytokin Interleukin-1 (IL-1) auf die Stabilität von Zytokin-mRNAs untersucht. Dazu wurden tetrazyklinregulierbare Reporterkonstrukte in HeLa-Zellen transfiziert. Diese Konstrukte enthalten die β -Globin DNA, in der die AU-reichen *cis*-Elemente des IL-8- bzw des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) -Transkripts als Insertion vorliegen. Die Kinetik der RNA-Degradation wurde nach Transkriptionshemmung mit Tetrazyklin mittels sequentieller Northern Blot-Analysen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß UV eine stabilisierende Wirkung auf die basal instabilen Hybrid-RNAs besitzt. Eine dominant-negative Form der p38 MAP Kinase, die die IL-1 induzierte Transkript-Stabilisierung hemmt, konnte den UV-Effekt nicht inhibieren. UV induziert zudem eine Stabilisierung der nicht AU-reichen Transkripte von Luziferase, vom Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) und vom *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1* (TIMP-1). Diese Transkripte konnten durch konstitutiv aktive Formen der MAP Kinase Kinase MKK6, einem selektiven Aktivator des p38 Signalwegs, und der beiden übergeordneten MAP Kinase Kinase Kinasen MEKK-1 und TAK1, die neben p38 noch die MAP Kinase Kinase JNK und ERK1/2, sowie NF- κ B aktivieren können nicht stabilisiert werden.

Da UV bei HeLa-Zellen auch Caspase-vermittelte Apoptose induzieren kann, wurden Caspase-1- und Caspase-3-ähnliche Proteasen mit einem spezifischen Inhibitor, ZVAD-fmk, gehemmt. Dieser zeigte allerdings keine Wirkung auf die UV-induzierte Stabilisierung der β -Globin-IL-8 Hybrid-RNA.

In Gel-Retardationsversuchen konnte nach UV-Bestrahlung eine erhöhte Bindung des Proteins HuR an die 3' UTR der Transkripte von IL-8- und GM-CSF beobachtet werden. Die Aktivierung der MAP Kinase Kinase p38, JNK, ERK1/2, sowie NF- κ B hatten keinen nachweisbaren Einfluß auf diese Bindung. Es konnte keine Interaktion von HuR mit den Transkripten von GFP und TIMP-1 nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß die beiden Stimuli UV und IL-1 die mRNA-Degradation durch Aktivierung verschiedener Mechanismen und mit unterschiedlicher Transkriptspezifität beeinflussen. Die genaue Wirkungsweise von UV bedarf weiterer Analysen.

mRNA-Stabilität - AU-reiche Elemente - Ultraviolettes Licht

Abstract

The proliferation, differentiation and the biological activity of immune cells, as well as the communication between them and with non-immune cells is influenced by specific protein mediators, the cytokines. Their genes are regulated in part post-transcriptionally via the degradation rate of the mRNA. The latter is determined by the interaction of *cis*-elements of the transcript, the AU-rich elements in case of cytokine mRNAs, with *trans*-regulating proteins. The post-transcriptional regulation allows rapid induction and, at the same time, strictly limited synthesis.

In this work, the influence of inflammation-inducing ultraviolet light (UV) on the stability of cytokine mRNAs was investigated in comparison to the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1). For this purpose, tetracycline-regulatable reporter constructs were transfected into HeLa cells. These constructs contain the β -globin DNA with an insertion of AU-rich *cis* elements of the transcripts of IL-8 or of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). The kinetics of RNA degradation was determined following transcription inhibition with tetracycline using sequential Northern Blot analyses. It could be demonstrated that UV had a stabilising effect on the basally unstable hybrid-RNAs. A dominant-negative form of the p38 MAP kinase, which inhibits the IL-1-induced transcript stabilization, could not inhibit the UV effect. UV induced, in addition, a stabilization of the non-AU-rich transcripts of luciferase, of the green fluorescent protein (GFP), and of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1). These transcripts could not be stabilized by constitutively active forms of the MAP kinase kinase MKK6, a selective activator of the p38 signaling pathway and the two upstream MAP kinase kinase kinases MEKK-1 and TAK1 which, in addition to p38, could also activate the MAP kinase pathways JNK and ERK1/2, as well as NF κ B.

As, in the case of HeLa cells, UV can also induce caspase-mediated apoptosis, caspase-1 and caspase-3-like proteinases were inhibited with a specific inhibitor, ZVAD-fmk. This, however, showed no effect on the UV-induced stabilization of the β -globin-IL-8 hybrid RNA.

In gel-retardation experiments, following UV irradiation an increased binding of the protein HuR to the 3' UTR of IL-8 and GM-CSF could be observed. The activation of the MAP kinase pathways p38, JNK and ERK1/2, as well as NF κ B, had no demonstrable effect on this binding. For the transcripts of GFP and TIMP-1 no interaction with HuR could be shown.

These results suggest that both stimuli -UV and IL-1- influence mRNA degradation, by activation of different mechanisms and with different transcript specificity. The precise action of UV will require further analysis.

mRNA-stability - AU-rich elements - ultraviolet light

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **X**

1. Einleitung **1**

1.1	Zytokine.....	1
1.2	Post-transkriptionelle Genregulation	3
1.3	MAP Kinasewege.....	6
1.4	Ultraviolettes Licht (UV).....	10
1.5	Ziel der Arbeit.....	11

2. Material und Methoden **12**

2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterial	13
2.1.3	Enzyme.....	14
2.1.4	Antikörper	14
2.1.5	Chemikalien und Lösungen	15
2.1.6	Kits	15
2.1.7	Plasmide, Bakterienstämme und eukaryotische Zellen	15
2.1.8	Puffer	16
2.1.9	Medien.....	20
2.2	Zellkultur.....	21
2.2.1	Zellhaltung und Zellpassage.....	21
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	21
2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	22
2.2.4	Transfektion von Zellen mit Calcium-Chlorid	22
2.2.5	Apoptose-Färbung.....	23

2.3	Präparation von Zellen	24
2.3.1	Präparation von zytosolischen Extrakten.....	24
2.3.2	Präparation von Lysaten für Luziferase-Aktivitätsbestimmungen	24
2.4	Präparation, Synthese und Analyse von Nukleinsäuren	25
2.4.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	25
2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA.....	25
2.4.3	Konzentrationsbestimmungen	25
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.4.5	RNA-Markierung mit α - ³² P-UTP durch <i>in vitro</i> Transkription.....	27
2.4.6	RNA-Markierung mit DIG-11-UTP durch <i>in vitro</i> Transkription	28
2.5	Gel-Retardationsanalyse.....	28
2.6	Northern Blot.....	30
2.6.1	Northern Blot	30
2.6.2	Hybridisierung, Stringenzwäsche und Detektion	31
2.7	Analyse von Proteinen	32
2.7.1	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	32
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.7.3	Western Blot und Immunochemische Detektion	33
2.7.4	Bestimmung der Luziferase-Aktivität	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Stabilität der β -Globin-IL-8 ₉₇₂₋₁₃₁₀ - und β -Globin-GM-CSF _{ARE} -RNAs in Abhängigkeit von Ultraviolettem Licht	38
3.1.1	Dosis-Wirkungseffekt von UV-Licht	38
3.1.2	Vergleich der Stabilisierung durch UV und MAP Kinase Kinase Kinasen.....	39
3.1.3	Beteiligung des p38 MAP Kinasewegs an der UV-induzierten Stabilisierung	42
3.2	Transkriptspezifität der von UV und vom p38 MAP Kinaseweg induzierten Stabilität.....	43
3.2.1	Stabilität der mRNA von Luziferase.....	43
3.2.2	Stabilität der mRNA vom <i>green fluorescent protein</i> (GFP)	46
3.2.3	Stabilität der mRNA von <i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1</i> (TIMP-1)	49

3.3	Beteiligung von Caspase-Signalwegen an der UV-induzierten Stabilisierung von mRNAs.....	52
3.4	Komplexbildung von AU-reichen Regionen mit zytosolischen Proteinen aus HeLa-Zellen.....	56
3.4.1	Identifizierung komplexbildender Proteine.....	58
3.4.2	Einfluß des p38 MAP Kinasewegs auf die Komplexbildung	60
3.4.3	Einfluß weiterer MAP Kinasewege auf die Komplexbildung.....	64
3.5	Komplexbildung von nicht-AU-reichen mRNAs mit zytosolischen Proteinen aus HeLa-Zellen.....	69
3.5.1	Komplexbildung von GFP-RNA mit zytosolischen Proteinen.....	69
3.5.2	Komplexbildung von TIMP-1-RNA mit zytosolischen Proteinen ..	70
4.	Diskussion	71

Abkürzungsverzeichnis

Im folgenden Text werden für einige Begriffe englische Fachtermini verwendet (*kursiv*), wenn auch in der deutschen Fachliteratur deren Übersetzung unüblich ist. Für die Abkürzung englischer Ausdrücke ist in dieser Übersicht nur zum Teil die deutsche Bedeutung angegeben.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ARE	AU-reiches Element
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	Zähleinheit pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTP	Cytidintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DISK	diskontinuierlich
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure cDNA : <i>copy DNA</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAV	<i>embryonic lethal, abnormal vision</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
FKS	fötales Kälberserum

g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
G	Guanidin
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IL	Interleukin
IRE	Eisen-responsives Element (<i>iron-responsive element</i>)
JNK	<i>c-jun</i> N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
μ	micro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
min	Minute
MMP	Matrix Metallo-Proteasen
mol	Mol (6,022x10 ²³ Teilchen)
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
n	nanno (10 ⁻⁹)
NP-40	Nonidet [®] P-40
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte, OD _{xxx} : OD gemessen bei XXX nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
	hnRNA : heteronukleäre RNA
	mRNA : <i>messenger</i> RNA

	tRNA	: Transfer RNA
RNase	Ribonuklease	
RT	Raumtemperatur	
s.	siehe	
S.	Seite	
s.a.	siehe auch	
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
sek	Sekunde	
s.o.	siehe oben	
Std	Stunde	
s.u.	siehe unten	
T	Thymidin	
Tab.	Tabelle	
TAB	TAK <i>binding protein</i>	
TAE	Tris-Azetat-EDTA	
TAK	TGF- β aktivierte Kinase	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β (<i>transforming growth factor-β</i>)	
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrix metallo-proteases</i>	
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor	
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan	
U	Uridin	
U	<i>unit</i>	
Ü/N	über Nacht	
UpM	Umdrehungen pro Minute	
UTP	Uridintriphosphat	
UTR	untranslatierte Region	
UV	Ultraviolettes Licht	
vgl.	vergleiche	
Vol.	Volumen	
v/v	Volumenprozent	
w/v	Gewichtsprozent	

1. Einleitung

1.1 Zytokine

Die Reaktion des Organismus auf schädigende Einflüsse von Mikroorganismen, Viren, toxische Substanzen, UV-Licht und unspezifische Gewebeerstörungen werden von kleinen, löslichen Proteinen, den Zytokinen, koordiniert. Diese beeinflussen die Proliferation, die Differenzierung und die biologische Aktivität der Immunzellen und stellen ein Kommunikationsnetzwerk zwischen ihnen und Nicht-Immunzellen dar. Sie sind zudem in Prozesse involviert, in denen die von ihnen gesteuerten Effektorfunktionen selbst zur Schädigung von Gewebe beitragen, z.B. bei akut- oder chronisch-inflammatorischen Erkrankungen.

Zytokine können in verschiedene Klassen eingeteilt werden: 1. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, 2. Interferone, 3. Lymphokine, 4. Monokine, 5. Chemokine und 6. Andere Zytokine. Bei der Klassifizierung gilt allerdings zu beachten, daß einige Zytokine multiple biologische Funktionen besitzen, die für mehr als eine Kategorie charakteristisch sind [Liles und Van Voorhis, 1995].

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Zytokine, die die Bildung und die Differenzierung von Blutzellen regulieren [Clark, 1988; Pimentel, 1990; Liles und Van Voorhis, 1995]. Zu ihnen zählen die Kolonie-stimulierenden Faktoren, Erythropoetin und der Stammzell-Faktor [Liles und Van Voorhis, 1995]. Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) besteht aus 127 Aminosäuren. Er wird unter anderem von T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen, zytotoxischen Lymphozyten und Mastzellen gebildet. Der spezifische Rezeptor ist CD116, βc . GM-CSF ist zum einen in die Myelopoese involviert, spielt aber auch eine Rolle bei der Differenzierung von B-Lymphozyten und bei der Aktivierung von Makrophagen und deren Differenzierung zu Dendritischen Zellen [Janeway *et al.*, 1999]

Chemokine (*chemoattractant cytokine*) sind Proteine mit geringem Molekulargewicht (5-15 kDa), die, je nach Molekül, chemotaktische Wirkungen auf Monozyten, Lymphozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen und Endothelzellen ausüben [Proost *et al.*, 1996]. Zudem wird immer offensichtlicher, daß sie eine Rolle in Prozessen spielen, die mit

der Chemotaxis einhergehen, wie die Expression von Adhäsionsmolekülen, Sekretion von Proteasen, Inhibition von Apoptose, Hämatopoese und Angiogenese. Außerdem spielen sie bei Krankheiten wie Krebs (Regression von Tumoren und Metastasierung), Autoimmunkrankheiten und bakteriellen, wie viralen Infektionen eine maßgebliche Rolle bei der Koordination der beteiligten Zellen. [Proost *et al.*, 1996]. Chemokine sind sekundär pro-inflammatorische Mediatoren, von denen die meisten nicht in unstimulierten Zellen gebildet werden. Ihre Stimulation mit primär pro-inflammatorischen Mediatoren, wie Interleukin-1 (IL-1) oder Tumor Nekrose Faktor (TNF) führen aber zu einer Induktion auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene (s.u.) [Schall, 1991; Baggiolini *et al.*, 1994; Graves und Jiang, 1995].

Chemokine werden in zwei Unterfamilien aufgeteilt. Die α - oder CXC-Chemokine und die β - oder CC-Chemokine. Sie unterscheiden sich in der Anordnung der ersten beiden Cysteine. Diese sind bei den CXC-Chemokinen durch eine Aminosäure getrennt, während sie bei der CC-Unterfamilie direkt nebeneinander liegen. Diese beiden Cysteine sind über Disulfidbrücken mit zwei weiteren konservierten Cysteinen verbunden [Baggiolini *et al.*, 1995; Prieschl *et al.*, 1995; Proost *et al.*, 1996]. Zwei neue Unterfamilien mit bisher je einen Mitglied sind die γ - oder C-Chemokine (Lymphotactin) und CXXXC-Chemokine (Fractalkine) [Kelner *et al.* 1994; Proost *et al.*, 1996; Janeway *et al.*, 1999].

Im Gegensatz zu klassischen chemotaktischen Faktoren, wie Komplementfaktor 5a (C5a) Leukotrien B₄ (LTB₄), *platelet-activating factor* (PAF) und fMLP (*formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin*), die nicht spezifisch auf bestimmte Untergruppen der Leukozyten wirken, sind die Chemokin-Unterfamilien in ihrer Wirkung selektiv [Proost *et al.*, 1996]. CC-Chemokine sind chemotaktisch für Monozyten, basophile und eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten. Zu ihnen gehören die *monocyte chemotactic proteins* MCP-1-4, *macrophage inflammatory proteins* MIP-1 α und MIP-1 β und RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*) [Baggiolini *et al.*, 1995; Proost *et al.*, 1996]. CXC-Chemokine wirken spezifisch auf neutrophile Granulozyten. Ihnen gehören z.B. Interleukin-8 (IL-8), NAP-2, GRO α , GRO β , GRO γ , ENA-78 (*epithelial neutrophil-activating peptide-78*), und GCP-2 (*granulocyte chemotactic protein-2*) an.

Unter den CXC-Chemokinen ist IL-8 der wichtigste Faktor für die lokale Akkumulation von neutrophilen Granulozyten. Nicht zuletzt, weil es von einer Reihe verschiedener

Zelltypen produziert wird, und somit in jedem Gewebe vorkommen kann. Neben seiner chemotaktischen Wirkung induziert es bei neutrophilen Granulozyten die Sekretion von lysosomalen Enzymen [Walz *et al.*, 1987], die erhöhte Adhärenz an Endothelzellen [Detmers *et al.*, 1990], die Sekretion von LTB₄ [Überblick in Liles und Van Voorhis, 1995] und die erhöhte Expression von Mac-1 und CR-1 [Huber *et al.*, 1991].

Die IL-8-Synthese wird wie oben bereits erwähnt durch primär pro-inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF), auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene induziert. Die Induktion erfolgt über drei verschiedene Signaltransduktionswege, die alle vom gleichen Rezeptortyp aktiviert werden können. Neben der transkriptionellen Aktivierung über NF- κ B- und den SAPK/JNK-Weg, erfolgt eine Stabilisierung der messenger RNA (mRNA) über den p38 MAP Kinaseweg [Holtmann *et al.*, 1999].

1.2 Post-transkriptionelle Genregulation

Die Expression eines Gens kann auf unterschiedlichen Ebenen kontrolliert werden. Dazu gehören Transkription, mRNA-*Splicing*, mRNA-Stabilität, Translation und post-translationelle Mechanismen, wie Protein-Stabilität und -Modifikation [Day und Tuite, 1998]. Die mRNA-Menge wird durch zwei Prozesse reguliert, die RNA-Synthese (transkriptionelle Regulation) und den RNA-Abbau, also ihre biologische Halbwertszeit (post-transkriptionelle Regulation). Post-transkriptionelle Regulationsmechanismen erlauben der Zelle eine schnelle Induktion und eine streng limitierte Synthese des kodierten Proteins. Die Halbwertszeit von einzelnen RNAs kann in eukaryotischen Zellen von einigen Minuten bis zu vielen Stunden variieren [Sachs, 1993]. Sie ist abhängig von bestimmten *cis*-Elementen der Ribonukleinsäuren und daran bindenden *trans*-regulierenden Proteinen [Beelman und Parker, 1995; Jacobson und Peltz, 1996].

In eukaryotischen Zellen gibt es verschiedene Mechanismen der RNA-Degradation. Bei den meisten ist die Deadenylierung im Zytoplasma der erste Schritt [Chen *et al.*, 1995; Dehlin *et al.*, 2000; Jacobson und Peltz, 1996; Wilson und Treisman, 1988; Brewer und Ross, 1988; Shyu *et al.*, 1991; Sachs, 1993]. Decker und Parker [1994] konnten zeigen, daß dieser Schritt in Hefe in mehrere Phasen aufgeteilt ist. In der

initialen Verkürzung wird der Poly(A)-Schwanz langsam um wenige Nukleotide verkürzt. Die zweite erfolgt in einer mRNA-spezifischen Geschwindigkeit und hat einen 5-15 Nukleotide langen Oligo(A)-Schwanz als Produkt. Dieser wird in der terminalen Deadenylierung abgebaut. Im Anschluß erfolgt die Entfernung der 5' 7-Methylguanosin-Kappe (*decapping*) und ein exonukleolytischer Abbau in 5'→3'-Richtung. Eine Variante von diesem Mechanismus ist die exonukleolytische Degradation in 3'→5'-Richtung ohne vorheriges *decapping* [Beelman und Parker, 1995; Day und Tuite, 1998]. Ein RNA-Abbau in 5'→3'-Richtung kann auch Deadenylierungs-unabhängig nach Entfernung der 5'-Kappe erfolgen. Dieser Weg wurde im Zusammenhang mit dem Abbau von falsch prozessierter RNA beschrieben [He *et al.*, 1993]. Eine weitere Möglichkeit ist die Deadenylierungs-unabhängige endonukleolytische Spaltung. Sie wurde für *c-myc* [Bernstein *et al.*, 1992] und den Transferrin-Rezeptor beschrieben [Binder *et al.*, 1994].

Die individuelle biologische Halbwertszeit einer mRNA wird von internen Sequenzelementen bestimmt. Sie beeinflussen die Geschwindigkeit, mit der die Deadenylierung und der weitere Abbau stattfindet [Decker und Parker, 1994]. Solche Elemente können in allen Regionen des Transkriptes lokalisiert sein [Day und Tuite, 1998]. Beispiele für Stabilitäts-bestimmende *cis*-Elemente sind die *iron-response elements* (IREs) in der 3' UTR des Transferrin-Rezeptors [Casey *et al.*, 1989] und die AU-reichen Elemente (AREs), die in vielen instabilen mRNAs von Zytokinen, Proto-Onkogenen und einigen nukleären Transkriptionsfaktoren vorkommen [Shaw und Kamen, 1986; Chen *et al.*, 1995].

Es wird vorgeschlagen, die AREs in drei Klassen einzuteilen, die sich im Aufbau und in den Deadenylierungskinetiken unterscheiden. AREs der Klasse I werden vor allem in mRNAs gefunden, die für nukleäre Transkriptionsfaktoren kodieren, wie *c-fos*. Sie besitzen einige verstreute Kopien des Pentanukleotids AUUUA, die mit Uridin-reichen Sequenzen gekoppelt sind. Die zweite Klasse besitzt mindestens zwei überlappende Kopien des Nonamers UUAUUUA(U/A)(U/A) und ist ebenfalls in einer Uridin-reichen Region lokalisiert. AREs dieser Klasse sind vor allem in der 3' UTR von Zytokin-Transkripten, wie GM-CSF zu finden. Die dritte Klasse beinhaltet AREs, die das Pentanukleotid AUUUA nicht besitzen. Zu ihnen gehört *c-jun*. Mit zunehmenden Hinweisen auf diese Klasse zeichnete sich ab, daß die Annahme, AUUUA sei die zentrale Sequenz eines ARE wahrscheinlich nicht mehr haltbar ist

[Chen und Shyu, 1995]. Die AREs der Klasse I und III besitzen eine distributive Deadenylierungskinetik, d.h. die Poly(A)-Schwänze aller vorhandenen Transkripte des entsprechenden Gens werden synchron abgebaut, erst dann erfolgt die Degradation aller RNA-Körper. Bei den Klasse II-AREs wird der Poly(A)-Schwanz asynchron abgebaut (Prozessive Kinetik). Dadurch findet die Deadenylierung einiger Transkripte parallel zum Abbau anderer statt [Chen und Shyu, 1995; Xu *et al.*, 1997].

Es wurden bisher mehrere ARE-bindende Proteine beschrieben, von denen angenommen wird, daß sie in die Stabilisierung und Destabilisierung von Transkripten involviert sind. Darunter Tristetrapolin, ein CCCH-Zinkfingerprotein, das an der Destabilisierung von TNF α mRNA in Maus-Makrophagen beteiligt ist [Carballo *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 1999]. Ein weiteres ist AUF1 [Zhang *et al.*, 1993; DeMaria *et al.*, 1997; Sirenko *et al.*, 1997; Lafon *et al.*, 1998], auch hnRNP D0 genannt [Kajita *et al.*, 1995]. Von ihm existieren vier durch prä-mRNA-*splicing* entstehende Isoformen mit einem Molekulargewicht von 37, 40, 42 und 45 kDa [Wagner *et al.*, 1998]. Es wurde im Zusammenhang mit ARE-vermittelter Destabilisierung [Loflin *et al.*, 1999] und Hitzeschock-induzierter Stabilisierung beschrieben [Laroia *et al.*, 1999]. Auch ein weiteres heteronukleäres Ribonukleoprotein, hnRNP A1, wurde als ARE-bindend identifiziert [Hamilton *et al.*, 1997]. Bei HuR, einem RNA-bindenden ELAV-Protein (*embryonic lethal, abnormal vision*) konnte nachgewiesen werden, daß eine Erhöhung seiner cytoplasmatischen Konzentration zur Stabilisierung von einem Reporterkonstrukt mit *c-fos* ARE führt [Peng *et al.*, 1998], sowie zur Stabilisierung von Reporterkonstrukten mit AREs der Klasse I und II [Fan und Steitz, 1998a]. Einen Effekt auf die Degradation von *c-jun* (Klasse III-ARE) konnten Peng *et al.* [1998] nicht zeigen. HuR hat ein Molekulargewicht von 32 kDa und wird in allen proliferierenden Zellen exprimiert. Es besitzt drei RNA-*recognition motifs* (RRMs). RRM 1 und 2 binden wahrscheinlich AREs, während RRM 3 den Poly(A)-Schwanz bindet [Ma *et al.*, 1997]. Da HuR ein *shuttling*-Signal (HNS - HuR *nuclear-cytoplasmic shuttling sequence*) besitzt [Fan und Steitz, 1998b], wird angenommen, daß HuR die Transkripte im Kern bindet und sie durch die Kernporen in das Zytoplasma eskortiert [Fan und Steitz, 1998a]. Ob das wieder freigesetzte HuR dann in den Kern zurücktransportiert oder abgebaut wird ist noch nicht geklärt [Keene, 1999].

Ob eines dieser ARE-bindenden Proteine in Signal-induzierte mRNA-Stabilisation involviert ist, ist bis jetzt unbekannt.

Es gibt einige Hinweise auf extrazelluläre Stimuli, die eine Änderung der Degradationsrate von mRNAs induzieren. Phorbol Ester-Behandlung verlängert die Halbwertszeit von GM-CSF Transkripten [Shaw und Kamen, 1986; Bickel *et al.*, 1990] und Calcium-Ionophor die von IL-3 in Mastzellen der Maus [Wodnar-Filipowicz und Moroni, 1990]. In Maus-Makrophagen führt anti-inflammatorisches Interleukin-10 zu einer erhöhten Degradationsrate von CAT-Reporterkonstrukten mit den AREs aus der KC mRNA [Kishore *et al.*, 1999]. Für *c-fos* konnte kürzlich eine Stabilisierung durch Ultraviolettes Licht (UV) gezeigt werden [Blattner *et al.*, 2000].

Auch die direkte Beteiligung von Signalkaskaden an der Regulation der RNA-Stabilität konnte in einigen Fällen dokumentiert werden. Die *c-jun* N-terminale Kinase (JNK) ist an der Kontrolle des Abbaus von IL-3 in Mastzellen [Ming *et al.*, 1998] und von IL-2 in T-Zellen beteiligt [Chen *et al.*, 1998]. Winzen *et al.* [1999] und Holtmann *et al.* [1999] konnten zeigen, daß die IL-1 induzierte Stabilisierung von IL-8 über den p38 MAP Kinase-Weg verläuft. Über den gleichen Signalweg wird auch die Stabilisierung von Cyclooxygenase mRNA vermittelt [Lasa *et al.*, 2000]. Offen bleibt bis jetzt, welche *trans*-regulierenden Faktoren durch diese Stimuli und Signalwege rekrutiert werden.

1.3 MAP Kinasekaskaden

Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinasen (MAPKK) besitzen im Unterschied zu anderen Proteinkinasen die Fähigkeit, sowohl Serin/Threonin-, als auch Tyrosin-Reste ihrer Substrate zu phosphorylieren. Sie werden deshalb auch als Dual-spezifische Kinasen bezeichnet [Dhanasekaran und Reddy, 1998]. Sie sind ein Bestandteil von MAP Kinasekaskaden. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion von zellulären Rezeptoren, und vermitteln eine Modulation der Genregulation und zytoplasmatischer Aktivitäten in Prozessen wie z.B. Zellproliferation, Zellbewegung, Differenzierung und Apoptose [Dhanasekaran und Reddy, 1998; Cobb, 1999; Schaeffer und Weber, 1999]. Die MAP-Kinasen sind evolutionär stark konserviert, und existieren in der Hefe ebenso wie in humanen Zellen. Sie bilden Signalkaskaden aus jeweils drei hierarchisch angeordneten Proteinen, den MAP-Kinasen (MAPK), MAP Kinasen Kinasen (MAPKK, MKK oder MEK) und MAP Kinasen Kinasen Kinasen (MAPKKK oder MEKK). MAPKKK

phosphorylieren und aktivieren dadurch MAPKK, diese wiederum phosphorylieren und aktivieren MAPK. Aktivierte MAPK regulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder unter ihnen agierender Kinasen [Schulze-Osthoff *et al.*, 1997; Cobb, 1999; Schaeffer und Weber, 1999; Widmann *et al.*, 1999]. In Säugetierzellen können fünf voneinander unabhängige MAPK Module unterschieden werden, die den Signalwegen ihren Namen geben: die *extracellular signal-regulated kinase* 1 und 2 (ERK1/2), p38 (SAPK2), *c-jun* N-terminale Kinase (JNK/SAPK), ERK5 und ERK3/4 [Schaeffer und Weber, 1999; Widmann *et al.*, 1999].

ERK1/2 werden durch Wachstumsfaktoren stimuliert, die Rezeptoren mit gekoppelten Tyrosinkinase binden. Die direkte Aktivierung wird von den MAPK/ERK Kinasen 1 und 2 (MEK1/2 oder MKK1/2) induziert. ERK1/2 aktivieren Transkriptionsfaktoren und einige Proteinkinasen, die an Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zellzyklus-Regulation beteiligt sind, darunter Elk-1, die S6 Kinase p90^{rsk} (MAPKAP Kinase 1) und die zytosolische Phospholipase A₂ [Widmann *et al.*, 1999; Schulze-Osthoff *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1993].

Der ERK5-Signalweg kann durch oxidativen Stress, Hyperosmolarität [Abe *et al.*, 1996] und Serum [Kato *et al.*, 1997] stimuliert werden. Der spezifische Aktivator von ERK5 ist MKK5 (MEK5). Im Zusammenhang mit Serum-Stimulation wurde über die Aktivierung von dem Transkriptionsfaktor MEF2C berichtet, der die Expression von *c-jun* induziert [Kato *et al.*, 1997].

Der ERK3/4-Signalweg ist bis jetzt nicht so gut untersucht. Für ERK3 ist eine Aktivierung durch PKC Isoformen beschrieben worden [Sauma und Friedman, 1996]. ERK 4 kann durch den *nerve growth factor* (NGF) und EGF über einen Ras-abhängigen Signalweg aktiviert werden [Peng *et al.*, 1996].

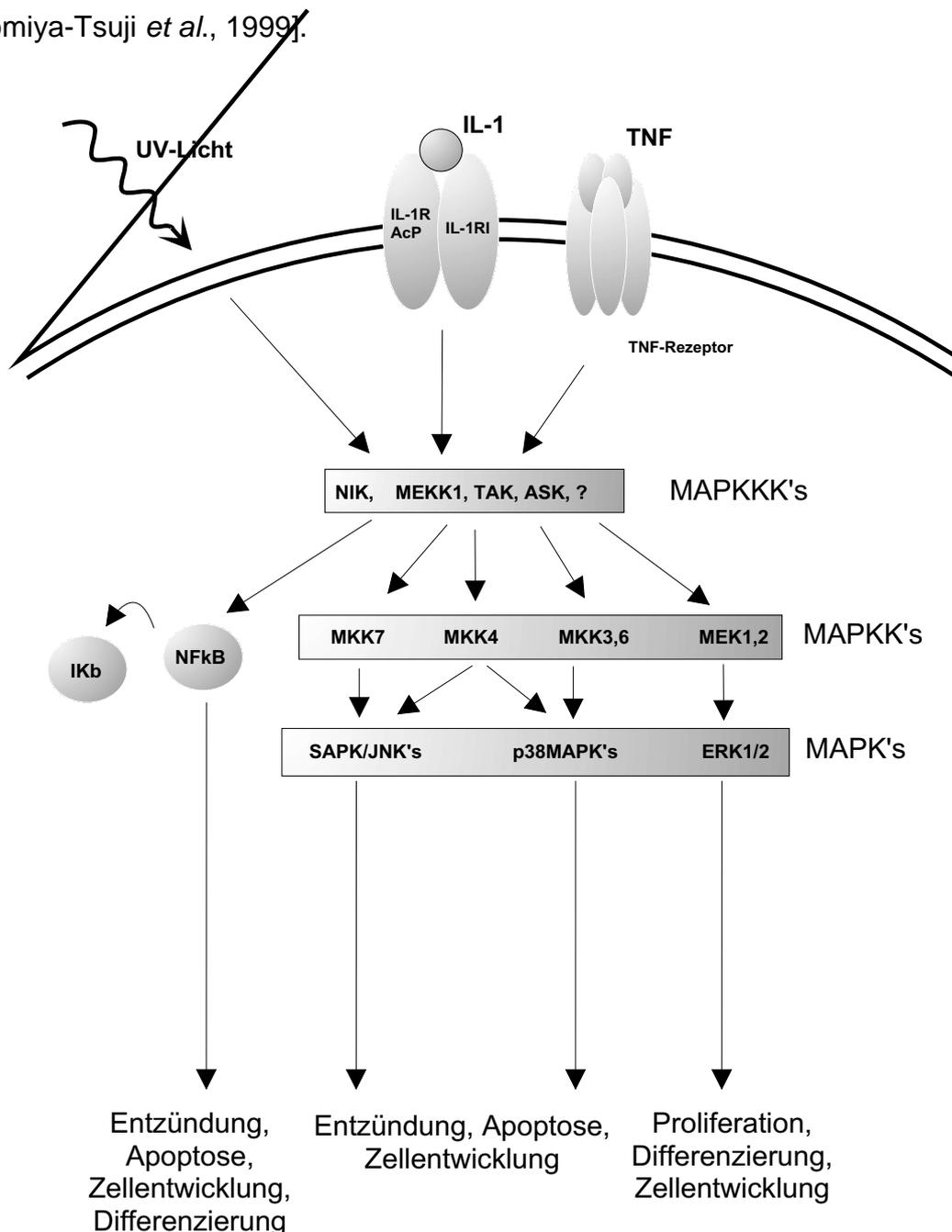
Der JNK-Signalweg wird durch Stress, wie z.B. UV, Hitzeschock, ionisierende Strahlung, DNA-schädigende Substanzen, sowie durch Zytokine, Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren stimuliert und reguliert Prozesse wie z.B. Zellwachstum, Differenzierung, Überleben der Zelle, RNA-Stabilität und Apoptose [Widman *et al.*, 1999; Schulze-Osthoff *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998]. Es existieren 10 verschiedene JNK-Isoformen, die aus drei Genen (*jnk* 1-3) und differentiellem *splicing* hervorgehen

[Gupta *et al.*, 1996; Schulze-Osthoff *et al.*, 1997]. Während JNK1 und 2 ubiquitär exprimiert werden, ist die Synthese von JNK3 auf das Gehirn reduziert [Yang *et al.*, 1997]. JNKs phosphorylieren unter anderem eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, darunter *c-jun*, *junD*, ATF-2, Elk-1 [Schulze-Osthoff *et al.*, 1997] und induzieren die Bindung von Nucleolin und YB-1 an die IL-2 mRNA [Chen *et al.*, 2000]. Die übergeordneten MAPKK von JNK sind MKK4 und MKK7. Die Inaktivierung des Signalwegs wird durch dual-spezifische Phosphatasen, sogenannte MAP Kinase Phosphatasen (MKPs) reguliert, wie z.B. M3/6 [Muda *et al.*, 1996] und MKP-1 [Hirsch und Stork, 1997; Franklin und Kraft, 1997].

Der p38 Signalweg umfaßt vier verschiedene homologe Proteine: p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ [Jiang *et al.*, 1997]. Sie werden von einer Reihe von Stimulatoren aktiviert, darunter UV, osmotischer Schock, Hitzeschock, Lipopolysaccharide (LPS) und Zytokine, wie z.B. IL-1 und TNF [Widman *et al.*, 1999]. Die übergeordneten MAPKK von p38 sind MKK3, MKK4 [Derijard *et al.*, 1995] und MKK6 [Stein *et al.*, 1996; Morigushi *et al.*, 1996]. Dabei ist MKK6 der stärkste Aktivator von p38, die im Gegensatz zu MKK3 alle Isoformen stimuliert [Schulze-Osthoff *et al.*, 1997; Enslin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997]. Negativ reguliert wird der p38-Signalweg ebenfalls durch MKPs, wie z.B. M3/6 [Muda *et al.*, 1996]. Durch den p38 Signalweg werden Prozesse wie z.B. Apoptose und Entwicklung der Zelle koordiniert. Zudem hat es den Anschein, als ob p38 eine Schlüsselrolle in der Regulation inflammatorischer Zellantworten spielt. So führt eine Inhibition von p38 mit Pyridinyl Imidazolen zur Blockierung der IL-1- und TNF-Synthese in humanen Monozyten [Lee *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1993] und zur Inhibition der IL-2-Synthese in T-Zellen [Ward *et al.*, 1997]. Zudem wird die durch IL-2 und IL-7 induzierte Proliferation von T-Zellen durch den p38-spezifischen Inhibitor SB203580 blockiert [Crawley *et al.*, 1997]. Wie oben bereits erwähnt, wird durch p38 zudem eine Stabilisierung der mRNA von IL-8, IL-6, sowie von Reporter-RNAs mit AU-reichen Regionen aus GM-CSF und *c-fos* vermittelt [Winzen *et al.*, 1999]. Substrate von p38 sind die MAP Kinase aktivierten Proteinkinasen 2 und 3 (MAPKAP K2/3 oder MK2/3) [Rousse *et al.*, 1994; Winzen *et al.*, 1999; McLaughlin *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1996] und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, darunter ATF-2 und Elk-1 [Raingeaud *et al.*, 1995; Raingeaud *et al.*, 1996], *c-fos* und *c-jun* [Hazzalin *et al.*, 1996], CREB und ATF-1 [Tan *et al.*,

1996; Iordanov *et al.*, 1997], CHOP [Wang und Ron, 1996], Max [Zervos *et al.*, 1995] und MEF2C [Han *et al.*, 1997].

Von den übergeordneten MAPKKK sind bisher 14 verschiedene bekannt: RAF-1 [Kyriakis *et al.*, 1992], Mos [Posada *et al.*, 1993], MEKK-1 [Lange-Carter *et al.*, 1993], MEKK-2 und MEKK-3 [Blank *et al.*, 1996], MEKK-4 [Gerwins *et al.*, 1997], B-Raf [Vaillancourt *et al.*, 1994], TAK1 [Yamaguchi *et al.*, 1995], A-Raf [Wu *et al.*, 1996], Tpl-2 [Salmeron *et al.*, 1996], MUK [Hirai *et al.*, 1996], SPRK [Rana *et al.*, 1996], ASK-1 [Ichijo *et al.*, 1997] und MST [Hirai *et al.*, 1997]. Sie sind zum Großteil in der Lage mehrere MAP Kinasewege zu aktivieren, einige aktivieren zudem den NF- κ B-Signalweg, wie z.B. MEKK-1 [Lee *et al.*, 1997; Nemoto *et al.*, 1998] und TAK-1 [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999].



1.4 Ultraviolettes Licht (UV)

Ultraviolette Strahlung (UV) wird in die Bereiche UV-A (320-380 nm), UV-B (280-320 nm) und UV-C (200-280 nm) eingeteilt. Die drei UV-Spektren unterscheiden sich in ihrer biologischen Wirkung. UV-A wird von den meisten Biomolekülen nur schwach absorbiert, hat aber oxidative Wirkung, wodurch reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen. UV-B besitzt in seiner Wirkung ebenfalls einen oxidativen Anteil, wird aber, wie UV-C, sehr stark von Makromolekülen absorbiert. Die Transmission durch das Gewebe nimmt aufgrund der geringeren Absorption mit der Wellenlänge zu. So kann ein sehr geringer Anteil der UV-A Strahlung noch von Blutkomponenten absorbiert werden [Tyrrell, 1995].

Bestrahlung von Gewebe mit UV-B kann bei hohen Dosen Entzündungen induzieren. Das prominenteste Beispiel ist der Sonnenbrand [Miller *et al.*, 1994]. Es konnte nachgewiesen werden, daß UV eine Modulation der Expression verschiedener Gene von Transkriptionsfaktoren, Proteasen und Zytokinen induziert [Kondo *et al.*, 1993; Bender *et al.*, 1997]. Darunter IL-1, IL-3, IL-6, TNF, GM-CSF [Schwarz und Luger, 1989] und IL-8 [Kondo *et al.*, 1993]. In den Fällen von IL-6 [de Vos *et al.*, 1994], *c-fos*, KIN17, *c-jun*, I κ B und *c-myc* [Blattner *et al.*, 2000] konnten Abnahmen der mRNA-Degradationsraten in Folge der UV-Bestrahlung gezeigt werden. Zudem konnten Wang *et al.* [2000] vor kurzem eine UV-induzierte Stabilisierung der p21 mRNA nachweisen, in die HuR involviert ist.

Bis heute ist allerdings nicht hinreichend geklärt, über welche Mechanismen UV wirkt. Anfangs wurden DNA-Schäden als Zwischenprodukte der zellulären Antwort diskutiert [Stein *et al.*, 1989]. Bender *et al.* [1997] konnten zeigen, daß die späten Zellreaktionen durch solche Schäden induziert werden. Die frühen Antworten werden auf die UV-induzierte Phosphorylierung der Tyrosin-Reste einiger Wachstumsfaktor-Rezeptoren zurückgeführt. Diese korreliert mit der Inhibition von Tyrosin-Phosphatasen [Bender *et al.*, 1997]. Neben der Phosphorylierung von Zellrezeptoren konnte auch die Phosphorylierung einiger zellulärer Proteine gezeigt werden [Englaro *et al.*, 1998]. Zudem werden von UV die drei MAP Kinasewege, ERK1/2, SAPK/JNK und p38 [Englaro *et al.*, 1998; Derijard *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994] aktiviert, sowie die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 [Stein *et al.*, 1989;

Devary *et al.*, 1991] und die in die Apoptose involvierten Caspasen 3 und 1 [Shimizu *et al.*, 1999].

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von UV auf die post-transkriptionelle Regulation von Zytokin- und anderen kurzlebigen RNAs in HeLa-Zellen untersucht werden. Dabei war von Interesse, über welche Mechanismen UV wirkt, und ob es Unterschiede in der Wirkungsweise und der Transkriptspezifität zu IL-1 gibt.

Ferner sollte in Gel-Retardationstests nach Proteinen gesucht werden, die RNAs abhängig von UV-Bestrahlung binden und diese identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.11 Geräte

Brutschrank	Typ 27771 (Heraeus, Hanau))
LS- β -Counter	Typ 1409/1411 (Wallac, Turku, Finnland)
Elektrophoresekammern	Eigenbau der Werkstatt der MHH BioRad (München)
Filmentwickler	Optimax (Protec)
Geltrockner	Biometra, Göttingen
Heizblock	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Hybridisierungsöfen	Hybaid (MWG)
Ionenaustauscheranlage	Milli-Q ^{UF} PLUS (Millipore)
Luminometer	Lumat LB-9501 (Berthold)
Magnetrührer	MR 2002 (Heidolph, Kehlheim)
Mikroskop	Laborlux (Leitz) ULWCD (Olympus, Tokyo, Japan)
Mikrotiterplattenleser	Modell MR 5000 (Dynatech, Denkendorf)
Mischgerät	Reax 2000 (neoLab, Heidelberg)
PCR-Maschine	Vario V (Landgraf, Langenhagen)
pH-Meter	Typ CG 820 (Schott, Göttingen)
Plattenlesegerät	MR 5000 (Schott, Göttingen)
Schüttelgerät	Bellydancer (Stovall, Greensboro, USA)
Schüttelinkubator	Certomat H (Braun, Melsungen)
Schüttelwasserbad	(Köttermann, Häningsen)
Schweißgerät	PolyStar 401 M-RPA2
Spannungsgeräte	Desagatronic 2000/300 (Desaga, Heidelberg), ST305 (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein)
Sterilbank	HeraSAFE (Heraeus)
UV-Spektrometer	160A (Shimadzu) Gene Quant II (Pharmacia)

UV-Transilluminator	(Bachofer, Reutlingen) mit Videoscanner GelDoc 1000 (BioRad) mit Video Copy Prozessor (Mitsubishi)
Waagen	1204 MP, 1265 MP 1602 MP (Satorius, Göttingen)
Western Blot-Kammer	SammyDry (Schleicher und Schuell, Dassel)
Zentrifugen	Tischzentrifuge 112 (Sigma, Osterode) Kühlzentrifugen 2K15, 3K20 und 3K30 (Sigma, Osterode) Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA-14 (Beckmann, München) Kühlzentrifugen RT 6000B (DuPont Sorvall Instruments, Nemours GmbH, Bad Homburg) Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor TLA 100.3/1468 (Beckmann, München)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Amersham	Hybond-N Membran
Eppendorf, Hamburg	Kristall-Spitzen (10 µl) Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)
Greiner, Nürnberg	Plastik-Einmalpipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml)
Kodak, Rochester, USA	Röntgenfilm X-OMAT AR
Landgraf, Langenhagen	PCR-Gefäße (0,5 ml)
Millipore	Immobilon (PVDF Membran)
Nunc, Wiesbaden	4-well Platten Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml) Gewebekulturschalen Immunoplate (96 wells, Rundboden) Plastikröhrchen (10 ml, 50 ml) Zentrifugationsröhrchen (15 ml mit Schraubdeckel)
Roche Diagnostics	CSPD DIG-11-UTP

Sarstedt, Nürnberg	Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)
	Reaktionsgefäße (1,5 ml)
Sartorius, Göttingen	Sterilfilter Miniart NML
Whatmann, Maisstone, UK	Filterpapier 3MM (1,5 mm)

2.1.3 Enzyme

DNase I (RNase-frei)	Roche Diagnostics
Klenow Fragment (2U/µl)	MBI Fermentas, Wilna
Proteinase K	Roche Diagnostics
Reverse Transkriptase (MMLV)	Stratagene GmbH, Heidelberg
RNase Block (40U/µl)	Stratagene GmbH, Heidelberg
	MBI Fermentas, Wilna
RNaseT1	Roche Diagnostics
T3- Polymerase	Roche Diagnostics
T7-Polymerase	Roche Diagnostics
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

2.1.4 Antikörper

Anti-AUF-1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gary Brewer, Winston-Salem, USA
Anti-c-myc	Roche Diagnostics
Anti-Digoxygenin-AP	Roche Diagnostics
Anti-GFP	Roche Diagnostics
Anti-hnRNP A1 9H10	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gideon Dreyfuss, Philadelphia, USA
Anti-HuR mab 19F12	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Henry Furneaux, New York, USA
Esel Anti-Maus-AP	Dianova
Ziege Anti-Maus-AP (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Ziege Anti-Maus-POD	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

2.1.5 Chemikalien und Lösungen

Die Chemikalien und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Fluka, Merk, Serva, Biomol, Roth, Baker und Pharmacia bezogen (Qualitätsstufe „Für die Molekularbiologie“, RNase-frei)

2.1.6 Kits

Macherey-Nagel	NucleoBond PC500; Cat.-No. 740 574 50
Qiagen	QIAshredder; Cat.-No. 79656
	RNeasy MiniKit; Cat.-No. 74106

2.1.7 Plasmide, Bakterienstämme und eukaryotische Zellen

Plasmide

pcDLR α HA-TAK1	[Holtmann <i>et al.</i> , 2000]
pcDNA3 MK2 _{2E}	[Engel <i>et al.</i> , 1995]
pcDNA3 MK2 _{K76R}	[Winzen <i>et al.</i> , 1999]
pcDNA3 MKK6 _{2E}	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Matthias Gaestel, Würzburg, Deutschland
pCS3MT	[Holtmann <i>et al.</i> , 1999]
pCS3MT flag NIK	[Winzen <i>et al.</i> , 1999]
pCS3MT flag p38 _{AGF}	[Winzen <i>et al.</i> , 1999]
pCS3MT MKK7 3E	[Holland <i>et al.</i> , 1997]
pEF TAB1	[Shibuya <i>et al.</i> , 1996]
pEGFP-C1	Clontech
peVHA JNK ₂	[Holtmann <i>et al.</i> , 1999]
pFC MEKK-1	Stratagene
pMCL-HA-MKK1 R4F	[Mansour <i>et al.</i> , 1994]
pTet BBB GM-CSF _{ARE}	[Xu <i>et al.</i> , 1998]
pTet BBB IL-8 ₉₇₂₋₁₃₁₀	[Winzen <i>et al.</i> , 1999]
pTet myc HuR	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ann-Bin Shyu, Houston, USA

pUHC 13-3	[Gossen und Bujard, 1992]
pUHD 10 CAT TIMP-1	s. 3.2.3

Bakterienstämme

Escherichia coli K12 LK111 λ

Eukaryotische Zelllinien

HeLa ATCC CCL-2 epitheliales Cervixkarzinom (human)
HeLa tTA [Gossen und Bujard, 1992]

2.1.8 Puffer

Auftragspuffer (DNA, RNA)	50 % Glycerol (v/v) 0,4 % Bromphenolblau (w/v) 1,0 mM EDTA, pH 8,0
10 x Blocklösung	10 % Blockreagenz-Pulver (w/v) (Roche Diagnostics) in Maleinsäurepuffer bei 65°C lösen
Coomassie-Färbelösung	1,0 g/l Coomassie Brilliant Blue 3,6 % Methanol (v/v) 7,22 % Essigsäure (v/v)
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl
Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)	25,0 mM Tris-HCl, pH 8,5 215 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v)

2 x HeBS-Puffer	16,4 g/l	NaCl
	11,9 g/l	HEPES
	0,21 g/l	Na ₂ HPO ₄
	pH eingestellt auf 7,05	
Hybridisierungslösung (Northern Blot)	25,0 ml	Formaldehyd
	12,5 ml	20 x SSPE
	10,0 ml	10 x Blocklösung
	0,5 ml	10% (w/v) N-Laurylsarkosin
	50 µl	20% (w/v) SDS
	1.95 ml	H ₂ O
Luziferase-Reagenz	20,0 mM	Tricin
	1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ *5H ₂ O
	2,67 mM	MgSO ₄
	33,3 mM	DTT
	270 µM	Coenzym A
	530 µM	ATP
	470 µM	Luciferin
	pH eingestellt auf 7,8	
Lysepuffer (Luziferase Test)	4,3 ml	200 mM KH ₂ PO ₄
	45,7 ml	200 mM K ₂ HPO ₄
	200 µl	0,2% (v/v) Triton X-100
	ad 100 ml H ₂ O	
Lysepuffer (zytosolische Extrakte)	10,0 mM	HEPES, pH 7,9
	10,0 mM	KCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	2,5 %	Nonidet-P40 (v/v)
	1,0 µg/ml	Leupeptin
	1,0 µg/ml	Aprotinin
	0,5 mM	PMSF

Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt
10 x MOPS	200 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH eingestellt auf 7,0
Shift-Auftragspuffer	20 % Glycerin (v/v) 0,1 % Bromphenolblau (w/v)
5 x Shift-Puffer	100 mM HEPES, pH 7,8 500 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 15 % Glycerin (v/v) 2,5 mM DTT 2,5 mM PMSF 25 µg/ml Pepstatin A
20 x SSC	3,0 M NaCl 300 mM Tri-Natrium-Citrat pH eingestellt auf 7,0
20 x SSPE	3,0 M NaCl 200 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM EDTA pH eingestellt auf 7,4
50 x TAE-Puffer	2,0 M Tris 0,1 M EDTA pH mit Essigsäure eingestellt auf 8,0

10 x TBE-Puffer	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
TBS	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TE-Puffer	10,0 mM Tris-HCl, pH 8,0 1,0 mM EDTA
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer + 0,3% (v/v) Tween 20
Western-Puffer I	0,4 % SDS (w/v) 60 mM Milchsäure 100 mM Tris pH eingestellt auf 8,4
Western-Puffer II	0,1 % SDS (w/v) 15 mM Milchsäure 25 mM Tris pH eingestellt auf 8,4
Western-Puffer III	20 % Methanol (v/v) 60 mM Milchsäure 20 mM Tris pH eingestellt auf 3,8
Western-Puffer IV	10 % Methanol (v/v) 100 mM Tris pH eingestellt auf 10,4

2.1.9 Medien

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton
	5 g Bacto-Hefe-Extrakt
	5 g NaCl
	ad 1 l H ₂ O
	pH 7,5 einstellen

Zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienklone wird Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Bacto-Trypton und -Hefeextrakt wurden von Difco Laboratories (Detroit, USA) bezogen.

Zellkulturmedium	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM)
	Glutamin (2 mM) (Gibco)
	Penicillin G (100 U/ml) (Sigma)
	Streptomycin (100 µg/ml) (Sigma)
	5-10% Fötale Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert (56°C, 10 min) (PAN)

Trypsin/EDTA (Gibco)	10 x Stammlösung in PBS verdünnt
----------------------	----------------------------------

PBS (Gibco)	10 x Stammlösung in H ₂ O verdünnt
-------------	---

Zellstimulanzien	Interleukin-1
	Ultraviolettes Licht (312 nm, 254 nm)

Zellinhibitoren	Actinomycin D (Sigma)
	ZVAD-fmk (Calbiochem)
	Cycloheximid (Sigma)
	Doxycyclin bzw Tetracyclin (für HeLa tTA) (Sigma)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellhaltung und Zellpassage

Die Kultivierung aller eingesetzten Zelllinien erfolgte in 50 ml und 250 ml Zellkulturflaschen bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt. Die Zellen werden in dem entsprechenden Kulturmedium (HeLa tTA: DMEM + 5% (v/v) FKS, s. 2.1.9) gezüchtet.

Die Passagierung der adhärennten Zellen erfolgt in Abständen von 3-4 Tagen. Sie werden dazu mit PBS gewaschen und mit einer 1 x Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Zellen werden in frischem Medium aufgenommen und in der gewünschten Zelldichte ausgesät.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl und -vitalität werden 50 µl einer Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer 0,1%igen (w/v) Tryphanblaulösung in PBS versetzt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Assistent) werden die Zellen unter dem Mikroskop gezählt und die Zelldichte nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zelldichte [ml}^{-1}\text{]} = \frac{\text{Gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}} \times 10^4$$

Routinemäßig werden zwei Großquadrate der Kammer ausgezählt. Bei allen Versuchen betrug die Zellvitalität nahezu 100%.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren werden die abtrypsinisierten und in Medium aufgenommenen adhären Zellen bei 300 x g und 4°C für sechs Minuten abzentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in eiskaltem Einfriermedium mit 10% DMSO und 20% FKS resuspendiert und in 1 ml Portionen auf Kryoröhrchen verteilt. Anschließend werden die Röhrchen in einen 4°C kalten *Cryo Freezing Container* (Nalgene) gestellt und zunächst bei -80°C eingefroren. 24 Stunden später werden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff umgelagert. Der Inhalt einer 250 ml Flasche wird bei dieser Prozedur auf ein bis zwei Kryoröhrchen verteilt.

Zum Auftauen werden die Zellen bei 37°C angetaut, tropfenweise mit 1 ml FKS versetzt und die Suspension in 10 ml kaltes Medium mit 20% FKS überführt. Nach ein bis zwei Waschschritten (Zentrifugation: 6 min, 250 x g, 4°C) werden die Zellen im gleichen Medium ausgesät.

2.2.4 Transfektion von Zellen mit Calcium-Chlorid

Puffer und Lösungen

- 250 mM CaCl₂
- 2 x HeBS-Puffer
- 10% Glycerol (in DMEM)
- PBS

Alle verwendeten Medien und Puffer werden auf 37°C vorgewärmt. Jeweils 5 x 10⁶ adhären HeLa-Zellen werden am Abend vor der Transfektion in Zellkulturschalen (Nunc, 9 cm Ø) in 10 ml DMEM-Medium mit 10% FKS (s. 2.1.8) ausgesät.

Eine Stunde vor der Transfektion wird das Medium erneuert. Eine Plasmid-DNA Menge von 16-25 µg wird in 500 µl 250 mM CaCl₂ pipettiert. Anschließend werden vorsichtig 500 µl 2 x HeBS-Puffer zugegeben und 2 Minuten bei RT inkubiert, wobei sich ein weißer Niederschlag bildet, der tropfenweise auf die Zellen gegeben wird.

Vier Stunden später wird ein Glycerol-Schock durchgeführt. Dazu wird das Medium abgenommen, 2 ml einer 10%igen Glycerol-Lösung (in Zellkulturmedium mit 10% FKS, s. 2.1.9) auf die Zellen gegeben und 3 Minuten bei RT inkubiert. Es wird dreimal mit PBS gewaschen und 10 ml frisches Medium zugegeben.

Im Falle einer sich anschließenden Northern Blot-Analyse (s. 2.6) wurden die Zellen zwei Stunden nach dem Glycerol-Schock abtrypsiniert und auf die gewünschte Anzahl von 4-wells (4-well-Platten, NUNC) verteilt. Am nächsten Tag wurde durch Zugabe von Doxycyclin (3 µg/ml) oder Actinomycin D (5 µg/ml) die Transkription der transfizierten Reporterkonstrukte bzw die Transkription insgesamt zu einem Zeitpunkt null inhibiert. Die Zellen wurden dann nach den gewünschten Zeitintervallen nach einem Waschschrift mit PBS in Puffer RLT+10 mM DTT (Puffer RLT aus Qiagen RNeasy Minikit, s. 2.1.6; Puffervolumen abhängig von Zellzahl nach Herstellerangaben verwendet) lysiert. Erfolgte keine sofortige Gesamt-RNA-Präparation (s. 2.4.2), wurden die Lysate bei -80°C gelagert.

2.2.5 Apoptose-Färbung

Zellen werden durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Hoechst 33258 (5 µl/1,5 x 10⁵ Zellen) mit anschließender Inkubation von 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ angefärbt. Die Zellen werden unter dem Mikroskop fotografiert (Bandbreite der Anregung: 380-490 nm).

2.3 Präparation von Zellen

2.3.1 Präparation von zytosolischen Extrakten (nach Wang *et al.*, 2000)

Puffer und Lösungen

- PBS
- Lysepuffer

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

Die adhärennten Zellen werden nach Abnehmen des Mediums einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie von der Zellkulturschale abgeschabt und in 1 ml PBS aufgenommen. Sie werden 5 Minuten bei 600 x g und 4°C pelletiert und das Pellet in Lysepuffer resuspendiert (40 µl Lysepuffer pro 10⁶ Zellen). Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis werden die Zelltrümmer 4 Minuten bei 1000 x g und 4°C abzentrifugiert, und der Überstand fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Daran schließt sich ein erneuter Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 1000 x g, 4°C) an. Der Überstand wird abgenommen und bei -80°C gelagert. Zuvor wurden 5 µl für eine Proteinbestimmung abgenommen (s. 2.7.1).

2.3.2 Präparation von Lysaten für Luziferase-Aktivitäts-Bestimmungen

Puffer und Lösungen

- PBS
- 0,2% (v/v) Triton X-100
- Lysepuffer

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Zellen werden nach Abnahme des Mediums einmal mit PBS gewaschen, abgeschabt und abzentrifugiert (1 Minute, 13.000 x g, 4°C). Das Pellet wird in 100 µl Lysepuffer pro 10⁶ Zellen resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird 15 Minuten bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert und der

Überstand bei -80°C gelagert, bis er im Luziferase-Aktivitäts-Test (s. 2.7.4) eingesetzt wird.

2.4 Präparation, Synthese und Analyse von Nukleinsäuren

2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wird der Macherey-Nagel NucleoBond 500-Kit verwendet und nach Herstellerangaben benutzt.

2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy MiniKit nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Homogenisierung der Lysate wurde der QIAshredder benutzt (s. 2.1.6).

2.4.3 Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA wird die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette (Halb-Mikroküvette, 100 μl Spezialküvette) gemessen. Eine OD_{260} entspricht einer Konzentration von:

50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA

40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA

40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

31 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotid

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Detektion nicht radioaktiv markierter Nukleinsäuren erfolgt über Ethidiumbromid, welches in die doppelsträngige DNA interkaliert und sich auch an einzelsträngige DNA und RNA anlagern kann, so daß die Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden können.

Radioaktiv markierte Nukleinsäuren werden über Autoradiographien detektiert.

DNA-Gelelektrophorese

Aus der Größe der DNA-Fragmente ergibt sich die Agarose-Konzentration des Gels, das für die Auftrennung verwendet wird. In der Regel wird mit 1,2%igen Gelen gearbeitet, bei extrem kleinen Fragmenten (ca. 50 Basenpaaren) werden 2-3%ige Gele verwendet. Den Gelen wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Der Laufpuffer ist 1 x TAE (s. 2.1.8).

RNA-Gelelektrophorese

- 10 x MOPS
- Auftragspuffer

Auftragsmix	3,75 µl	Formaldehyd
	1,5 µl	10 x MOPS
	1,0 µl	Ethidiumbromid (200 µg/ml)
	3,0 µl	Auftragspuffer

1%iges Agarosegel	1,2 g	Agarose
	12,0 ml	10 x MOPS
	22,1 ml	Formaldehyd
	86,0 ml	H ₂ O

Die Auftrennung der RNA findet unter denaturierenden Bedingungen statt. 10 µl Probe wird mit 9,25 µl Auftragsmix versetzt und für 15 Minuten bei 56°C denaturiert. Danach wird die Probe auf Eis abgeschreckt und aufgetragen. Es wird eine Spannung von 4 V/cm angelegt. Als Laufpuffer wird 1 x MOPS verwendet.

2.4.5 RNA-Markierung mit α -³²P-UTP durch *in vitro* Transkription

Puffer und Lösungen

- 10 x Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics)
- 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 0,18 mM UTP (Roche Diagnostics)
- α -³²P-UTP (400 Ci/mmol oder 800 Ci/mmol)
- SP6-, T3- oder T7-Polymerase (Roche Diagnostics)
- RNase-Inhibitor (40 U/µl; MBI Fermentas)
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
- tRNA (2,0 µg/µl)
- DNase I
- 10 mM Tris.HCl, pH 7,4
- NucTrap-Säulen (Stratagene)

Reaktionsansatz	1-2 µg	DNA- <i>Template</i>
	2,0 µl	10 x Transkriptionspuffer
	3,0 µl	NTP-Mix (ATP,CTP,GTP; je 10 mM)
	2,0 µl	UTP (0,18 mM)
	5,0 µl	α - ³² P-UTP
	1,0 µl	RNase-Inhibitor
	2,0 µl	RNA-Polymerase
	ad 20 µl H ₂ O	

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach mit 2 µl DNase I die DNA abgedaut (15 min, 37°C). Die RNA wird über NucTrap-Säulen aufgereinigt, welche die vollständige Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide bis zu einer Größe von 17 Basen gewährleisten. Dazu wird der Ansatz mit Säulenpuffer (935,7 µl

10 mM Tris-HCl+64,3 µl tRNA (2,0 µg/µl) verdünnt und nach Herstellerangaben behandelt. Vor und nach der Abtrennung werden je 2 µl Aliquots entnommen und deren Aktivitätsmengen über die Zählraten der Cerenkov-Strahlung (in cpm) im β -Counter gemessen [Berger, 1984]. Die spezifische Aktivität der markierten RNA liegt bei $0,5-1,9 \times 10^5$ cpm/ng. Zur Kontrolle der synthetisierten RNA werden 5 µl der markierten RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt (s. 2.4.3) und mit einem Röntgenfilm detektiert.

2.4.6 RNA-Markierung mit DIG-11-UTP durch *in vitro* Transkription

Die Markierung der RNA mit DIG-11-UTP erfolgte nach Herstellerangaben

2.5 Gel-Retardationsanalyse

Puffer und Lösungen

- 5 x Shiftpuffer
- Shift-Auftragspuffer
- Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30% (Roth; Art.-Nr. A124.1)
- 10 x TBE
- APS
- TEMED

nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gel (5%ig)

6,7	ml	Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30% (Roth)
1,0	ml	1 x TBE
32,1	ml	H ₂ O
280	µl	APS
28	µl	TEMED

Die Gel-Retardationsanalyse ermöglicht die Detektion und Untersuchung von RNA-Protein-Komplexen. Die Reaktion wird wie folgt auf Eis angesetzt:

- 5,0 μ l Zytosol (10 μ g in 1 x Shiftpuffer)
- 10,0 μ l tRNA-Mix (4 μ l 5 x Shiftpuffer/2 μ l tRNA (2 μ g/ μ l)/4 μ l H₂O)
- 5,0 μ l radioaktiv markierte RNA (2×10^5 cpm)

Der Ansatz wird 10 min bei 30°C inkubiert. Da die RNA meist zu groß ist, um in das Gel einzudringen, wird der Ansatz mit 30 U RNase T1 für 20-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die RNase T1 spaltet die RNA nach der Base Guanin, so daß die RNA in verschieden großen Fragmenten vorliegt. Es werden 5 μ l Auftragspuffer zugefügt und die Proben werden auf einem 5%igen, nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Vor dem Auftrag der Proben muß das Gel bei ca. 7 V/cm vorlaufen, bis eine konstante Stromstärke erreicht ist. Der Gellauf erfolgt bei der gleichen Spannung für ca. 2,5 Stunden. Als Elektrodenpuffer wird 0,25 x TBE-Puffer verwendet. Nach dem Lauf wird das Gel auf ein Whatman-Papier überführt und mit Folie abgedeckt bei 80°C eine Stunde auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet. Die Banden werden bei -80°C mit einem Röntgenfilm detektiert.

Bei Versuchen mit Antikörpern gegen die RNA-Protein-Komplexe (*Super-Shift*) wird 0,8 μ g Antikörper nach 20 minütiger Inkubation mit RNase T1 zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert.

2.6 Northern Blot

2.6.1 Northern Blot

Puffer und Lösungen

- 10 x SSC
- 2 x SSC

Die Northern Blot-Methode ermöglicht, auf einem Agarose-Gel aufgetrennte RNA unter Ausnutzung von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran zu transferieren.

Die RNA wird auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (s. 2.4.4). Das Gel wird anschließend zweimal 15 Minuten in H₂O gewaschen und 15 Minuten in 10 x SSC äquilibriert. Das Gel wird mit der Oberseite nach unten auf eine in 10 x SSC-getränkte Filterpapierbrücke gelegt. Die Enden des Filterpapiers tauchen in 10 x SSC. Das Gel wird rundherum mit Parafilm abgedichtet. Auf das Gel wird luftblasenfrei die Nylonmembran und drei Whatman-Filterpapiere gelegt, die zuvor alle in 10 x SSC äquilibriert werden. Darauf werden drei Windeln (Strampelpeter, Hartmann), eine Glasplatte und ein Metallblock (ca. 1 kg) angeordnet. Die Blotzeit beträgt ca. 18 Stunden. Danach wird die Nylonmembran mit 2 x SSC gewaschen und 10 Minuten bei 90°C getrocknet. Anschließend wird die RNA durch 75 Sekunden Bestrahlung mit UV (302 nm) auf der Membran immobilisiert. Der Blot wird entweder gleich hybridisiert (s. 2.6.2) oder bei 4°C gelagert.

2.6.2 Hybridisierung, Stringenzwäsche und Detektion

Puffer und Lösungen

- 5 x SSPE
- 2 x SSC/0,1% SDS
- 0,1 x SSC/0,1%SDS
- Blocklösung
- Hybridisierungslösung
- Waschpuffer

Hybridisierung

Die Membran wird in 5 x SSPE äquilibriert. Die Hybridisierung findet dann im Hybridisierungssofen bei 68°C statt. Zuerst wird die Membran 2 Stunden in der Hybridisierungslösung prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wird die mit DIG-11-UTP markierte RNA-Sonde (s. 2.4.6) 5 Minuten aufgekocht, auf Eis abgeschreckt und in frische Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgt für ca. 24 Stunden bei 68°C.

Stringenzwäsche

Um die unspezifisch gebundene und ungebundene RNA-Sonde zu entfernen, wird die Membran stringent gewaschen. Die Membran wird einmal kurz mit 2 x SSC/0,1% SDS gespült und dann zweimal 5 Minuten in dergleichen Lösung bei RT gewaschen. Im Anschluß folgen zwei Waschschrte bei 68°C mit 0,1 x SSC/0,1% SDS für je 15 Minuten.

Detektion

Die Detektion erfolgt mittels einem Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment; Roche Diagnostics) gegen DIG-11-UTP. Dieser ist mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert, die das Substrat CSPD (Roche Diagnostics) umsetzt. Das chemilumineszente Produkt ist über eine Autoradiographie detektierbar.

Die Membran wird kurz in Waschpuffer äquilibriert, dann in 1 x Blocklösung 30 Minuten bei RT hybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wird das Anti-DIG-AP Fab-Fragment 1:10.000 in Blocklösung verdünnt zur Membran gegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Es folgen zwei 15 minütige Waschschrte mit Waschpuffer, um die nicht-gebundenen und unspezifisch-gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wird 2 Minuten in Detektionspuffer äquilibriert, in eine Plastikfolie eingeschweißt, 2 ml CSPD zugegeben und für eine gleichmäßige Verteilung gesorgt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wird das Substrat abgenommen und die Banden durch einen Röntgenfilm detektiert.

2.7 Analyse von Proteinen

2.7.1 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wird nach der Bradford-Methode [Bradford, 1976] durchgeführt. Sie beruht auf einer Farbreaktion, die photometrisch bestimmt werden kann. Die Lösung (BioRad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat; Cat. No. 500-0006) enthält unter anderem den Farbstoff Coomassie Blau, der an Proteine bindet, wodurch sich das Absorptionsspektrum verschiebt. Dieses wird dann bei 595 nm gemessen. 100 µl Proteinverdünnung werden mit 100 µl der 40%igen Farblösung (Gebrauchslösung) gemischt und die Absorption bestimmt. Als Standard wird eine BSA-Eichreihe verwendet.

2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Puffer und Lösungen

- Elektrodenpuffer

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgt in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (DISK-SDS-PAGE) nach Laemmli [Laemmli, 1970]. Als Gele werden die *Pre-Cast-Gels* (10% Tris-Glycin-Gele; 1,0 mm x 12 *wells*) der Firma Novex benutzt (Cat. No. EC60752). Die Auftrennung erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA.

Bei Bedarf werden die Proteine im Gel 5 Minuten mit Coomassie-Gebrauchslösung angefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgt mit einem 7% Essigsäure/7% Methanol-Gemisch.

2.7.3 Western Blot (*semi dry Blot*) und Immunochemische Detektion

Puffer und Lösungen

- Western-Puffer I
- Western-Puffer II
- Western-Puffer III
- Western-Puffer IV
- TBS

Die auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine werden auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) transferiert. Filterpapiere werden in den Puffern I-IV eingelegt. Die PVDF-Membran wird in 100% Methanol äquilibriert und dann gut mit H₂O gewaschen. Das Blotting wird in einer Elektroblokkammer durchgeführt. Auf die Platte der Kathode werden nacheinander zwei Filterpapiere mit Puffer I und ein Filterpapier mit Puffer II gelegt. Darauf kommt das Gel und die PVDF Membran, die beiden zuvor in Puffer I äquilibriert werden. Auf die Membran werden ein Filterpapier mit Puffer III und eins mit Puffer IV gelegt und die Blokkammer mit der

Anodenplatte geschlossen. Der Transfer erfolgt für zwei Stunden bei $1,0 \text{ V/cm}^2$. Die PVDF-Membran wird anschließend mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt (4 Minuten) und dann mit 50% Methanol entfärbt, so daß die Proteinbanden sichtbar sind. Die Membran wird fotografiert, die Größenstandards eingezeichnet, und die Membran mit 100% Methanol vollständig entfärbt.

Im Anschluß wird eine Immunochemische Detektion durchgeführt. Dazu wird die Membran in TBS äquilibriert, mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS die unspezifischen Bindungsstellen durch 1-2 stündige Inkubation geblockt und danach ein spezifischer Antikörper zugegeben (in 5% Magermilchpulver in TBS + 0,1% NaN_3). Mit diesem wird Ü/N bei 4°C inkubiert. Der Blot wird sechsmal mit TBS + 0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen und dann für 2 Stunden mit einem AP-konjugierten Zweitantikörper bei RT inkubiert. Der Blot wird erneut sechsmal mit TBS + 0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen und anschließend in Detektionspuffer (pH 8,8) äquilibriert. Nach 5 minütiger Inkubation in CSPD (Roche Diagnostics) werden die Proteinbanden mit einem Röntgenfilm detektiert.

2.7.4 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die für die Luziferase-Aktivitätsmessung präparierten Lysate (s. 2.3.2) beinhalten das Protein Luziferase. Mischt man das Zellysat mit luziferinhaltigem Reagenz, wird Luziferin als Substrat der Luziferase unter Freisetzung eines Photons oxidiert. Die Lichtreaktion kann im Luminometer gemessen werden.

Es werden jeweils Doppelwerte der Probe gemessen. Dazu werden 20 μl Lysat mit 100 μl Luziferase-Reagenz gemischt und im Luminometer gemessen.

3. Ergebnisse

Die Expression von Zytokin-, Proto-Onkogen- und anderen kurzlebigen mRNAs wird durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Die erhöhte RNA-Synthese und die Stabilität der mRNA einerseits, die effektive Degradation andererseits, ermöglichen eine schnelle und gleichzeitig streng limitierte Synthese der kodierten Proteine. Um die Kinetik der RNA-Degradation zu analysieren, wurde auf HeLa-Zellen zurückgegriffen, in denen das Tetrazyklin-regulierbare Expressionssystem von Gossen und Bujard [1992] vorliegt (s. Abb 3.1). Diese Zellen sind stabil mit einem Konstrukt transfiziert, das ein Tetrazyklin-sensitives Transaktivatorprotein unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV-Promotors exprimiert. Dieser Transaktivator kann an transfizierte Plasmide mit Tetrazyklin-regulierbaren Promotoren binden und ermöglicht somit die Transkription der nachgeschalteten cDNA. Bei Zugabe von Tetrazyklin oder seinem Derivat Doxycyclin erfährt der Transaktivator eine Konformationsänderung. Der Promotor kann nicht mehr gebunden werden und die Transkription wird spezifisch unterbunden.

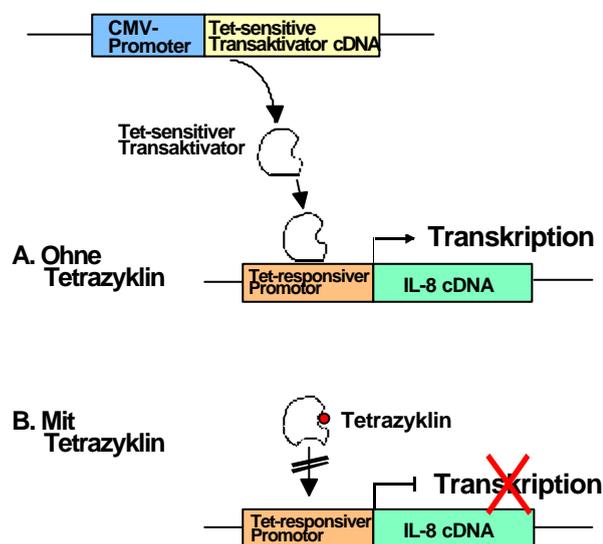


Abb. 3.1 Schema des Tetrazyklin-regulierten Expressionssystems nach Gossen und Bujard [1992] am Beispiel der IL-8 cDNA. (A) Der Tetrazyklin-sensitive Transaktivator bindet den Tetrazyklin-responsiven Promotor und ermöglicht die Transkription der IL-8 cDNA. (B) Durch Tetrazyklin erfährt der Transaktivator eine Konformationsänderung. Der Promotor kann nicht mehr gebunden werden, die Transkription ist inhibiert.

Der Vorteil dieses regulierbaren Systems gegenüber allgemeinen Transkriptioninhibitoren, wie z.B. Actinomycin D, liegt zum einen in der Selektivität. Dadurch ist gewährleistet, daß nicht die Transkription von Genen unterbunden wird, deren Proteine maßgeblich an der Degradation von mRNAs beteiligt sind. Zum anderen kann die Verteilung von RNA-bindenden Proteinen, wie z.B. HuR, zwischen Kern und Cytoplasma durch generelle Transkriptionshemmung mittels Actinomycin D stark verändert werden [Peng *et al.*, 1998]. Dies wird mit dem Tetrazyklin-regulierbaren Expressionssystem ebenfalls vermieden.

Anstelle der cDNAs von IL-8 und GM-CSF wurden in dieser Arbeit Reporterkonstrukte in die Zellen transfiziert (β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀; β -Globin-GM-CSF_{ARE}; s. Abb. 3.2). Konstruiert wurden diese aus einer genomischen Kaninchen β -Globin DNA, indem in ihre 3' UTR ein Teil der 3' UTR von IL-8 bzw das ARE von GM-CSF eingefügt wurde. Von der IL-8 cDNA wurde ein Fragment mit den Nukleotiden 972-1310 in das Reporterkonstrukt übertragen. Dieser Bereich umfaßt einige verstreute AUUUA Motive. Vier von ihnen befinden sich in der Region ab Basenposition 1050. Zwei von ihnen liegen dabei als gekoppelte Gruppe vor. Ein weiteres Motiv beginnt an der Position 1153. Sein genetisches Umfeld besitzt eine hohe Dichte an Adenin und Uracil. Das ARE von GM-CSF ist auf einen Bereich von 51 Nukleotiden eingrenzbar [Shaw und Kamen, 1986]. Dieser enthält acht mal das Pentanukleotid AUUUA, davon fünf in einer gekoppelten Gruppe.

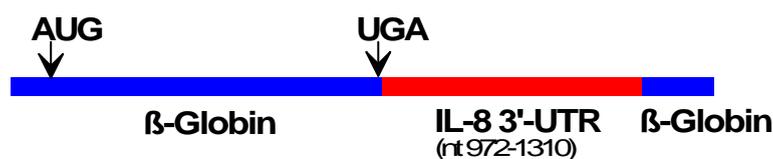


Abb. 3.2 Aufbau einer β -Globin Reporter-RNA am Beispiel von β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀. Sie besteht aus einer vollständigen β -Globin RNA, in deren 3' UTR die Nukleotide 972-1310 der IL-8 3' UTR inseriert sind.

Wie in Abb. 3.3 zu sehen ist, ist die β -Globin mRNA (A) über einen Zeitraum von 6 Stunden stabil, wohingegen die Hybrid-RNA mit der Insertion aus der 3' UTR von IL-8 (B) bereits nach 45 Minuten fast vollständig degradiert ist. Neben der Instabilität wurde mit der IL-8 3' UTR zusätzlich eine durch IL-1 induzierbare Stabilisierung

übertragen. Das Konstrukt ist nach IL-1 Stimulation über einen Zeitraum von einer Stunde voll nachweisbar.

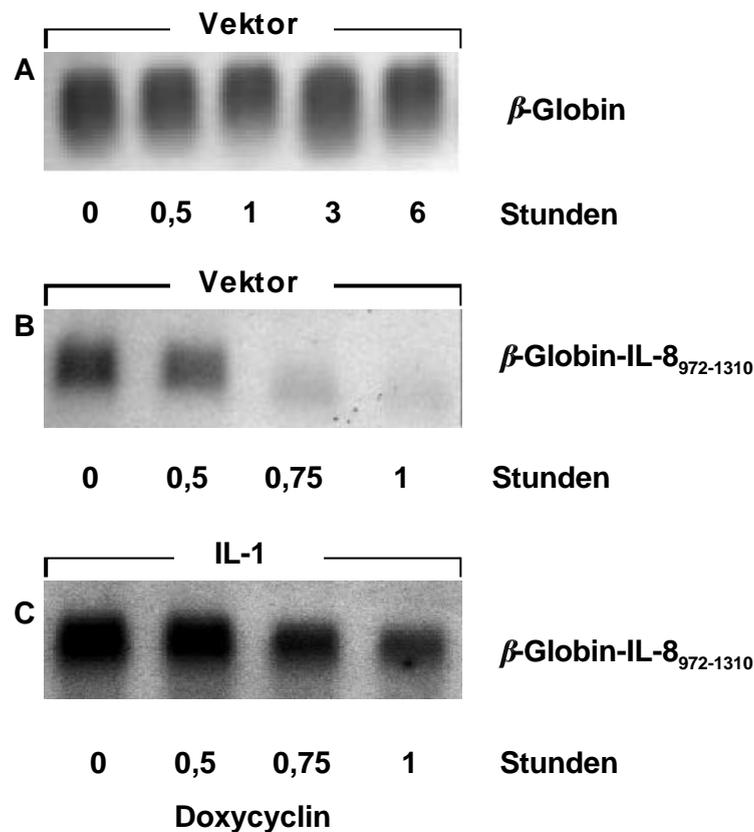


Abb. 3.3 Vergleich der Stabilität von β -Globin und β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀-RNA und Einfluß von IL-1. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden und Leervektor transfiziert. Am folgenden Tag wurde Doxycyclin (3 μ g/ml) für die angegebenen Zeiten zugegeben. Bei (C) erfolgte zusätzlich eine Stimulation mit IL-1 (20U/ml) zum Zeitpunkt null. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 μ g pro Spur) und mit einer β -Globin-RNA *antisense*-Sonde die β -Globin- bzw die β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀-RNA mittels Northern Blot Analysen nachgewiesen.

Als weiterer Stimulus, der zur Stabilisierung von kurzlebigen mRNAs führt, wird Ultraviolette Strahlung (UV) beschrieben [Blattner *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000]. Die Wirkung von UV auf den Abbau von β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ und β -Globin-GM-CSF_{ARE}, sowie auf die Degradation von anderen kurzlebigen mRNAs, und die dabei beteiligten Signalwege und Proteinfaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert.

3.1 Stabilität der β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀- und β -Globin-GM-CSF_{ARE}-RNAs in Abhängigkeit von Ultraviolettem Licht

3.1.1 Dosis-Wirkungseffekt von UV-Licht

Die Auswirkung von UV auf die Stabilität der mRNA wurde abhängig von der Bestrahlungszeit in sequentiellen Northern Blot Analysen (siehe 2.6) bestimmt. Die verwendete Strahlung gehört mit einer Wellenlänge von 312 nm zum UV-B Bereich. In der Abb. 3.4 ist die kurze Halbwertszeit der IL-8- bzw GM-CSF-Hybrid-RNA in unbehandelten Kontrollzellen sichtbar (A). Sie wurde in Abb. 3.5 quantifiziert und liegt etwa bei einer Stunde. Im Vergleich zu Abb. 3.3 existiert hier eine längere basale Halbwertszeit, die in den Versuchen zwischen 30 und 60 Minuten schwankt. Nach 5 und 10 Sekunden Bestrahlungszeit ist keine Veränderung der Degradationsrate sichtbar. Erst beim 30 Sekunden-Wert zeigt sich eine deutliche Verlängerung der Halbwertszeit beider Transkripte auf knapp 3 Stunden. Eine weitere Verringerung der mRNA-Degradationsrate ist nach 60 Sekunden UV-B-Bestrahlung auszumachen. Die Halbwertszeit liegt hier bei annähernd 5 Stunden.

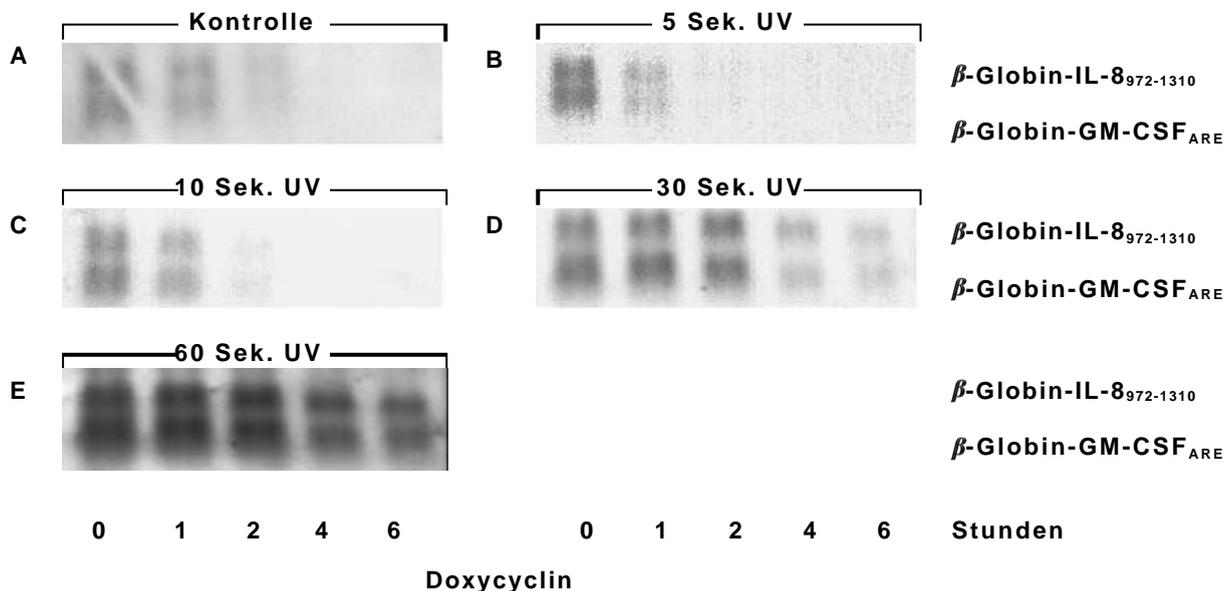


Abb. 3.4 Dosis-abhängige Stabilisierung von β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ und β -Globin-GM-CSF_{ARE} durch UV-B. Die Zellen wurden mit den beiden Reporterkonstrukten und Leervektor transfiziert. Die Kontrolle (A) blieb unbehandelt. Die anderen Kulturen wurden für die angegebene Zeit UV-bestrahlt (B-E) und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Doxycyclin (3 μ g/ml) für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 μ g pro Spur) und die Hybrid-RNAs wie bei Abb. 3.3 beschrieben nachgewiesen.

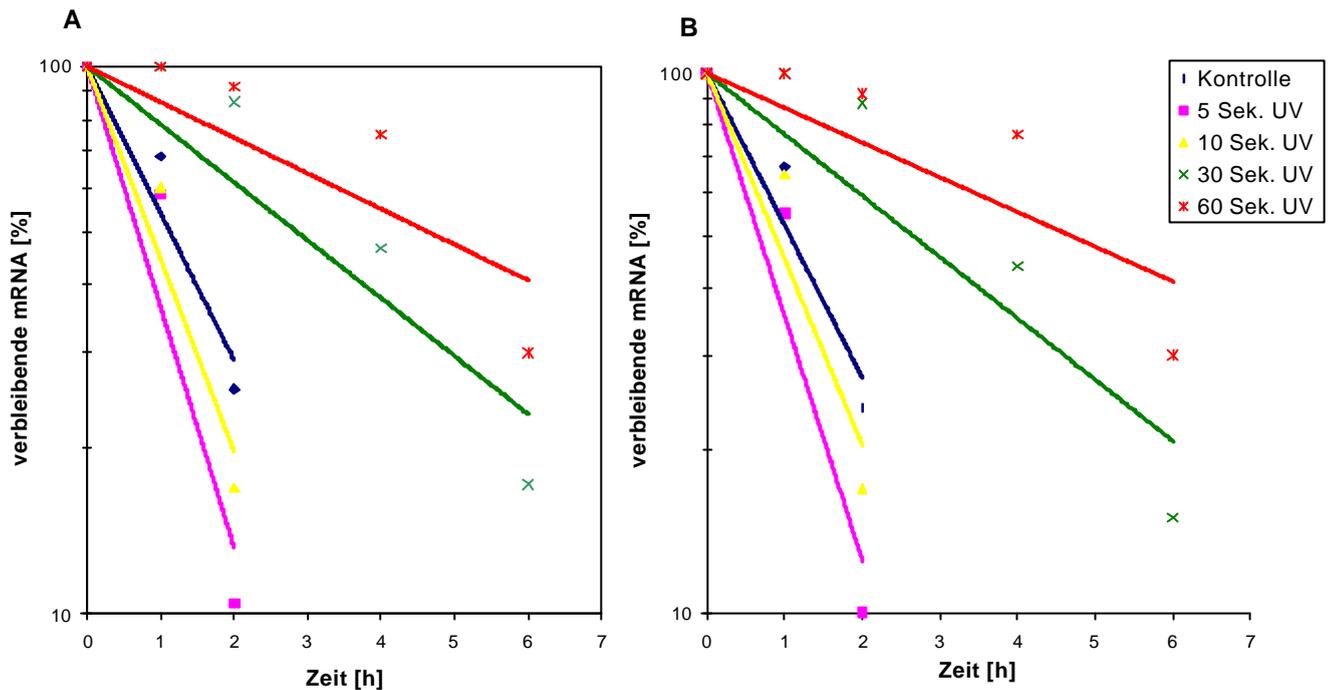


Abb. 3.5 Quantifizierung der RNA-Degradation. Es wurde eine Volumenanalyse der β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀- und β -Globin-GM-CSF_{ARE}-Banden mit dem Programm Molecular Analyst 1.4 der Firma BioRad durchgeführt. Die ermittelte mittlere OD wurde graphisch aufgetragen. (A) β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ (B) β -Globin-GM-CSF_{ARE}.

Da die Bestrahlungszeit von 60 Sekunden den stärksten Effekt gezeigt hatte und die mit der Bestrahlung einhergehende Apoptose-Rate nach dieser Zeit noch relativ gering war (s. Abb 3.15), wurden die Zellen im Verlaufe der Arbeit immer für 60 Sekunden bestrahlt.

3.1.2 Vergleich der Stabilisierung durch UV und MAP Kinase Kinase Kinasen

Die Bestrahlung von HeLa-Zellen mit UV führt zu einer Stabilisierung der Hybrid-RNAs mit den Insertionen IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ bzw GM-CSF_{ARE} (s. Abb. 3.4 und 3.5). UV ist in der Lage, die MAP Kinasewege ERK1/2, SAPK/JNK und p38, sowie NF κ B zu aktivieren [Englaro *et al.*, 1998; Derijard *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1989; Devary *et al.*, 1991]. Um zu analysieren, ob UV eine ähnlich starke Verlängerung der Halbwertszeit induziert, wie MAP Kinase Kinase Kinasen, wurde die Modulation der Degradationskinetik von UV der von zwei MAPKKK, MEKK-1 und

der *Transforming Growth Factor* β -Activated MAPKKK TAK-1, gegenübergestellt. MEKK-1 aktiviert NF- κ B [Lee *et al.*, 1997; Nemoto *et al.*, 1998], SAPK/JNK [Yan *et al.*, 1994; Yujiri *et al.*, 1998], ERK [Lange-Carter *et al.*, 1993; Yujiri *et al.*, 1998] und den p38 MAP Kinase Signalweg [Guan *et al.*, 1998]. In HeLa-Zellen wurde eine konstitutiv aktive Form (N-terminale Deletionsmutante), MEKK-1 Δ , exprimiert. TAK-1 wurde zuerst im Zusammenhang mit der TGF- β Signaltransduktion beschrieben [Yamaguchi *et al.*, 1995]. Sie aktiviert den NF- κ B-Weg [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999], ebenso SAPK/JNK [Shirakabe *et al.*, 1997] und p38 MAPK [Moriguchi *et al.*, 1996]. Ninomiya-Tsuji *et al.* [1999] konnten nachweisen, daß TAK1 die im IL-1 Signalweg rekrutierte MAPKKK darstellt. TAK1 benötigt für seine Aktivität einen Koaktivator, das TAK1 *binding protein* TAB1 [Shibuya *et al.*, 1996].

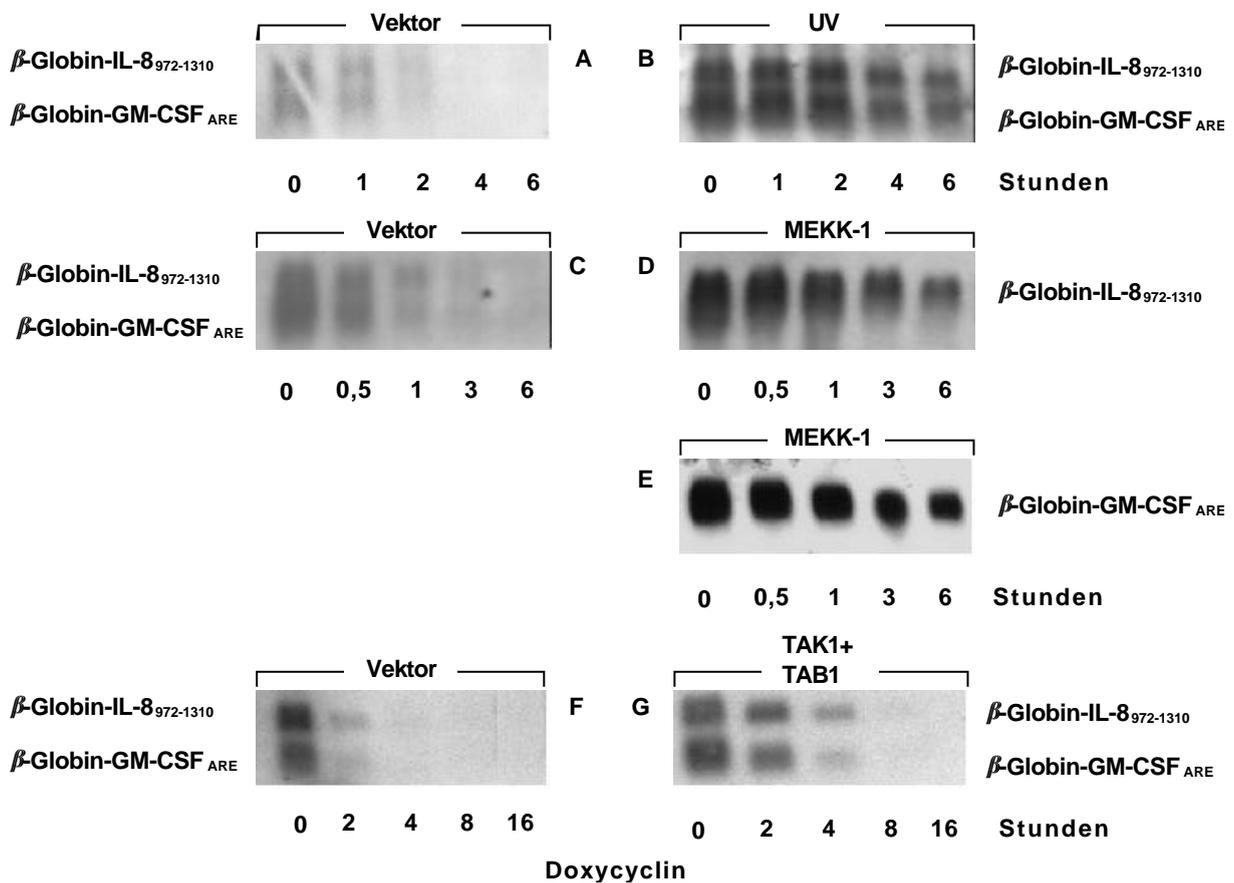


Abb. 3.6 Stabilisierung von β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ und β -Globin-GM-CSF_{ARE} durch UV und MAPKKK. Die Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden und Leervektor transfiziert. Die UV-Bestrahlung in (A) erfolgte für 60 Sekunden mit anschließender Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Doxycyclin (3 μ g/ml) wurde für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 μ g pro Spur) und die Hybrid-RNAs wie bei Abb. 3.3 beschrieben nachgewiesen.

In Abb. 3.6 ist noch einmal die schnelle Degradation der beiden Hybrid-RNAs (A, C, F) zu beobachten, ebenso die UV-induzierte Stabilisierung (B). Bei Koexpression von MEKK-1 Δ erfahren die beiden Transkripte ebenfalls eine starke Stabilisierung (D+E). Beide RNAs sind über 6 Stunden nachweisbar. Die in Abb. 3.7 A und B quantifizierte Halbwertszeit liegt bei knapp 3 Stunden. Die Hybrid-RNAs werden durch MEKK-1 nicht so lange stabilisiert wie durch UV; die Halbwertszeit liegt hier bei etwa 5 Stunden. Die Expression von der MAPKKK TAK1 (G) führt ebenfalls zu einer niedrigeren Degradationsrate. Die Halbwertszeit liegt bei knapp 2 Stunden. UV führt hier zur stärksten Abnahme der Degradationsrate. Der Effekt kann in seiner Stärke nicht durch Einsatz einzelner MAPKKK simuliert werden. Außerdem modulieren die beiden MAPKKK die Degradation der Hybrid-RNAs unterschiedlich stark.

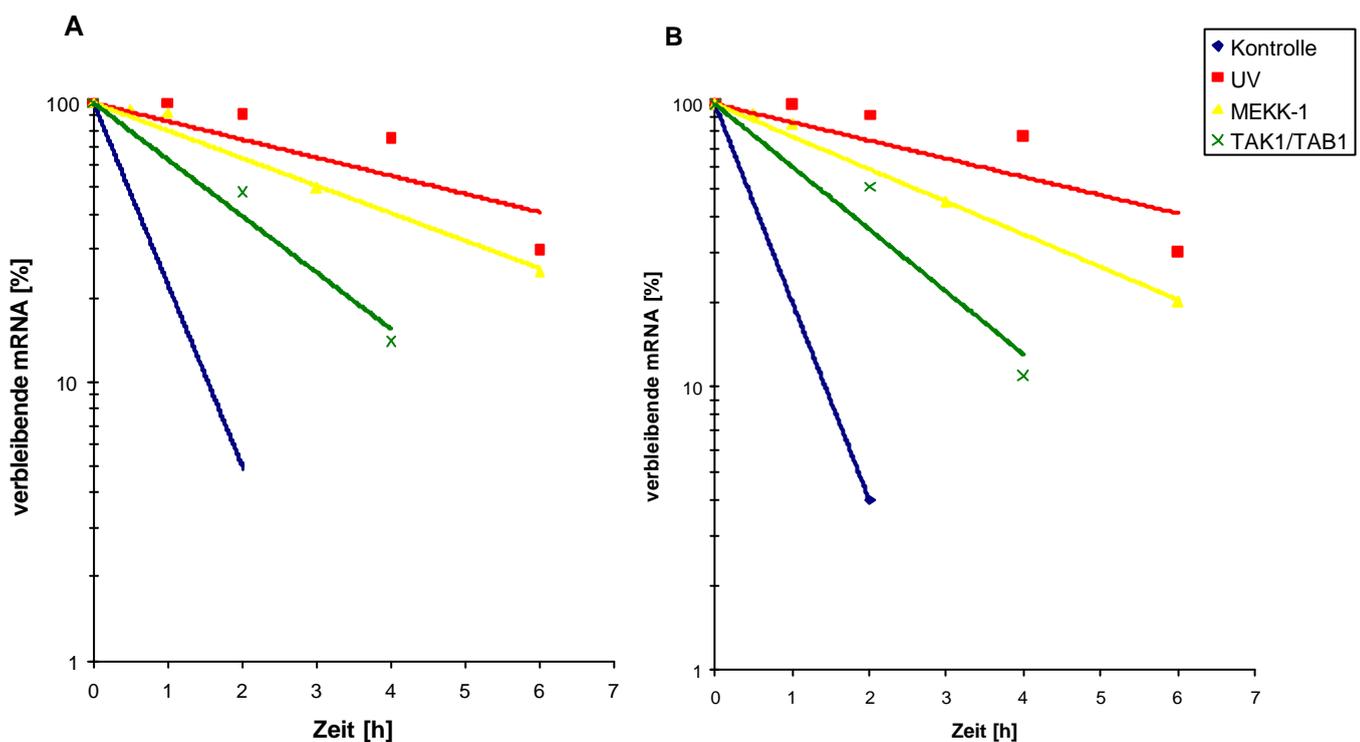


Abb. 3.7 Stärkere Stabilisierung der Hybrid-RNAs β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ und β -Globin-GM-CSF_{ARE} durch UV im Vergleich zu MAPKKK. Die Quantifizierung der Degradation wurde wie bei Abb. 3.5 beschrieben durchgeführt. (A) β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀. (B) β -Globin-GM-CSF_{ARE}.

3.1.3 Beteiligung des p38 MAP Kinasewegs an der UV-induzierten Stabilisierung

Winzen *et al.* [1999] konnten zeigen, daß die Stabilisierung von β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ und β -Globin-GM-CSF_{ARE} über den p38 MAP Kinaseweg und die nachgeschaltete MAP Kinase aktivierten Proteinkinase 2 (MAPKAP K2 oder MK2) [Stokoe *et al.*, 1992; Freshney *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994] vermittelt wird. MEKK-1 und TAK1 wirken über diesen Signalweg auf die Degradationsrate. Auch UV vermag p38 zu aktivieren [Englaro *et al.*, 1998]. Es stellte sich somit die Frage, ob UV über die gleichen Mechanismen wirkt wie die MAPKKK. Dazu wurden dominant-negative Formen der p38 MAP Kinase (p38_{AGF}) und von MK2 (MK2_{K76R}) in HeLa-Zellen transfiziert und diese anschließend UV-bestrahlt. Zur Kontrolle der inhibitorischen Wirkung von p38_{AGF} bzw. MK2_{K76R} wurden Zellen benutzt, in denen diese mit einer konstitutiv aktiven Form von MKK6 (MKK6_{2E}) kotransfiziert vorlagen. MKK6 ist ein spezifischer Aktivator des p38 Signalwegs [Raingeaud *et al.*, 1996].

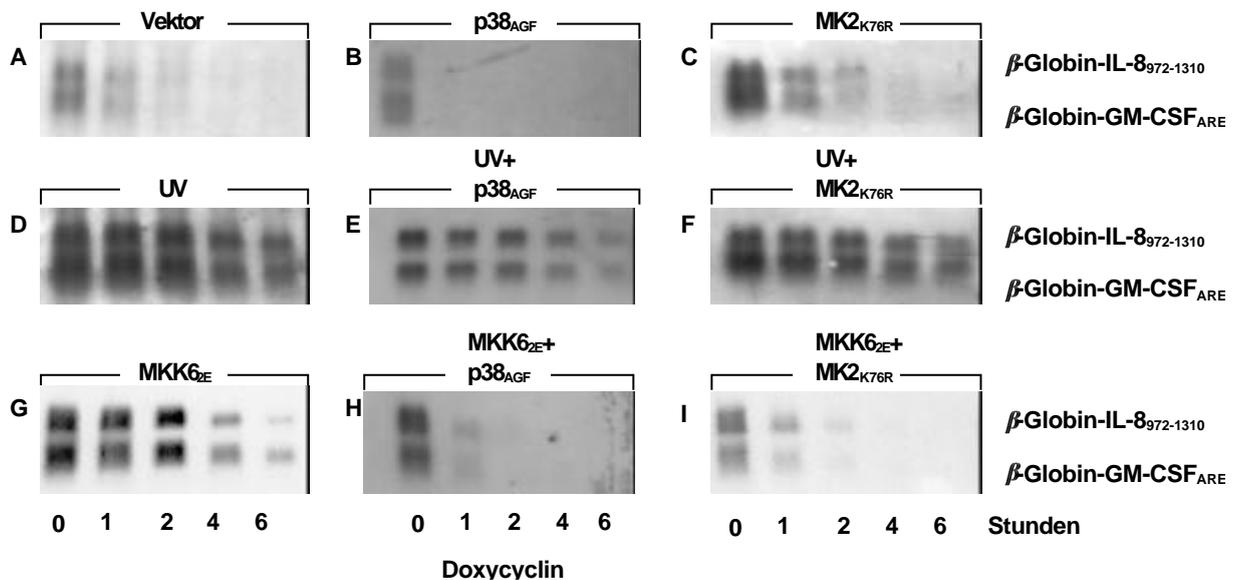


Abb. 3.8 Der p38 Kinaseweg ist an der UV-induzierten Stabilisierung von β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ und β -Globin-GM-CSF_{ARE} nicht beteiligt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden und Leervektor transfiziert. Die UV-Bestrahlung erfolgte -wo angegeben- für 60 Sekunden mit anschließender Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Doxycyclin (3 μ g/ml) wurde für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 μ g pro Spur) und die Hybrid-RNAs wie bei Abb. 3.3 beschrieben nachgewiesen.

In Abb. 3.8 ist zu sehen, daß die beiden dominant-negativen Formen von p38 (B) und MK2 (C) wie erwartet keine stabilisierende Wirkung auf die Hybrid-RNAs besitzen. Die konstitutiv aktive MAPKK MKK6 (G) bewirkt eine deutliche Stabilisierung der Transkripte. Diese Wirkung wird durch p38_{AGF} (H) effektiv gehemmt. Die Degradationskinetik zeigt eine ähnliche Halbwertszeit wie in der Kontrolle (A). Auch die dominant negative MK2 inhibiert den Effekt von MKK6. Auf die UV-induzierte Stabilisierung der Hybrid-RNAs zeigen p38_{AGF} (E) und MK2_{K76R} (F) keinerlei Wirkung. Die Transkripte zeigen die gleiche Degradationskinetik wie bei UV-bestrahlten Zellen ohne Koexpression von dominant-negativen Kinasen (D). Anders als das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 [Winzen *et al.*,1999] vermittelt UV seinen stabilisierenden Effekt auf die AU-reichen Hybrid-RNAs nach diesem Ergebnis nicht über den p38 Kinaseweg.

3.2 Transkriptspezifität der von UV und vom p38 MAP Kinaseweg induzierten Stabilität

UV und IL-1-rekrutierte MAP Kinasen wirken über verschiedene Signalwege oder Mechanismen auf die Stabilität von Hybrid-mRNAs mit Klasse II-AREs von IL-8 und GM-CSF. Daher stellte sich die Frage, welche Art von Transkripten durch den jeweiligen Mechanismus reguliert wird.

3.2.1 Stabilität der mRNA von Luziferase

Luziferase ist ein Enzym aus dem Nordamerikanischen Glühwürmchen *Photinus pyralis* (Insecta, Ordnung: Coleoptera). Es hat ein Molekulargewicht von 62 kDa und setzt die Substrate Luziferin, ATP und molekularen Sauerstoff proportional zu biolumineszenten Licht um.

DE Wet *et al.* [1987] beschrieben Luziferase als Reporter für eukaryotische Promotoraktivitäts-Analysen. Die mRNA besitzt keine AU-reichen Elemente. Das verwendete Luziferase-Konstrukt (pUHC13-3) wurde von Gossen und Bujard [1992] beschrieben. Mit der Verwendung von Luziferase im Stabilitätstest, sollten erste Erkenntnisse über die Transkriptselektivität der durch UV aktivierten Mechanismen und des p38 Kinasewegs gewonnen werden.

Als Aktivatoren wurden UV und die konstitutiv aktive Form von MKK6 (MKK6_{2E}), einem selektiven Aktivator des p38 MAP Kinasewegs, eingesetzt. In den mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen besitzt die Luziferase mRNA eine Halbwertszeit von 1 Stunde (s. Abb 3.9 (A+B) und 3.10). In den UV-bestrahlten Zellen (D) ist eine deutliche Stabilisierung des Transkripts zu beobachten. Die mRNA ist hier über 6 Stunden nachweisbar, mit einer Halbwertszeit von etwa 3 Stunden. MKK6 (C) zeigt keinen Effekt auf die Degradationsrate der Luziferase mRNA.

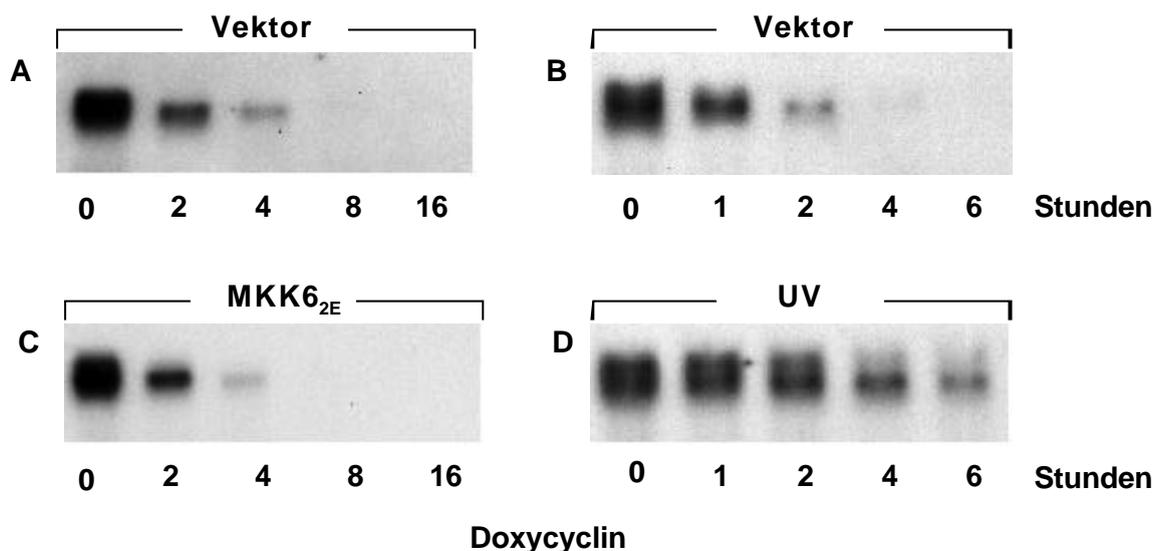


Abb. 3.9 Die Luziferase mRNA wird durch UV stabilisiert, durch MKK6 nicht. Die Zellen wurden mit den pUHC13-3 (Luziferase), den angegebenen Plasmiden und Leervektor transfiziert und wie angegeben behandelt. Die UV-Bestrahlung erfolgte für 60 Sekunden mit anschließender Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Doxycyclin (3 µg/ml) wurde für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 µg pro Spur) und die Hybrid-RNAs wie bei Abb. 3.3 beschrieben nachgewiesen.

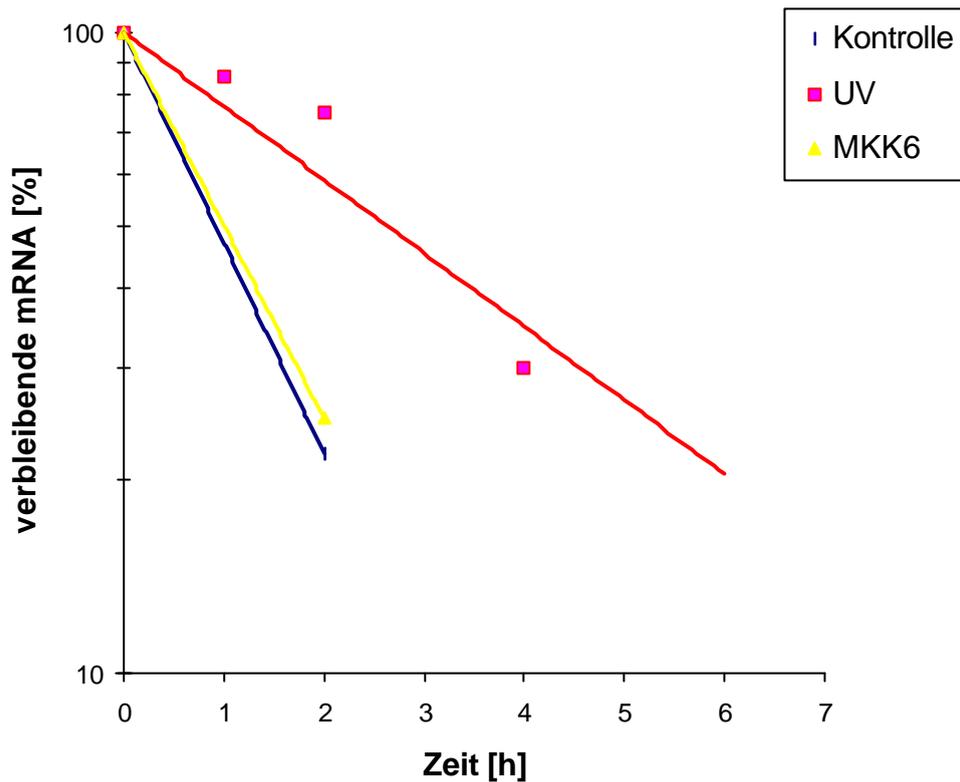


Abb. 3.10 Quantifizierung der Luziferase mRNA-Degradation. Die Quantifizierung wurde wie bei Abb. 3.5 beschrieben durchgeführt.

Auch die Luziferase mRNA zeigt unterschiedliche Degradationsraten in Abhängigkeit von externen Stimuli. Sie wird, obwohl aus der Klasse der Insecta stammend, in einem humanen Zellsystem durch UV-Strahlung stabilisiert. Im Unterschied zu den AU-reichen Hybrid-RNAs besitzt der p38 Kinaseweg hier keine stabilisierende Wirkung.

3.2.2 Stabilität der mRNA vom *green fluorescent protein* (GFP)

Die *green-fluorescent proteins* (GFP) sind eine einzigartige Klasse von Proteinen, die in die Biolumineszenz der Cnidaria (Nesseltiere) involviert sind. Sie dienen als Energie-Transfer Akzeptoren und erhalten, abhängig vom Organismus, ihre Energie von einem Luziferase-Oxyluziferin-Komplex oder einem Ca^{2+} -aktivierten Photoprotein. Das emittierte grüne Licht besitzt dieselbe Wellenlänge wie die emittierte Fluoreszenz des Proteins [Cody *et al.*, 1993]. Das hier verwendete GFP stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 27 kDa. Es absorbiert Strahlung bis zu einer maximalen Wellenlänge von 395 nm und emittiert grünes Licht bei 509 nm [Stearns, 1995].

Die mRNA wurde in einen Stabilitätstest eingesetzt, um einen weiteren Rückschluß auf die Substrat-Selektivität der verwendeten Aktivatoren ziehen zu können. Der Expressionsvektor pEGFP-C1 wurde von der Firma Clontech bezogen. Die damit exprimierte RNA besitzt keine AU-reichen Elemente in ihrer 3' UTR.

Als Aktivatoren wurden UV und MKK6 eingesetzt. Als Kontrolle dienen mit Leervektor transfizierte Zellen. Die GFP mRNA zeigt in der Kontrolle eine basal hohe Stabilität (s. Abb 3.11 (A)). Die Halbwertszeit liegt bei etwa 2,5 Stunden (s.a. Abb. 3.12). Nach UV-Induktion ist das Transkript über sechzehn Stunden nachweisbar (B). Die Halbwertszeit beträgt annähernd fünf Stunden. Die konstitutiv aktive Form von MKK6 führt nicht zu einer Modulation der Degradationsrate (C). Damit entspricht das Ergebnis dem mit Luziferase mRNA gezeigten, und weist auf eine unterschiedliche Transkriptselektivität beider Stabilisierungsmechanismen hin.

Um zu analysieren, ob weitere Kinasewege außer p38 eine stabilisierende Wirkung auf das GFP-Transkript haben, wurden zusätzlich MAPKKK als Aktivatoren in den Versuch eingesetzt. MEKK-1 aktiviert wie TAK1 mit seinem Koaktivator TAB1 die Kinasewege SAPK/JNK und ERK1/2, sowie $\text{NF}\kappa\text{B}$. TAK1/TAB1 vermittelt nach eigenen Ergebnissen [Holtmann *et al.*, 2000] die IL-1 induzierte Stabilisierung von mRNAs mit Klasse II-AREs. Beide MAPKKK zeigen keine Wirkung auf die Degradationsrate des GFP-Transkripts.

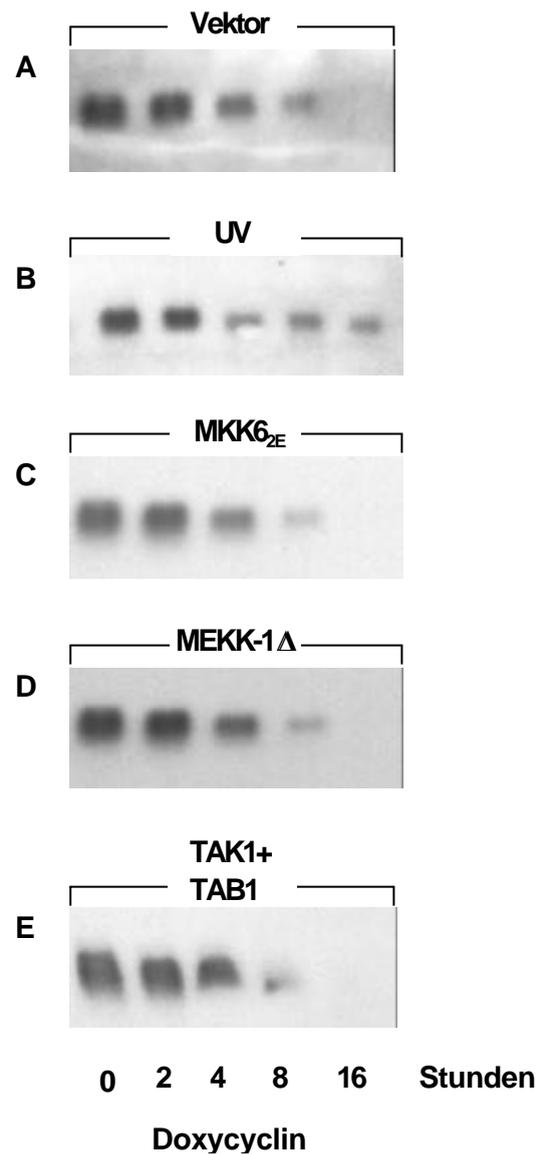


Abb. 3.11 Die GFP RNA wird durch UV stabilisiert, durch unterschiedliche MAP Kinasen nicht. Die Zellen wurden mit dem pEGFP-C1 Vektor, den angegebenen Plasmiden und Leervektor transfiziert und wie angegeben behandelt. Die UV-Bestrahlung erfolgte für 60 Sekunden mit anschließender Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Doxycyclin (3 $\mu\text{g/ml}$) wurde für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 μg pro Spur) und die Hybrid-RNAs wie bei Abb. 3.3 beschrieben nachgewiesen.

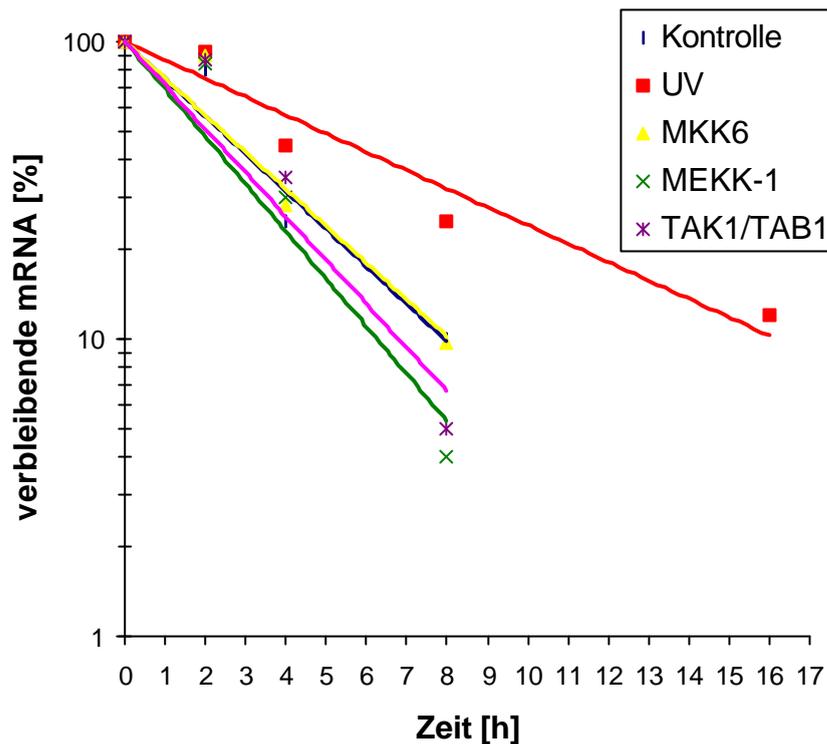


Abb. 3.12 Quantifizierung der GFP mRNA-Degradation. Die Quantifizierung wurde wie bei Abb. 3.5 beschrieben durchgeführt.

Das GFP Transkript erfährt ebenso wie Luziferase eine Modulation der Degradationsrate in Abhängigkeit von UV-Bestrahlung. Auch bei GFP handelt es sich um eine artfremde mRNA, die eine Regulation in humanen Zellen erfährt. Der p38 Kinaseweg wirkt auch hier nicht stabilisierend auf das Transkript.

Da die beiden MAPKKK MEKK-1 und TAK1 die Degradationsrate des GFP-Transkripts nicht beeinflussen, ist eine post-transkriptionelle Regulation von GFP durch die MAP Kinasewege JNK und ERK1/2, sowie $\text{NF}\kappa\text{B}$ unwahrscheinlich. Damit scheint UV seine Wirkung im Falle von GFP nicht über die Aktivierung von MAP-Kinasen oder $\text{NF}\kappa\text{B}$ zu vermitteln.

3.2.3 Stabilität der mRNA von *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1*

Monozytäre Zellen sind ein integraler Bestandteil der Immunantwort bei chronischen Entzündungen, die mit der Zerstörung von lokalem Gewebe assoziiert sind. Der Anteil der Monozyten an der Gewebszerstörung wird, zum Teil, ihrer Produktion an Matrix Metalloproteinasen (MMPs) zugeschrieben [Zhang *et al.*, 1998]. Die Induktion dieser proteolytischen Enzyme ist ein wichtiger Mechanismus bei der Migration monozytärer Zellen in Gewebe und Körperflüssigkeiten [Van Ranst *et al.*, 1991]. Ihre unregulierte Aktivität wurde mit einer Reihe von Krankheitsprozessen in Verbindung gebracht, darunter Arthritis, Metastase von Tumorzellen und Arteriosklerose. Ein entscheidender Regulationsmechanismus der MMP-Aktivität ist die Bindung an eine Familie homologer Proteine, der *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* TIMP1-4 [Brew *et al.*, 2000].

Das TIMP-1 Transkript besitzt eine kurze Halbwertszeit. Es wurde zudem über unterschiedliche Degradationsraten in U937 Zellen in Zusammenhang mit PMA-Behandlung berichtet [Doyle *et al.*, 1997]. Dennoch befinden sich keine AREs in der 3' UTR der TIMP-1 mRNA. Auch wegen seiner Bedeutung in inflammatorischen Prozessen sollte das TIMP-1 Transkript in RNA-Stabilitätstests untersucht werden. Das TIMP-1-Konstrukt wurde hergestellt, indem die Nukleotide 19-782 der TIMP-1 mRNA in den pUHD10 CAT-Vektor [Winzen *et al.*, 1999] mit *Bam*H1 inkloniert wurden.

Als Stimulatoren wurden UV und die konstitutiv aktiven Formen von MKK6, MEKK-1 und TAK1, letztere zusammen mit ihrem Koaktivator TAB1, eingesetzt. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen.

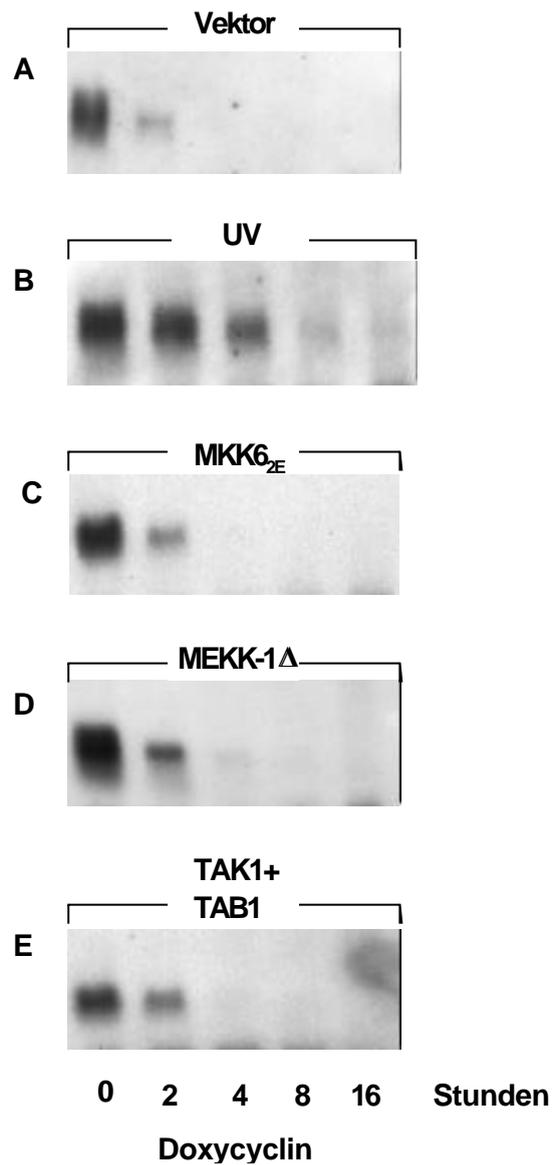


Abb. 3.13 UV stabilisiert im Gegensatz zu MAP Kinasekaskaden die mRNA von TIMP-1. Die Zellen wurden mit dem pUHD10CAT-TIMP-1 Vektor, den angegebenen Plasmiden und Leervektor transfiziert. Die UV-Bestrahlung in (B) erfolgte für 60 Sekunden mit anschließender Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Doxycyclin (3 µg/ml) wurde für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 µg pro Spur) und die Hybrid-RNAs wie bei Abb. 3.3 beschrieben nachgewiesen.

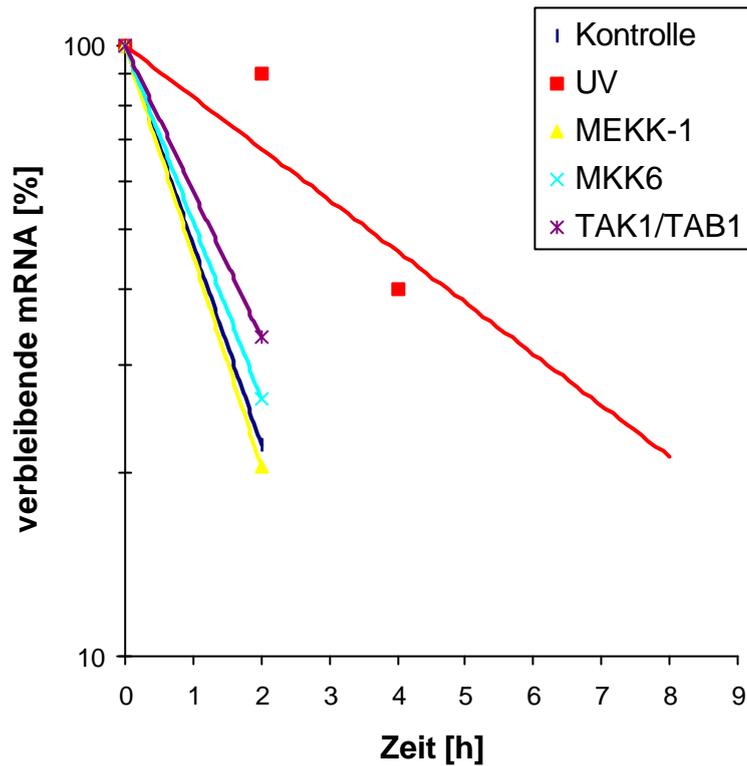


Abb. 3.14 Quantifizierung der TIMP-1 mRNA-Degradation. Die Quantifizierung wurde wie bei Abb. 3.5 beschrieben durchgeführt.

In Kontrollzellen besitzt die TIMP-1 mRNA eine kurze Halbwertszeit. Sie liegt bei etwa einer Stunde (s. Abb. 3.13 (A) und 3.14). In den UV-bestrahlten Zellen (B) ist eine Stabilisierung des Transkripts zu beobachten. Die Hälfte ist nach etwa 3,5 Stunden degradiert. Die mRNA ist über 16 Stunden nachweisbar. Bei Koexpression von MKK6 (C) ist keine Veränderung der Degradationsrate auszumachen. Die TIMP-1 mRNA wird wie in der Kontrolle sehr schnell degradiert. Auch die beiden MAPKKK MEKK-1 (D) und TAK1 (E) zeigen keinen Effekt.

UV als Streß-Stimulus wirkt auf andere Weise auf die mRNA-Stabilität als das pro-inflammatorische Zytokin IL-1. In inflammatorische Prozesse involvierte Proteine erfahren hier unterschiedlich kontrollierte post-transkriptionelle Regulationen. Auffällig ist auch, daß durch Koexpression von MEKK-1 der UV-Effekt nicht simuliert werden kann, also weder p38, noch SAPK/JNK, ERK1/2 oder $\text{NF}\kappa\text{B}$ an dieser Regulation beteiligt sind. Ebenso die im IL-1 Signalweg rekrutierte TAK1 zeigt keinen Effekt.

3.3 Beteiligung von Caspase-Signalwegen an der UV-induzierten Stabilisierung von mRNAs

Ultraviolettes Licht ist in der Lage in Zellen den programmierten Zelltod, Apoptose, zu induzieren [Chan *et al.*, 1999]. Bei diesem Prozess spielen Proteasen sowohl bei der Initiation, als auch bei der Exekution eine entscheidende Rolle. Eine der wichtigsten Protease-Familien sind dabei die Caspasen (Cystein-Aspartasen). Bei ihnen handelt es sich um evolutionär konservierte Proteasen, die hochspezifische, proteolytische Spaltungen von Proteinen in apoptotischen Zellen durchführen. Sie werden konstitutiv als inaktive pro-Formen in den meisten Zellen exprimiert. Ihre Aktivierung erfolgt autokatalytisch oder über Proteolyse durch übergeordnete Proteasen [Nicholson und Thornberry, 1997; Shearwin-Whyatt und Kumar, 1999; Earnshaw *et al.*, 1999; Mack *et al.*, 2000; Nicotera, 2000]. Substrate der Caspasen sind neben Inhibitoren der untergeordneten Caspasen intrazelluläre Peptide, Proteine des Zytoskeletts, nukleäre Strukturproteine und Enzyme, Komponenten der DNA-Reparatur-Maschinerie und eine Reihe von Protein Kinasen [Nicholson und Thornberry, 1997; Earnshaw *et al.*, 1999]. Zudem initiieren sie durch Proteolyse von DNase-Inhibitoren, wie z.B. den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (CAD), die Spaltung der DNA [Nagata, 2000].

Da die UV-induzierte Stabilisierung der Luziferase-, GFP- und TIMP-1-RNA nicht durch MAP Kinasen zu simulieren war, und in einem Teil der HeLa-Zellen durch UV-Bestrahlung Apoptose induziert wurde, sollte analysiert werden, ob möglicherweise Caspase-Signalwege an dieser RNA-Stabilisierung beteiligt sind. Die Überlegung ist, daß destabilisierende, *trans*-regulierende Proteine oder RNasen durch Caspasen gespalten werden, und damit die Stabilisierung der Transkripte einhergeht. Chan *et al.* [1999] konnten UV-induzierte Apoptose in Madin-Darby Canine Nieren-Zellen durch den Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk effektiv hemmen. Dies ist ein Breitband-wirkender Caspase-Inhibitor, der Caspase-1-ähnliche und Caspase-3-ähnliche Proteasen hemmt [Dodel *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000].

Um die Wirkung von ZVAD-fmk in HeLa-Zellen zu testen wurde der Inhibitor in einer Endkonzentration von 100 μM zu den Zellen gegeben, diese dann 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 60 Sekunden UV-bestrahlt. 7 Stunden später wurden die Zellen mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt (s. 2.2.5). Dieser Farbstoff bindet verstärkt die während der Apoptose kondensierte DNA. Die Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop auf apoptotischen Phänotyp untersucht und fotografiert. In Abb 3.15 sind zum einen lichtmikroskopische Aufnahmen mit zusätzlicher Fluoreszenz (A,C,E), zum anderen Fluoreszenz-Bilder (B, D, F) dargestellt. Die unbehandelten Zellen zeigen die normale Morphologie, sie sind langgestreckt, nur einzelne abgerundet (A). Bei der Fluoreszenz-Aufnahme der Kontrollzellen ist keine fragmentierte DNA detektierbar. Bei den UV-bestrahlten Zellen sind viele abgerundete, tote Zellen sichtbar (C, s. Pfeil). Es ist auch hier schon die Fluoreszenz des Farbstoffs Hoechst 33258 erkennbar, noch besser allerdings auf dem Fluoreszenz-Bild (D, s. Pfeil). Zellen, die vor der UV-Bestrahlung mit ZVAD-fmk behandelt wurden, besitzen eine deutlich geringere Apoptoserate. Es sind nur wenige abgerundet (E) und es ist kaum kondensierte DNA detektierbar (F).

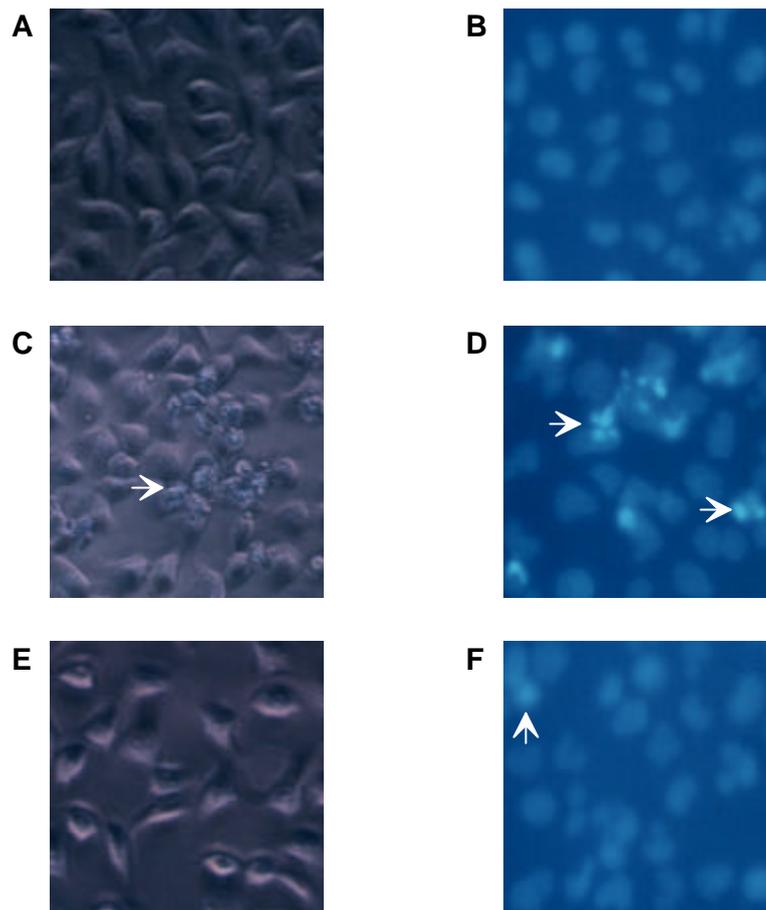


Abb. 3.15 UV-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen und Wirkung des Caspase-Inhibitors ZVAD-fmk. Die Zellen wurden 60 Sekunden bei 312 nm UV-bestrahlt und 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie wie unter 2.2.5 beschrieben mit Hoechst 33258 eingefärbt und unter dem Licht-Mikroskop fotografiert. (A,C,E) Morphologische Aufnahmen. (B,D,F) Fluoreszenzaufnahmen. (A+B) Unbehandelte Zellen. (C+D) UV-bestrahlte Zellen. (E+F) Zu den Zellen wurde 30 Minuten vor der UV-Bestrahlung 100 μ M ZVAD-fmk gegeben.

ZVAD-fmk inhibiert demnach in HeLa-Zellen UV-induzierte Apoptose. Um zu testen, ob Caspase-Signalwege in die UV-induzierte Stabilisierung von mRNA involviert sind, wurden HeLa-Zellen mit BBB IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ transfiziert und die RNA-Stabilität in Abhängigkeit von UV und UV+ZVAD-fmk in sequentiellen Northern Blot Analysen bestimmt (s. 2.6). In Abb. 3.16 ist die gewohnt schnelle Degradation von IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ in Leervektor-transfizierten Zellen (A) zu beobachten. Die Halbwertszeit des Transkripts liegt hier bei etwa einer Stunde, ebenso wie bei den mit ZVAD-fmk behandelten Zellen (B). ZVAD-fmk hat also allein keinen Effekt auf die RNA-Degradationsrate. In den UV-bestrahlten Zellen (C) wird die Hybrid-RNA erwartungsgemäß stabilisiert. Die

Halbwertszeit ist gegenüber der Kontrolle deutlich verlängert. Sie liegt bei etwas über 4 Stunden. In den UV-bestrahlten Zellen, die zuvor mit ZVAD-fmk inkubiert wurden (D), ist das Transkript ebenfalls stabil. Zudem ist nach 6 Stunden eine höhere RNA-Menge detektierbar als in den UV-bestrahlten Zellen. Caspase-1- oder Caspase-3-ähnlichen Proteasen sind scheinbar nicht an der UV-induzierten Transkript-Stabilisierung beteiligt. Ob eine Hemmung der Caspasen tatsächlich die Stabilisierung verstärkt, müsste in weiteren Versuchen überprüft werden.

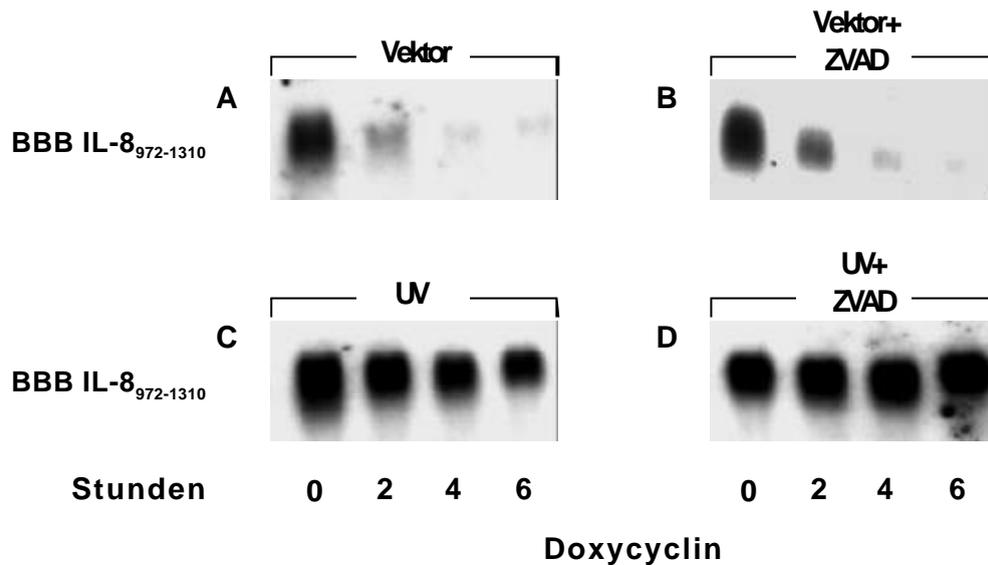


Abb. 3.16 Die UV-induzierte Stabilisierung von BBB IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ ist nicht durch ZVAD-fmk hemmbar. Die Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden und Leervektor transfiziert und wie angegeben behandelt. ZVAD-fmk wurde in einer Endkonzentration von 100 μ M zugegeben und die Zellen 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte ggf. die UV-Bestrahlung (60 Sekunden, 312 nm) mit anschließender Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Doxycyclin (3 μ g/ml) wurde für die angegebenen Zeiten zugegeben. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (10 μ g pro Spur) und die Hybrid-RNAs wie bei Abb. 3.3 beschrieben nachgewiesen.

3.4 Komplexbildung von AU-reichen Regionen mit zytosolischen Proteinen aus HeLa-Zellen

Die Stabilität von Zytokin-mRNAs hängt von der Interaktion *trans*-regulierender Proteine mit den *cis*-Elementen der Transkripte ab. Um regulatorische Proteine zu identifizieren, die die AREs in der 3' UTR von IL-8 und GM-CSF binden, wurden Gel-Retardationstests (s. 2.5) durchgeführt. Einige RNA-bindende Proteine, wie HuR, AUF-1 und hnRNP A1 wechseln zwischen Zellkern und Zytosol [Fan und Steitz, 1998a; Fan und Steitz, 1998b; Houven van Oordt *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Arao *et al.*, 2000]. Es wird angenommen, daß die auf mRNAs stabilisierend wirkenden Proteine die Transkripte im Kern binden, und dann zusammen in das Zytoplasma transportiert werden [Fan und Steitz, 1998a]. Daher wurden zytosolische Proteine extrahiert (s. 2.3.1) und in die Gel-Retardationstests eingesetzt (s. 2.5).

In die Gel-Retardationstests wurden Fragmente der IL-8-RNA (Nukleotide 1039-1200) und der GM-CSF-RNA (53 Nukleotid-ARE) eingesetzt.

In Abb. 3.17 A ist zu sehen, daß GM-CSF_{ARE}-RNA mit zytosolischen Proteinen aus HeLa-Zellen Komplexe bildet. Das starke Signal der freien, nicht mit Zytosol inkubierten RNA (Spur 1) schwächt sich bei Inkubation mit Zytosol aus unbehandelten HeLa-Zellen (Spur 2) ab. Es sind mehrere RNA-Protein-Komplexe unterschiedlicher gelelektrophoretischer Mobilität zu erkennen (Komplexe U,V und Komplexgruppe W). Bei Inkubation mit Zytosol aus UV-bestrahlten Zellen (Spur 3) besitzen die beiden Komplexe U und V eine höhere Intensität als in unbehandelten Zellen. Die Komplexgruppe W wird von UV kaum beeinflußt.

Auch die IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀-RNA bildet Komplexe bei Inkubation mit zytosolischen Proteinen (s. Abb 3.17 B). Hier sind die Komplexe Y und Z bei Inkubation mit Zytosol aus UV-bestrahlten Zellen (Spur 3) stärker ausgeprägt als bei Zytosol aus unbehandelten Zellen (Spur 2).

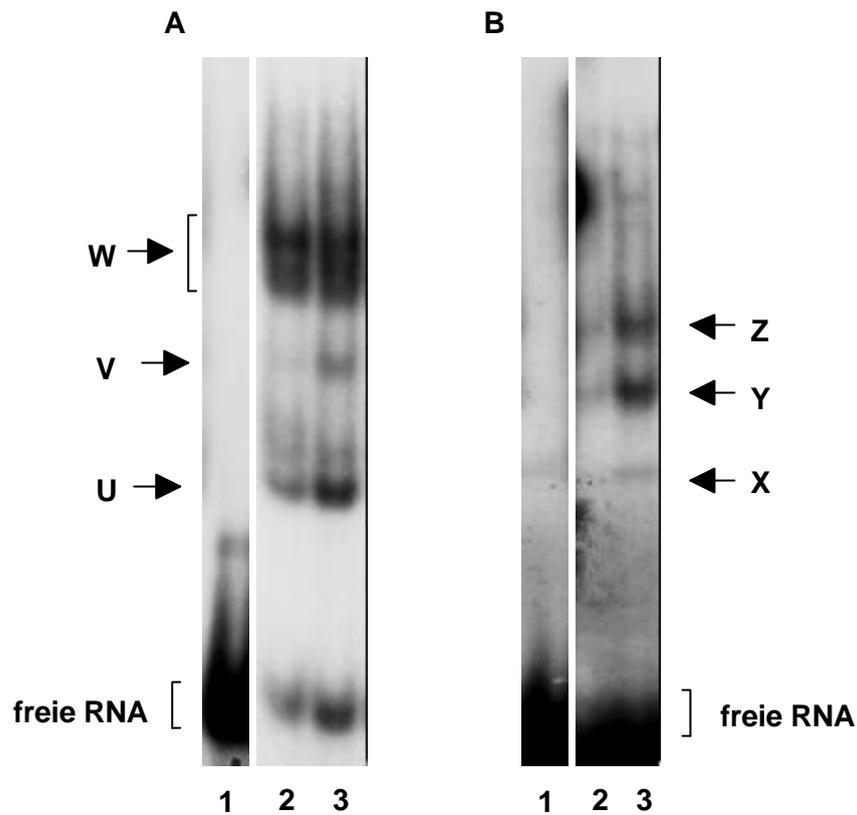


Abb 3.17 GM-CSF_{ARE} und IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ bilden Komplexe mit zytosolischen Proteinen aus HeLa-Zellen. (A) Jeweils 2×10^5 cpm α -³²P-UTP *in vitro* markierte GM-CSF_{ARE}-RNA (s. 2.4.5) wurden pro Ansatz ohne (1), oder mit 10 μ g Zytosol aus unbehandelten Zellen (2) bzw aus UV-bestrahlten Zellen (3) für 10 Minuten bei 30°C inkubiert (s. 2.5). Die RNA wurde anschließend für 30 Minuten bei 37°C mit 30 U RNase T1 verdaut und die Probe in einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. (B) Spuren 1, 2 und 3 wie bei A, jedoch mit IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀-RNA.

3.4.1 Identifizierung komplexbildender Proteine

Zur Identifizierung von Komplex-bildenden Proteinen wurden spezifische Antikörper gegen bereits bekannte RNA-bindende Proteine, wie z.B. HuR, AUF-1 (hnRNP D0) und hnRNP A1 in den Gel-Retardationstest eingesetzt. Die Zugabe des Antikörpers erfolgte vor dem Gellauf (s. 2.5). Bindet ein Antikörper ein Protein, das im Gel einen Komplex mit der RNA bildet, vergrößert sich die molekulare Masse des Komplexes. Die bisherige Komplex-Bande wird in ihrer Intensität schwächer, zudem taucht ein neuer Komplex mit geringerer elektrophoretische Mobilität auf. Man spricht hier von einem sogenannten *supershift*.

In Abb. 3.18 A ist noch einmal die Bildung der drei Komplexe U, V und W mit GM-CSF_{ARE} in UV-bestrahlten Zellen sichtbar (Spur 1). In Spur 2 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das RNA-bindende Protein HuR eingesetzt. Es ist deutlich zu sehen, daß die beiden Komplexe U und V in ihrer Intensität gegenüber Spur 1 abnehmen. Außerdem sind zwei neue Komplexe mit höherem Molekulargewicht erkennbar (S1 und S2). Hier liegt ein *supershift* vor, d.h. HuR ist an diesen beiden Komplexen beteiligt. Die Komplexgruppe W erfährt durch den Anti-HuR Antikörper keine Veränderung. In Spur 3 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen AUF1 eingesetzt und in Spur 4 ein monoklonaler Anti-hnRNP A1 Antikörper. In den letzten beiden Spuren ist keine Veränderung der Komplexe U und V sichtbar. Allerdings erfährt der untere Teil der Komplexgruppe W durch den Anti-AUF1 Antikörper einen *supershift*. Es entsteht auch hier ein neuer Komplex mit niedriger elektrophoretischer Mobilität (S3). AUF1 ist demnach an einem Teil der Komplexgruppe W beteiligt.

In Abb. 3.18 B ist die Bildung von Komplexen zytosolischer Proteine UV-bestrahlter Zellen mit der IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ sichtbar (Spur 1). In Spur 2 wurde ebenfalls ein Anti-HuR Antikörper eingesetzt. Die beiden Komplexe Y und Z nehmen deutlich an Intensität ab, und es ist ein neuer Komplex mit geringer elektrophoretischer Beweglichkeit detektierbar (S4). Auffällig ist, daß kein zweiter Komplex nachweisbar ist, der einen *supershift* erfahren hat. Möglicherweise dissoziiert einer der beiden Komplexe Y und Z durch Bindung des Antikörpers. HuR ist auch an Komplexen mit der IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ beteiligt. Komplex X wird durch den Anti-HuR Antikörper nicht verändert. Bei Einsatz von einem Anti-AUF1 Antikörper in Spur 3 ist eine leichte Abnahme der Intensität der Komplexe Y und Z. Ein *supershift* konnte allerdings nicht

detektiert werden. In Anbetracht eines nachgewiesenen *supershift*-Komplexes mit GM-CSF_{ARE} könnte die niedrigere Intensität der Komplexe Y und Z auf geringere Auftragsmengen zurückzuführen sein, anstatt auf einen *supershift* mit nicht detektierbarem hochmolekularem Komplex. Dies müßte durch weitere Versuche geklärt werden.

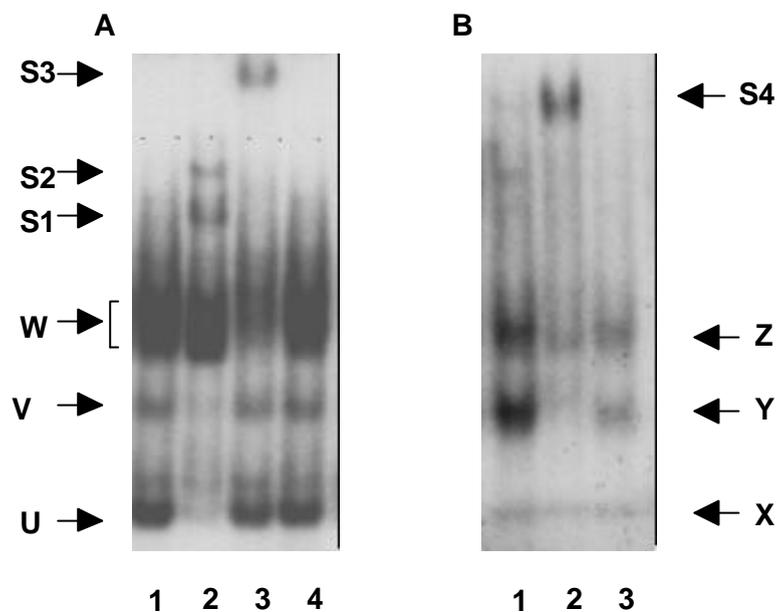
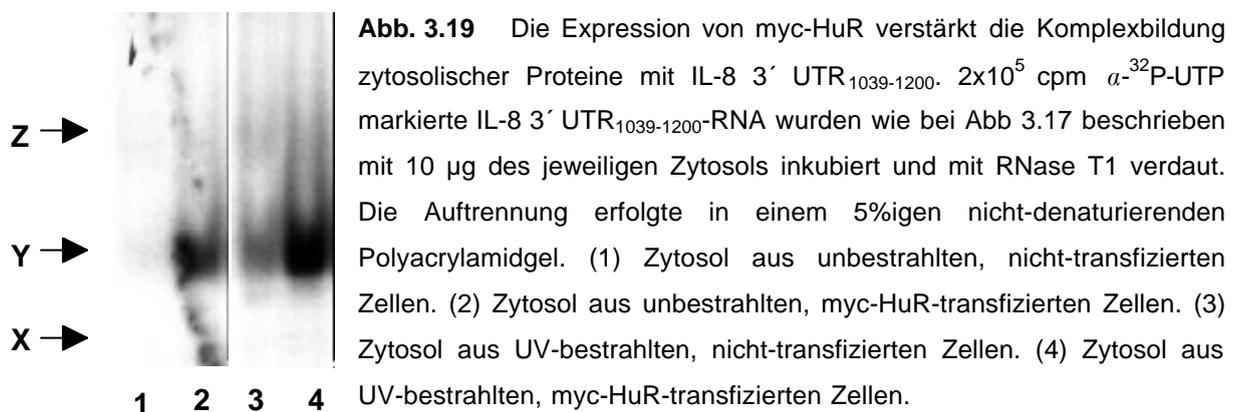


Abb 3.18 HuR ist ein Bestandteil der Komplexe zwischen zytosolischen Proteinen und GM-CSF_{ARE} bzw. IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀. **(A)** 2×10^5 cpm α -³²P-UTP markierte GM-CSF_{ARE}-RNA wurden wie bei Abb 3.17 beschrieben mit 10 μ g Zytosol aus UV-bestrahlten Zellen inkubiert. Nach 20 Minuten Verdau mit RNase T1 wurden die entsprechenden Antikörper zugegeben und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. (1) kein Antikörper-Zusatz. (2) Zusatz von Anti-HuR Antikörper. (3) Zusatz von Anti-AUF-1 Antikörper. (4) Zusatz von Anti-hnRNP A1 Antikörper. **(B)** Spuren 1,2 und 3 wie bei A, jedoch mit α -³²P-UTP markierter IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ anstelle von GM-CSF_{ARE}.

Um das Ergebnis aus dem *supershift* zu verifizieren, wurden zusätzlich zytosolische Proteine aus HeLa-Zellen extrahiert, die zuvor mit einem Tetrazyklin-regulierbaren Expressionsvektor für ein myc-Epitop markiertes HuR (myc-HuR) transfiziert wurden. In Abb. 3.19 ist zu sehen, daß die mit der IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ gebildeten Komplexe Y und Z bei Einsatz von Zytosol aus mit myc-HuR transfizierten Zellen (Spur 2) eine wesentlich stärkere Intensität aufweisen, als bei Verwendung von Zytosol aus Zellen ohne myc-HuR Transfektion (Spur 1). Die Überexpression von myc-HuR führt also

bereits zu einer Zunahme der HuR-haltigen Komplexe. Der schwach ausgeprägte Komplex X wird von myc-HuR nicht beeinflusst. Die Inkubation von der IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ mit Zytosol myc-HuR transfizierten Zellen, die zusätzlich mit UV bestrahlt wurden, führt zu einer noch stärkeren Ausprägung der beiden Komplexe Y und Z, insbesondere des Komplexes Y (Spur 4). Die Verwendung von Zytosol aus myc-HuR transfizierten, unbestrahlten Zellen führt zu einer stärkeren Intensität der beiden Komplexe, als die Benutzung von Zytosol aus UV-bestrahlten, nicht mit myc-HuR transfizierten Zellen (Spur 3).



Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, daß HuR an jeweils zwei Komplexen mit GM-CSF_{ARE} und der IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ beteiligt ist. Die Ausprägung dieser Komplexe verstärkt sich signifikant durch den Einfluß von UV.

In den folgenden Versuchen wurde immer Zytosol aus myc-HuR transfizierten Zellen verwendet, da hiermit die Bindung von HuR an die RNAs deutlicher detektierbar ist.

3.4.2 Einfluß des p38 MAP-Kinasewegs auf die Komplexbildung

Da HuR bereits von Peng *et al.* [1998] als stabilisierend wirkendes Protein für Hybrid-RNAs mit *c-fos* ARE beschrieben wurde und auch GM-CSF und IL-8 bindet, sollte untersucht werden, ob HuR möglicherweise ein regulatorisches Zielprotein des p38 MAP-Kinasewegs darstellt. Dazu wurden zytosolische Extrakte von HeLa-Zellen gewonnen, die zuvor mit Expressionsvektoren für myc-HuR, sowie konstitutiv aktiven Formen der Kinasen MKK6 (MKK6_{2E}), MK2 (MK2_{2E}) bzw MEKK-1 (MEKK-1 Δ) transfiziert wurden. Zusätzlich wurden Zytosole aus Zellen hergestellt, die dominant-

negative Formen von p38 (p38_{AGF}) und MK2 (MK2_{K76R}) exprimieren. Damit sollte analysiert werden, ob diese möglicherweise die durch UV induzierte, vermehrte Translokation von HuR ins Zytoplasma (s. Seite 56) und die damit einhergehende erhöhte Bindung an die eingesetzten RNAs unterbinden.

In Abb. 3.20 A ist zu sehen, daß Lysat aus Zellen mit einer konstitutiv aktiven Form von MEKK-1 (Spur 1) zu einer stärkeren Ausprägung des Komplexes V mit GM-CSF_{ARE} führt, als Lysat aus Leervektor transfizierten Zellen (Spur 4). Der durch UV ebenfalls in seiner Intensität verstärkte Komplex U (s. Spur 5-8) ist von dem MEKK-1 Effekt kaum betroffen. Die beiden konstitutiv aktiven Kinasen MKK6_{2E} (Spur 2) und MK2_{2E} (Spur 3) zeigen keine Wirkung. Die durch MEKK-1 induzierte erhöhte Bindung von HuR kann durch zusätzliche UV-Bestrahlung noch weiter verstärkt werden (Spur 5). Dabei fällt auf, daß hier ein additiver Effekt von MEKK-1 und UV existiert, der aber nur den Komplex V tangiert (vgl. Spur 5 und 8). Die Kombinationen von MKK6_{2E} und UV (Spur 6) bzw. MK2_{2E} und UV (Spur 7) zeigen keinen Unterschied in der Komplexintensität zu dem Zytosol aus Leervektor-transfizierten, UV-bestrahlten Zellen (Spur 8).

Abb. 3.20 B zeigt die Bildung von Komplexen zwischen der IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ und den oben erwähnten Zytosolen. In Spur 1 ist eine ganz schwache Zunahme der beiden Komplexe Y und Z bei Inkubation der RNA mit dem MEKK-1 Δ -enthaltenem Zytosol im Vergleich zu Zytosol aus untransfizierten Zellen (Spur 4) zu sehen. Die Zytosole mit den konstitutiv aktiven Formen von MKK6 und MK2 zeigen auch hier keinen Effekt auf die Komplexintensität. In Spur 5 ist erkennbar, daß UV und MEKK-1 eine additive Wirkung auf die Komplexstärke von Y und Z besitzen (vgl. Spur 8). Auch hier liegt keine zusätzliche Wirkung von MKK6_{2E} (Spur 6) bzw. MK2_{2E} auf die UV-induzierte Zunahme (Spur 7) vor.

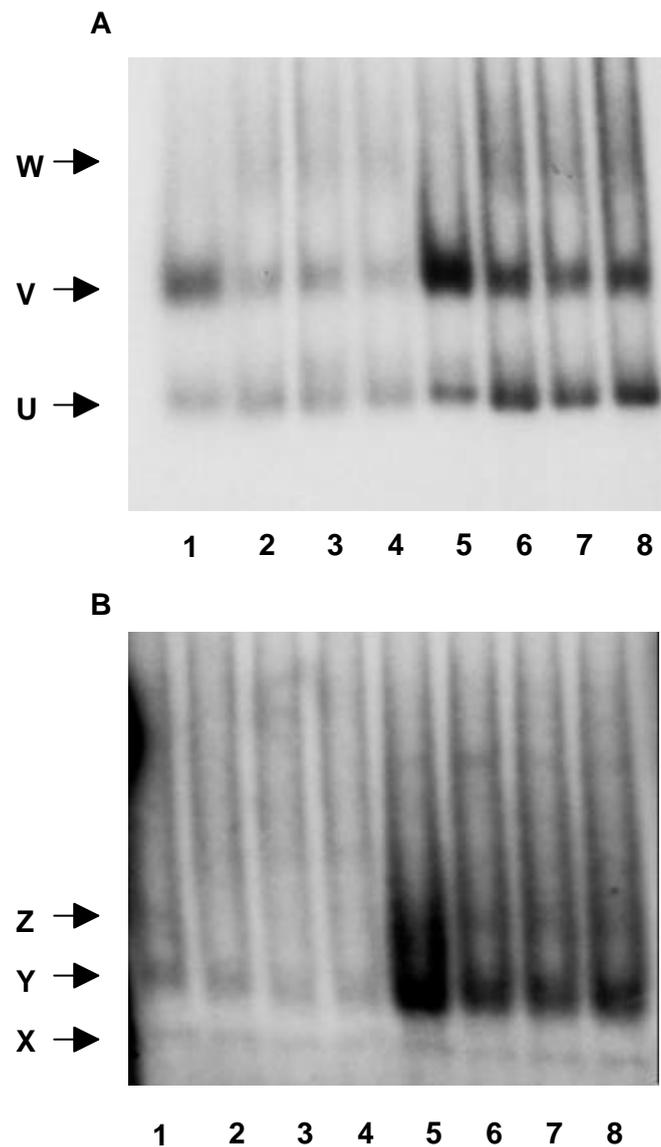


Abb. 3.20 MEKK-1 Δ induziert eine verstärkte Komplexbildung zwischen zytosolischen Proteinen und GM-CSF_{ARE} bzw. IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀. **(A)** 2×10^5 cpm α -³²P-UTP markierte GM-CSF_{ARE}-RNA wurden wie bei Abb. 3.17 beschrieben mit 10 μ g des jeweiligen Zytosols inkubiert und RNase T1 verdaut. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. (1) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und MEKK-1 Δ transfizierten Zellen. (2) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und MKK6_{2E} transfizierten Zellen. (3) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und MK2_{2E} transfizierten Zellen. (4) Zytosol aus unbestrahlten, Leervektor-transfizierten Zellen. (5) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und MEKK-1 Δ transfizierten Zellen. (6) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und MKK6_{2E} transfizierten Zellen. (7) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und MK2_{2E} transfizierten Zellen. (8) Zytosol aus UV-bestrahlten, Leervektor-transfizierten Zellen. **(B)** Wie A, jedoch mit α -³²P-UTP markierter IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀-RNA, anstelle von GM-CSF_{ARE}.

Bei Verwendung von Zytosolen aus unbestrahlten Zellen, die mit einer dominant-negativen Form von p38 transfiziert sind (s. Abb. 3.21 A; Spur 3), zeigte sich keine Veränderung der Komplexintensität mit GM-CSF_{ARE} gegenüber Zytosolen aus nicht p38_{AGF}-transfizierten, unbestrahlten Zellen (Spur 1). Auch die stärkere Komplexbildung nach UV-Bestrahlung (Spur 2) blieb durch p38_{AGF} unbeeinflusst (Spur 4). Ebenso zeigte MK2_{K76R} keinen Effekt auf die Stärke der Komplexe zwischen GM-CSF_{ARE} und Zytosol aus unbestrahlten (Spur 5) und UV-bestrahlten Zellen (Spur 6). Auch die Komplexbildung zwischen IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ und zytosolischen Proteinen aus unbehandelten und UV-bestrahlten Zellen blieb durch die dominant-negativen Kinasen weitgehend unbeeinflusst (s. Abb. 3.21 B).

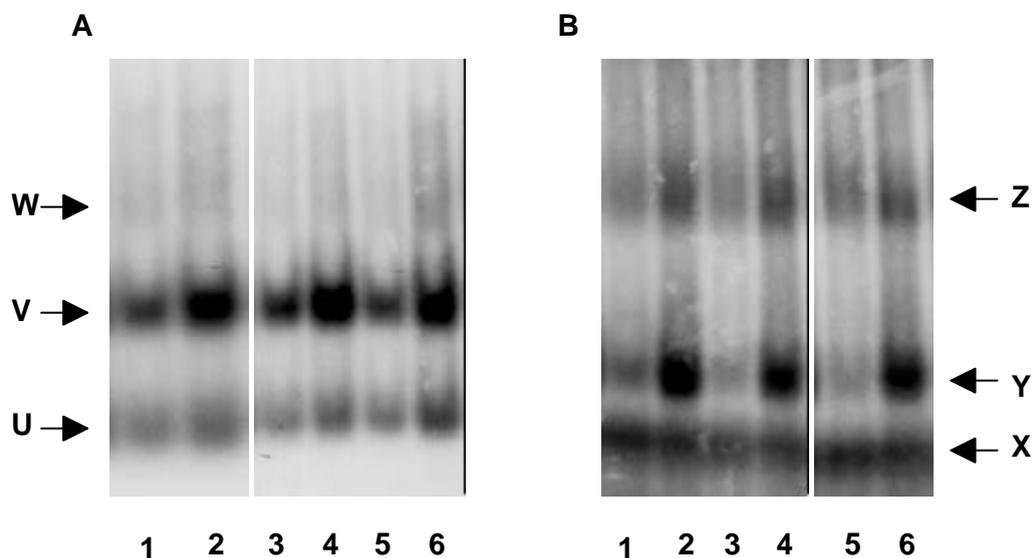


Abb. 3.21 Dominant-negative Formen von p38 und MK2 zeigen keinen Effekt auf die Komplexbildung zwischen zytosolischen Proteinen und GM-CSF_{ARE} bzw. IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀. **(A)** 2×10^5 cpm α -³²P-UTP markierte GM-CSF_{ARE}-RNA wurden wie bei Abb. 3.17 beschrieben mit 10 μ g des jeweiligen Zytosols inkubiert und RNase T1 verdaut. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. (1) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR transfizierten Zellen. (2) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR transfizierten Zellen. (3) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und p38_{AGF} transfizierten Zellen. (4) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und p38_{AGF} transfizierten Zellen. (5) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und MK2_{K76R} transfizierten Zellen. (6) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und MK2_{K76R} transfizierten Zellen. **(B)** Wie A, jedoch mit α -³²P-UTP markierter IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀-RNA..

Es scheint, als ob der p38-Signalwegs nicht an der UV-induzierten erhöhten Bindung von HuR an die GM-CSF_{ARE}- bzw IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀-RNA beteiligt ist, da weder konstitutiv aktive Formen der am p38-Signalweg beteiligten Kinasen, noch ihre dominant-negativen Formen die Komplexbildung beeinflussen.

3.4.3 Einfluß weiterer MAP Kinasewege auf die Komplexbildung

Da eine konstitutiv aktive Form der MAPKKK MEKK-1 zu einer erhöhten Bindung von HuR an die GM-CSF_{ARE}- bzw IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀-RNA führt, dieser Effekt aber nicht durch den p38 Signalweg vermittelt wird, sollten die MAP Kinasewege JNK und ERK1/2, sowie der NF- κ B-Signalweg auf deren Wirkung auf HuR untersucht werden. Dazu wurden zytosolische Lysate von Zellen extrahiert, die zuvor mit konstitutiv aktiven Formen von MKK7 (MKK7_{S3E}) und JNK₂ Wildtyp (WT), MKK1 (MKK1_{R4F}), sowie dem NIK WT transfiziert wurden. MKK7_{S3E} ist eine schwach aktive Form, deshalb wurde zur Verstärkung einer möglichen Wirkung JNK₂ WT als Substrat kotransfiziert. NIK WT wirkt in der Zelle als aktive Form. Außerdem wurden noch einmal die Lysate mit MKK6_{2E} und MEKK-1 Δ in die Versuche eingesetzt, um die Ergebnisse aus Abb. 3.20 zu verifizieren.

In Abb. 3.22 A ist wie schon in Abb. 3.20 die verstärkte Bindung von HuR an die GM-CSF_{ARE}-RNA infolge der MEKK-1-Wirkung zu sehen (Spur 3 und 4). Der Komplex V ist wie schon in Abb. 3.20 mit Lysat aus MEKK-1 transfizierten Zellen (Spur 3) stärker ausgeprägt als mit Lysat der Leervektor-transfizierten Kontroll-Zellen (Spur 1). Die Komplexe U und W werden kaum tangiert. Bei zusätzlicher UV-Bestrahlung zeigt sich die bereits bekannte additive Wirkung von UV und MEKK-1 (Spur 4) im Vergleich zu UV (Spur 2). Bei diesem Versuch scheint MKK6 allerdings ebenfalls eine erhöhte Bindung von HuR zu induzieren. Im Gegensatz zu MEKK-1 jedoch bei den beiden Komplexen U und V (vgl. Spur 5 und Spur 1). Zudem besitzt MKK6 für beide Komplexe eine additive Wirkung mit UV (Spur 6). Die gleiche Wirkung wie MKK6 zeigen die MAPKK MKK7 zusammen mit JNK₂ (Spuren 7 und 8) und auch MKK1 (Spur 9 und 10), wenn auch mit etwas geringerer Intensität. Nur NIK (Spuren 11 und 12) zeigt keinen Effekt verglichen mit den Kontrollen (Spuren 1 und 2).

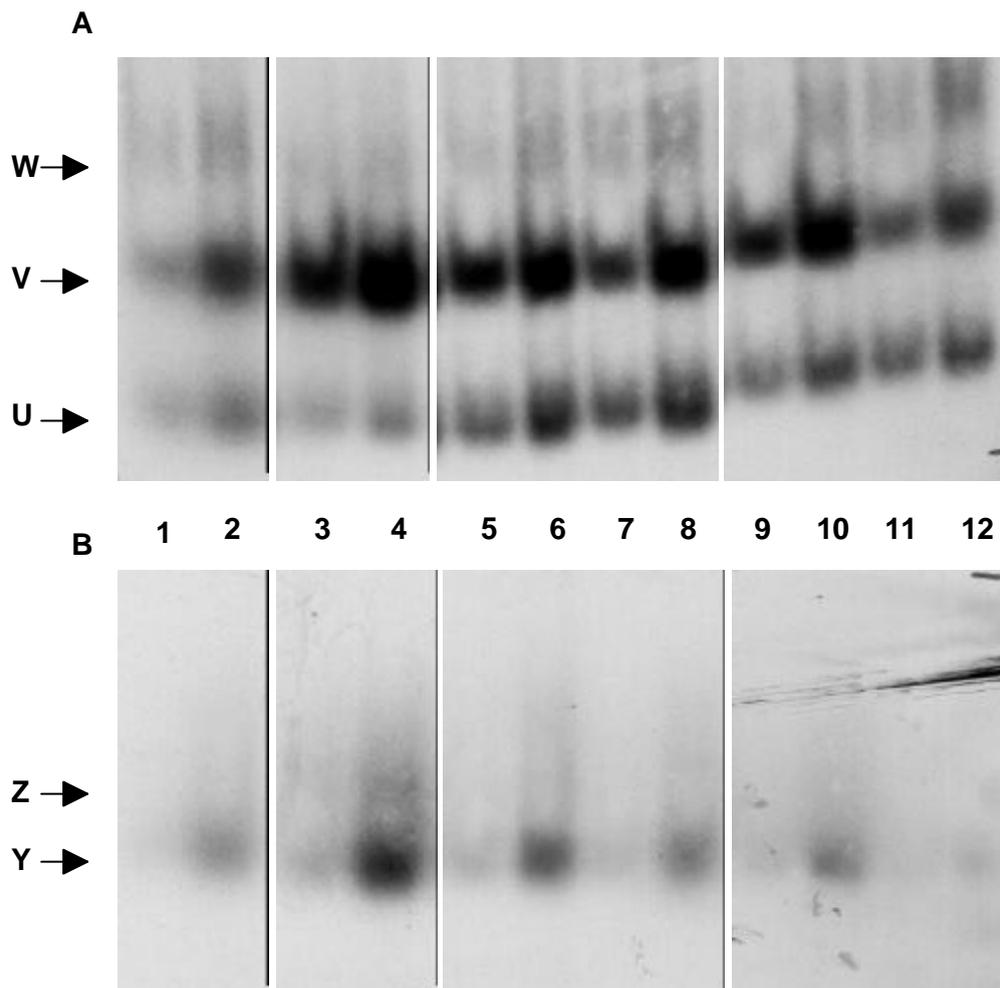


Abb. 3.22 Verschiedene MAP Kinasen zeigen einen Einfluß auf die Komplexintensität zwischen zytosolischen Proteinen und GM-CSF_{ARE} (A) bzw IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ (B). 2×10^5 cpm α -³²P-UTP markierte GM-CSF_{ARE}-RNA wurden wie bei Abb. 3.17 beschrieben mit 10 μ g des jeweiligen Zytosols inkubiert und RNase T1 verdaut. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. (1) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR transfizierten Zellen. (2) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR transfizierten Zellen. (3) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und MEKK-1 Δ transfizierten Zellen. (4) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und MEKK-1 Δ transfizierten Zellen. (5) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und MKK6_{2E} transfizierten Zellen. (6) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und MKK6_{2E} transfizierten Zellen. (7) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR, MKK7_{S3E} und JNK₂WT transfizierten Zellen. (8) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR, MKK7_{S3E} und JNK₂WT transfizierten Zellen. (9) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und MKK1_{R4F} transfizierten Zellen. (10) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und MKK1_{R4F} transfizierten Zellen. (11) Zytosol aus unbestrahlten, myc-HuR und NIK WT transfizierten Zellen. (12) Zytosol aus UV-bestrahlten, myc-HuR und NIK WT transfizierten Zellen.

In Abb. 3.22 B ist die verstärkte Ausprägung der Komplexe Y und Z zwischen HuR und IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ mit Lysat aus MEKK-1 Δ transfizierten Zellen zu sehen (Spur 3; vgl. mit Kontrolle in Spur 1). Bei Verwendung von Lysat aus zusätzlich UV-bestrahlten Zellen ist auch hier ein additiver Effekt (Spur 4) gegenüber Lysat aus nur UV-bestrahlten Zellen (Spur 2) sichtbar. Zudem ist auch hier eine verstärkte Ausprägung der Komplexe durch die Kinasen MKK6 (Spuren 5 und 6) und MKK7/JNK₂ (Spuren 7 und 8) zu beobachten. MKK1 (Spuren 9 und 10) zeigt hier nur einen sehr schwachen Effekt. Allerdings ist von der Wirkung der MAPKK nur der Komplex X betroffen, während durch MEKK-1 ebenfalls Komplex Z verstärkt wird. Wie auch schon mit GM-CSF_{ARE} ist ein additiver Effekt in der Wirkung der Kinasen zusammen mit UV zu beobachten. Zudem besitzt auch hier MKK6 eine stärkere Wirkung als die anderen beiden MAPKK. Die Expression von NIK (Spuren 11 und 12) bleibt auch hier ohne Effekt.

Die durch MEKK-1 Δ erhöhte Intensität einzelner Komplexe zwischen zytosolischen Proteinen und GM-CSF_{ARE} bzw. IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀ konnte in Abb. 3.20 und Abb. 3.22 bestätigt werden. Allerdings weichen die Ergebnisse in Bezug auf MKK6_{2E} voneinander ab. Interessant ist der additive Effekt von UV und MAP Kinasen. In Abb. 3.19 bewirkt die Expression von myc-HuR eine signifikante Erhöhung der Komplexintensität mit IL-8 3' UTR₁₀₃₉₋₁₂₀₀. Erfahrungen der Arbeitsgruppe zeigen, daß MAP Kinasen teilweise die Expression von Plasmid-kodierten Proteinen erhöhen. Daher sollte überprüft werden, ob die MAP Kinasen die Verstärkung der Komplexe möglicherweise über eine erhöhte myc-HuR Expression bewirken.

Um dies näher zu analysieren wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Neben Zytosol mit transfizierter MEKK-1 Δ , wurde Zytosol mit MKK6_{2E}, MKK7_{S3E}/JNK₂WT, MKK1_{R4F}, NIK WT und von UV-bestrahlten Zellen untersucht. Als Antikörper wurde Anti-c-myc verwendet, der gegen das myc-Epitop vom transfizierten HuR gerichtet ist. Wie in den beiden Abbildungen 3.23 und 3.24 zu sehen ist, wird in den für Gel-Retardationstests eingesetzten zytosolischen Lysaten die Menge von myc-HuR durch MEKK-1 (Abb 3.23, Spur 2 und 3) im Vergleich zur Kontrolle (Spur 1) massiv erhöht. Das dies nicht auf eine verstärkte Translokation von HuR vom Kern ins Zytosol, sondern auf eine absolut erhöhte HuR-Menge zurückzuführen ist, zeigen ähnliche Versuche mit SDS-Lysaten (Daten nicht gezeigt). Auch MKK6 (Spur 4 und

5) induziert eine erhöhte myc-HuR-Menge. MKK7/JNK₂ und MKK1 sind in ihrer Wirkung etwas schwächer als MKK6. NIK und interessanterweise auch UV wirken nicht aktivierend auf die Expression von dem transfizierten myc-HuR. Die erhöhte Menge von myc-HuR durch MAP Kinasen korreliert zu der gezeigten Komplexintensität in Abb. 3.22 und erklärt die beobachteten Zunahmen nach Kinase-Expression. UV und die Kinasen wirken demnach auf unterschiedliche Weise auf die Komplexintensität.

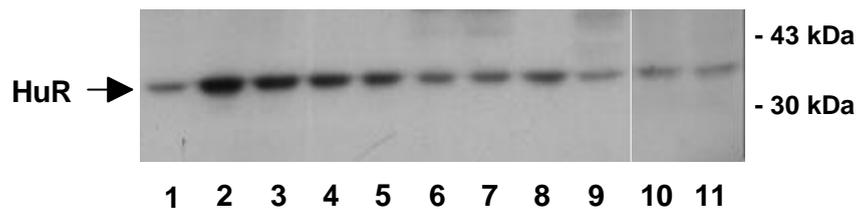


Abb 3.23 MAP Kinasen bewirken eine erhöhte myc-HuR Konzentration in HeLa-Zellen. Es wurden je 100 µg vom entsprechenden zytoplasmatischem HeLa-Lysat in einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.7.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Myc-HuR wurde mit einem spezifischen Anti-myc Antikörper und einem AP-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen (s. 2.7.3). Einige Lysate wurden doppelt aufgetragen. (1) Lysat aus myc-HuR transfizierten Zellen. (2+3) Lysat aus myc-HuR und MEKK-1 Δ transfizierten Zellen. (4+5) Lysat aus myc-HuR und MKK6_{2E} transfizierten Zellen. (6+7) Lysat aus myc-HuR, MKK7_{S3E} und JNK₂WT transfizierten Zellen. (8) Lysat aus myc-HuR und MKK1_{R4F} transfizierten Zellen. (9) Lysat aus myc-HuR und NIK WT transfizierten Zellen. (10) Lysat aus myc-HuR transfizierten Zellen. (11) Lysat aus UV-bestrahlten Zellen.

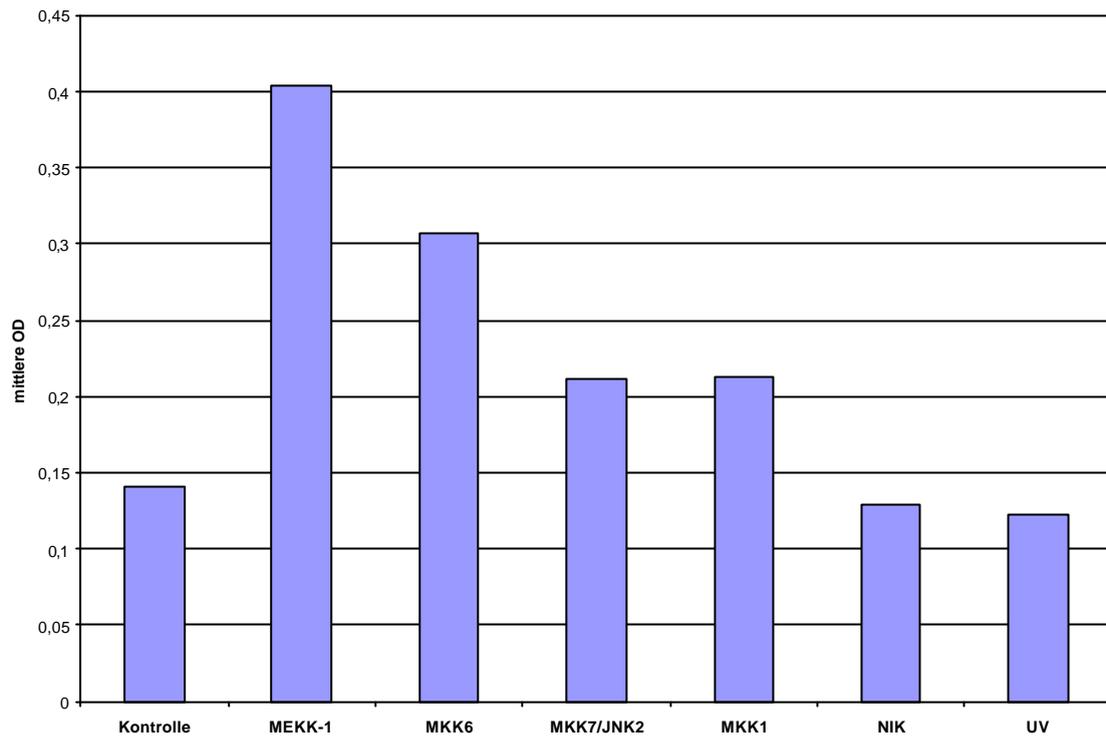


Abb. 3.24 Quantifizierung der myc-HuR-Expression. Es wurde eine Volumenanalyse der myc-HuR-Banden mit dem Programm Molecular Analyst 1.4 der Firma BioRad durchgeführt. Die ermittelte mittlere OD wurde graphisch aufgetragen. Bei MEKK-1 Δ , MKK6_{2E} und MKK7_{S3E}/JNK₂ wurde der Mittelwert von den Doppelwerten bestimmt und aufgetragen.

3.5 Komplexbildung von nicht AU-reichen mRNAs mit zytosolischen Proteinen aus HeLa-Zellen

UV stabilisiert neben AU-reichen RNAs auch nicht-AU-reiche Transkripte, wie z.B. Luziferase, GFP und TIMP-1 (s. 3.2). Um zu analysieren, ob HuR generell an UV-induzierter RNA-Stabilität beteiligt ist wurden Lysate von unbestrahlten und UV-bestrahlten HeLa-Zellen extrahiert, und auf ihre Komplexbildung mit GFP- bzw TIMP-1-RNA untersucht. Die Bindung von HuR wurde mittels spezifischer Antikörper analysiert.

3.5.1 Komplexbildung von GFP-RNA mit zytosolischen Proteinen

In Abb. 3.25 ist zu sehen, daß GFP mRNA mit dem Zytosol aus unbehandelten Zellen nur einen Komplex (A) mit hoher elektrophoretischer Mobilität bildet (Spur 1). Er läuft kurz überhalb der freien RNA. Die Inkubation der RNA mit Zytosol aus UV-bestrahlten Zellen ergibt keine Veränderung des Bandenmusters (Spur 2). Der Komplex A ist zudem von gleicher Intensität wie in Spur 1. Dies Ergebnis gibt keinen Hinweis auf eine Beteiligung der darin enthaltenen Proteine an der UV-induzierten Transkriptstabilität. Der Einsatz von Anti-HuR Antikörpern führt nicht zu einem *supershift* des gebildeten Komplexes bei Lysaten aus unbestrahlten (Spur 3) und UV-bestrahlten Zellen (Spur 4). HuR scheint daher nicht am Komplex A beteiligt zu sein.

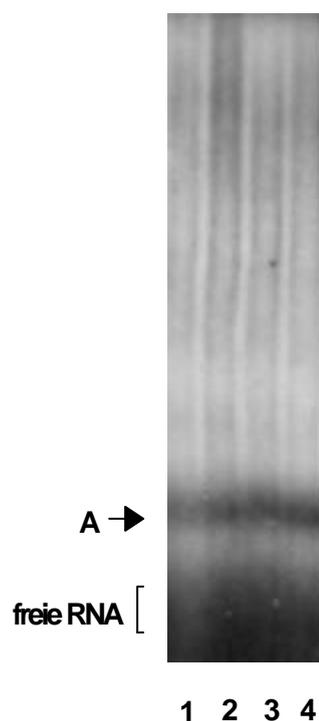
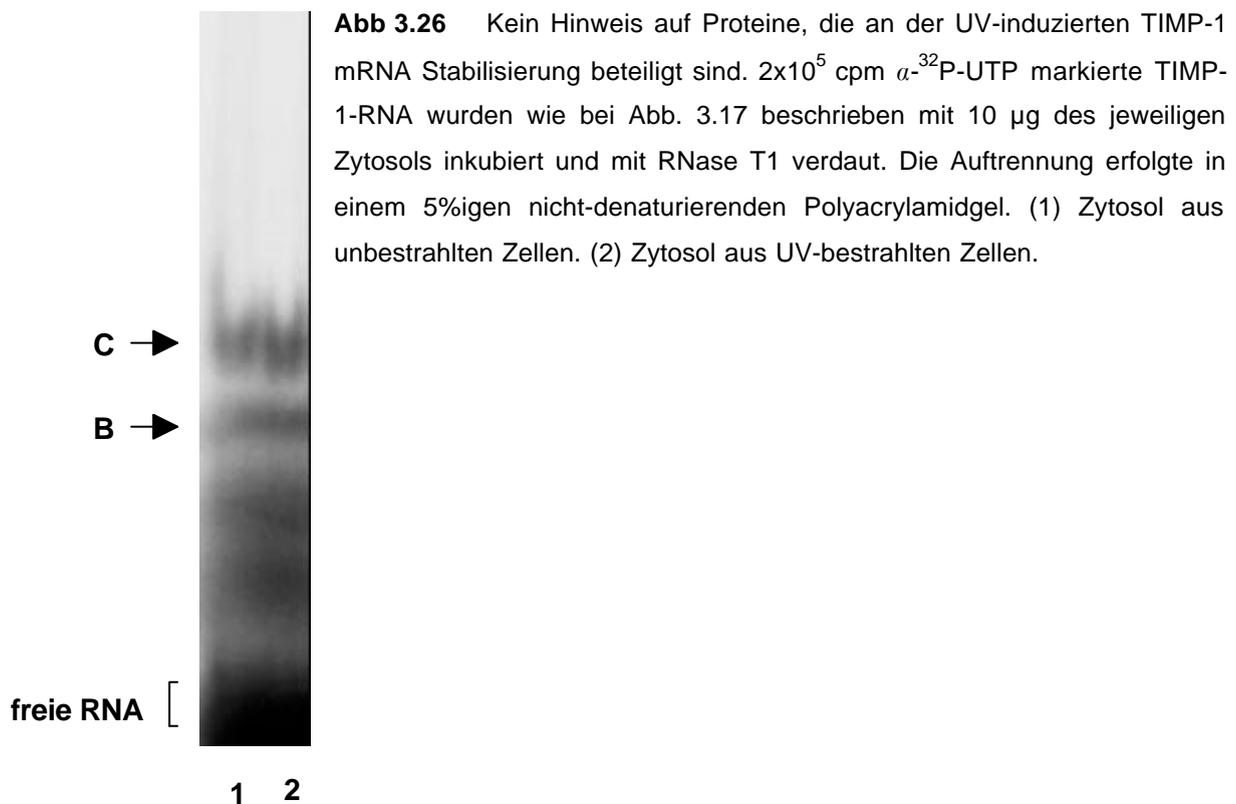


Abb. 3.25 HuR ist nicht an der Bildung von Komplexen zytosolischer Proteine mit GFP mRNA beteiligt. 2×10^5 cpm α - 32 P-UTP markierte GFP-RNA wurden wie bei Abb. 3.17 beschrieben mit 10 μ g des jeweiligen Zytosols inkubiert und mit RNase T1 verdaut. Die Auftrennung erfolgte in einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. (1) Zytosol aus unbestrahlten Zellen. (2) Zytosol aus UV-bestrahlten Zellen. (3) Zytosol aus unbestrahlten Zellen mit Zusatz von Anti-HuR Antikörper. (4) Zytosol aus UV-bestrahlten Zellen mit Zusatz von Anti-HuR Antikörper.

3.5.2 Komplexbildung von TIMP-1-RNA mit zytosolischen Proteinen

TIMP-1 mRNA bildet mit dem Zytosol von unbehandelten HeLa-Zellen zwei RNA-Protein-Komplexe (B und C; s. Abb. 3.26, Spur 1) mit mittlerer elektrophoretischer Mobilität. Die gleichen Komplexe werden mit Zytosol aus UV-bestrahlten Zellen gebildet (Spur 2). Die Intensität des Komplexes bleibt dabei unverändert. UV zeigt unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluß auf die Bildung und die Ausprägungsstärke von TIMP-1 RNA-Protein-Komplexen.



Zusammenfassend kann gesagt werden, daß unter den gleichen Bedingungen wie mit AU-reichen RNAs, mit den RNAs von GFP und TIMP-1 keine erhöhte Komplexbildung mit zytosolischen Proteinen aus HeLa-Zellen nach UV-Bestrahlung zu beobachten ist. Zudem konnte keine Beteiligung von HuR an mit GFP-mRNA gebildeten Komplexen nachgewiesen werden, d.h. eine generelle Beteiligung von HuR an UV-induzierter Transkriptstabilität ist nach den hier vorliegenden Ergebnissen eher unwahrscheinlich.

4. Diskussion

Eine starke und schnelle Induktion von Zytokinen durch pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1 oder TNF, ebenso wie durch Streß-Stimuli, wird auch durch eine Verlängerung der biologischen Halbwertszeit des Transkripts erzielt [Elias und Lentz, 1990; Ng *et al.*, 1994; Leverkus *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 1998]. Ein Streß-Stimulus, der eine modulierende Wirkung auf die Genexpression von Transkriptionsfaktoren, Proteasen und Zytokinen besitzt, ist UV [Kondo *et al.*, 1993; Bender *et al.*, 1997]. Für einige Transkripte, darunter IL-6, *c-fos*, *c-myc* und *c-jun* konnte eine Zunahme der Halbwertszeit infolge von UV-Bestrahlung nachgewiesen werden [de Vos *et al.*, 1994; Blattner *et al.*, 2000]. Gemeinsames Charakteristikum dieser mRNAs ist eine AU-reiche Sequenz in der 3' UTR. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung von UV auf die Stabilität AU-reicher Hybrid-RNAs untersucht. Konstruiert wurde ihr Expressionsvektor aus einer genomischen Kaninchen β -Globin DNA, indem in ihre 3' UTR ein AU-reicher Teil der 3' UTR von der IL-8 mRNA bzw das ARE von der GM-CSF mRNA eingefügt wurde. Kontrolliert wird die Expression über einen Tetrazyklin-regulierbaren Promotor. Diese Reporter erlauben eine gezielte Untersuchung der Regulation der Stabilität von Transkripten durch AU-reiche Elemente, ohne Beeinflussung durch weitere, transkriptspezifische *cis*-Elemente. Für GM-CSF konnte eine Verringerung der Degradationsrate infolge von Phorbol Ester-Behandlung gezeigt werden [Shaw und Kamen, 1986]. IL-8 besitzt nach Induktion mit verschiedenen Substanzen eine verlängerte Halbwertszeit [Kasahara *et al.*, 1991; Stoeckle, 1991; Tobler *et al.*, 1992; Chaudhary und Avioli, 1996; Villarete und Remick, 1996; Winzen *et al.*, 1999]. Die Regulation wird durch die AU-reichen Elemente auf β -Globin Reporter-RNA übertragen. Auch UV induziert nach den hier vorliegenden Ergebnissen eine Stabilisierung der verwendeten Hybrid-RNAs mit IL-8 3' UTR₉₇₂₋₁₃₁₀ bzw GM-CSF_{ARE}. Dieser Effekt ist Dosis-abhängig (s. Abb. 3.4 und 3.5).

Eine Theorie geht davon aus, daß einige der durch UV induzierten Wirkungen auf Zytokine zurückzuführen sind, deren Sekretion durch UV stimuliert wird, wie z.B. IL-1 [Übersicht in Tyrrell, 1995]. IL-1 führt unter anderem zu einer Induktion von Chemokinen auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene [Schall, 1991; Baggiolini *et al.*, 1994; Graves und Jiang, 1995]. Winzen *et al.* [1999] konnten zeigen,

daß die IL-1 induzierte Stabilisierung der β -Globin-IL-8 3' UTR₉₇₂₋₁₃₁₀-RNA durch den p38 Kinaseweg vermittelt wird, ebenso die Transkriptstabilität von β -Globin-GM-CSF_{ARE}. Im Falle einer UV-induzierten IL-1 Sekretion sollte die beobachtete Stabilisierung der Hybrid-RNAs ebenfalls über den p38 Kinaseweg vermittelt werden. Eine dominant-negative Form der p38 Kinase hätte demnach mit der induzierten Stabilität interferieren müssen. Eine Hemmung der UV-Wirkung war aber weder mit p38_{AGF} noch mit der dominant-negativen MK2_{K76R} detektierbar, während beide die Wirkung von MKK6 als spezifischen p38 Aktivator effektiv inhibieren (s. Abb. 3.8). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung des p38 Kinasewegs bei der UV-induzierten Transkriptstabilisierung. MKK6 wurde in dieser Studie eingesetzt, weil sie den p38 Weg spezifisch aktiviert. Außerdem werden durch MKK6, im Gegensatz zu MKK3 als weitere selektiv p38 aktivierende MAPKK, alle vier Isoformen von p38 aktiviert [Schulze-Osthoff *et al.*, 1997; Enslin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997].

Es besteht die Möglichkeit, daß UV seine stabilisierende Wirkung über andere MAP Kinasewege, wie z.B. ERK1/2 oder SAPK/JNK induziert. Letzterer vermittelt in T-Zellen eine über den T-Zell-Rezeptor und CD28 oder durch Expression von MEKK-1 Δ induzierte Stabilität der IL-2 mRNA [Chen *et al.*, 1998]. Dabei werden allerdings Bereiche der 5', sowie der 3' UTR des IL-2-Transkripts als *cis*-Elemente benötigt. Die Bereiche der 3' UTR konnten nicht durch andere Sequenzen mit AREs ersetzt werden, was auf einen anderen, Transkript-spezifischeren Mechanismus hinweist. Es ist bisher ungeklärt, ob hier spezifische Eigenschaften der IL-2 mRNA oder Zell-spezifische Regulationsmechanismen (T-Zellen bei Chen *et al.*, HeLa-Zellen bei Winzen *et al.*) von mRNA-Stabilität zum Tragen kommen. Eine Beteiligung des SAPK/JNK Kinasewegs wurde auch im Zusammenhang mit der Stabilisierung von IL-3 mRNA in Mastzellen beschrieben [Ming *et al.*, 1998]. Dabei wurde eine Beteiligung von p38 nicht ausgeschlossen.

Auch eine Rolle des ERK1/2 Kinasewegs wurde im Zusammenhang mit mRNA-Stabilisierung beschrieben. Basierend auf der Verwendung von PD98059, einem Inhibitor der ERK-aktivierenden MAP Kinase Kinase MKK1, wurde vermutet, daß ERK die mRNA des Muscarin-Rezeptors stabilisiert [Lee und Malek, 1998].

Außerdem besteht die Möglichkeit, daß UV andere, noch nicht bekannte MAP Kinasewege induziert. Möglicherweise über eine UV-aktivierbare MAPKKK, wie z.B. die MAP *three kinase* (MTK) [Takekawa *et al.*, 1997].

Die konstitutiv aktiven Formen der beiden MAPKKK MEKK-1 und TAK1 aktivieren die MAP Kinasewege SAPK/JNK, ERK1/2 und p38, sowie NF κ B [Lee *et al.*, 1997; Nemoto *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1994; Yujiri *et al.*, 1998; Lange-Carter *et al.*, 1993; Guan *et al.*, 1998; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Shirakabe *et al.*, 1997; Moriguchi *et al.*, 1996]. Im Gegensatz zu UV konnten sie keine Stabilisierung der TIMP-1-, GFP- und Luziferase-Transkripte induzieren. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung der aktivierten MAP Kinasewege und von NF κ B an der UV-induzierten Verlängerung der Halbwertszeit der oben genannten Transkripte. Die Rekrutierung dieser Signalwege bei der Stabilisierung der AU-reichen Hybrid-RNAs ist auch eher unwahrscheinlich. Winzen *et al.* [1999] konnten keine Stabilisierung der β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ RNA in HeLa-Zellen durch MKK7_{S3E} als selektiven Aktivator von SAPK/JNK bzw MKK1_{R4F} als selektiven Aktivators von ERK1/2 zeigen. Außerdem konnten Blattner *et al.* [2000] die UV-C-induzierte Stabilisierung von *c-fos*-RNA nicht durch Inhibitoren von p38, SAPK/JNK, ERKs und weiteren Signalwegen hemmen. Dies unterstützt die Annahme, daß die UV-induzierte Transkriptstabilisierung nicht über diese Signalwege vermittelt wird.

Dies schließt nicht aus, das andere Kinasewege an der Regulation der IL-8 oder GM-CSF mRNA beteiligt sind, da hier nur Hybrid-RNAs mit kurzen regulatorischen Sequenzen benutzt wurden. Andere *cis*-Elemente, die möglicherweise in der 5' UTR, dem kodierenden Bereich oder anderen Bereichen der 3' UTR der IL-8 bzw GM-CSF mRNA enthalten sind, und Bindungssequenzen für *trans*-regulierende Proteine darstellen, die von anderen Signalwegen rekrutiert werden, bleiben bei diesen Untersuchungen unberücksichtigt.

Möglicherweise werden unterschiedliche Regulationsmechanismen durch UV und das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 aktiviert, die sich in ihrer Substratselektivität unterscheiden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Blattner *et al.* [2000], die eine Stabilisierung von *c-fos* (Klasse I ARE) nach UV-C Bestrahlung beschreiben. Diese konnte nicht durch Behandlung von NIH 3T3-Zellen mit IL-1 α oder Wachstumsfaktoren hervorgerufen werden. Außerdem konnten sie eine UV-C-induzierte Verlängerung der Halbwertszeit bei der nicht-AU-reichen KIN17 mRNA und den Transkripten von *c-jun* (Klasse III ARE), *c-myc* und I κ B beobachten. Allerdings konnten sie keinen Effekt auf die mRNAs von u-PA und dem

Elongationsfaktor-1 (EF-1) zeigen, wobei ersteres Transkripts bereits eine Halbwertszeit von über drei Stunden besitzt, und nach der Quantifizierung ihrer Ergebnisse zu urteilen auch eine sehr schwache Stabilisierung erfährt. Zudem ist zu beachten, daß Blattner *et al.* [2000] zur Inhibition der Transkription Actinomycin D verwendet haben. Durch dessen Gebrauch kann es zu Interferenzen mit der mRNA-Stabilität kommen [Chen *et al.*, 1995; Kessler und Chasin, 1996, Peng *et al.*, 1996]. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Tetrazyklin-regulierbare Expressionssystem nach Gossen und Bujard [1992] verwendet (s. Abb. 3.1). Blattner *et al.* [2000] schlagen eine breite, aber nicht generelle Wirkung von UV auf die Stabilität von mRNAs vor. Die Stabilisierung von dem Transkript des in inflammatorische Prozesse involviertem TIMP-1 steht mit dieser Hypothese noch in Einklang. Es ist vorstellbar, daß UV als inflammatorisch wirkender Stimulus viele verschiedene Transkripte stabilisiert, die z.B. an entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Die hier vorliegenden Ergebnisse mit den Transkripten von Luziferase und GFP (s. 3.2.1 und 3.2.2) widersprechen allerdings dieser Ansicht. Mit diesen RNAs erfahren zwei Spezies-fremde Nukleinsäuren in einem humanen Zellsystem eine verlangsamte Degradationsrate. Dabei ist zudem zu beachten, daß GFP aus dem Stamm der Cnidarier und Luziferase aus den Insecta stammt, also hier sehr weit entfernte Verwandtschaftsverhältnisse existieren. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit eines gemeinsamen, konservierten Regulationsmechanismus der Transkripte gesenkt. Diese Ergebnisse sprechen eher für einen generellen Stabilisierungsmechanismus von mRNAs durch UV. Ähnliche Effekte konnten mit der Aktivierung der MAP Kinasewege nicht erzielt werden.

Es stellt sich nun die Frage, welche generellen Mechanismen zu einer Transkriptstabilität führen können. Blattner *et al.* [2000] schließen bei ihren Ergebnissen, basierend auf Experimenten mit dem Wachstumsfaktorrezeptor-Toxin Suramin, eine Beteiligung von Rezeptor-abhängigen Signalwegen an der UV-C-induzierten Stabilisierung der mRNAs aus. Stattdessen postulieren sie DNA-Schäden als Zwischenprodukte der von UV aktivierten Mechanismen. Solche Schäden sind auch Ausgangspunkt von UV-induzierter, p53-abhängiger Apoptose [Yamaizumi und Sugano, 1994]. Maßgeblich an Apoptose beteiligt sind Caspasen. Da in den HeLa-Zellen nach UV-Bestrahlung Apoptose induziert wurde (s. Abb. 3.15), wäre es denkbar, daß auch in den überlebenden Zellen durch Caspase-Aktivität

destabilisierende, *trans*-regulierende Proteine oder RNasen gespalten werden, wodurch die mRNAs nicht mehr degradiert werden könnten. Dies würde zu einer allgemeinen Transkript-Stabilität führen. Durch UV wird nachweislich die Caspase-3 aktiviert [Kumar, 1999; Woo *et al.*, 1998]. Ein möglicher Weg, der von p53 zur Aktivierung der Caspase-3 führt ist dabei über eine bax-induzierte Erhöhung der zytosolischen Cytochrom c-Konzentration, die zusammen mit dem Cytochrom c Adaptermolekül Apaf-1 und dATP zur Aktivierung der übergeordneten Caspase-9 führt, die die Caspase-3 aktivieren kann [Kumar, 1999; Robertson und Orrenius, 2000; el-Deiry, 1998]. Interessant ist dabei, dass die mRNA vom antagonistisch zu bax wirkendem *bcl-2* [Robertson und Orrenius, 2000] ein ARE in der 3' UTR trägt. Bei induzierter Apoptose wird das *bcl-2* Genprodukt unter anderem über eine Destabilisierung der mRNA herunterreguliert [Schiavone *et al.*, 2000], was zeigt, daß die Stabilisierung von mRNAs auch während der Apoptose selektiv reguliert werden kann. Chan *et al.* [1999] konnten UV-induzierte Apoptose in Madin-Darby Canine Nierenzellen durch einen Inhibitor von Caspase-1- und Caspase-3-ähnlichen Proteasen, ZVAD-fmk, effektiv hemmen. Diese Ergebnisse konnten für HeLa-Zellen bestätigt werden (s. Abb. 3.15). Die Hemmung von Caspase-3 ist dabei für die Inhibierung der Apoptose entscheidend. Caspase-3 defiziente Mäuse sind resistent gegen UV-induzierte Apoptose [Überblick in Kumar, 1999; Wang und Lenardo, 2000]. Auf die UV-induzierte Stabilisierung der β -Globin-IL-8₉₇₂₋₁₃₁₀ RNA hatte der Inhibitor allerdings keinen Effekt, im Gegenteil erfuhr das Transkript eher eine weitere Stabilisierung gegenüber den UV-bestrahlten Zellen. Dies kann zum Teil technisch begründet sein. Wenn die Zellen durch die Transfektion gestreßt werden, könnte der zusätzliche Streß durch die UV-Strahlung möglicherweise zur erhöhten Apoptoserate in transfizierten Zellen führen. Tote Zellen werden vor der Zellyse gewaschen. Dadurch könnte der prozentuale Anteil der Hybrid-RNAs an der Gesamt-RNA sinken. Durch ZVAD-fmk würde der Prozentsatz der Hybrid-RNAs gleich bleiben. In Northern Blot Analysen würde der Eindruck einer erhöhten Stabilität entstehen. Eine Beteiligung von Caspasen an den UV-induzierten Stabilisierungsmechanismen in HeLa-Zellen ist nach den Ergebnissen allerdings unwahrscheinlich.

Im Zusammenhang mit der UV-induzierten Transkriptstabilität könnte die Bildung von Streß-Granula stehen. Zu diesen Strukturen gehören die *heat stress granules* (HSGs). Sie wurden in Pflanzenzellen gefunden, die einem Hitzeschock unterzogen

wurden [Überblick in Kedersha *et al.*, 1999]. Ähnliche Strukturen wurden in Säugetierzellen gefunden. In ihnen akkumulieren untranslatierte poly(A)⁺ mRNAs. Entscheidend dabei ist, daß diese Granula reversibel in Zellen sind, die sich von dem Streß erholen, während sie in Zellen, die eine lethale Streßdosis erhalten haben irreversibel sind. Initiiert wird die Bildung dieser Streß Granula (SGs) durch Phosphorylierung von eIF-2 α . Kedersha *et al.* [1999] gehen davon aus, daß dadurch die Translation aller mRNAs, die nicht für Hitzeschockproteine kodieren unterbrochen wird. Dies könnte der Zelle erlauben sofort auf die neue Umgebungssituation durch gezielte Expression von Hitzeschockproteinen zu reagieren. Da die Bildung der SGs reversibel ist, werden die darin enthaltenen mRNAs nicht degradiert, d.h. sie sind für die Dauer der Streßreaktion stabil. Interessanterweise werden diese Granula auch nach UV-Bestrahlung gebildet [Kedersha *et al.*, 1999]. Bei Inkubation der Zellen mit inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF α konnte keine Bildung von SGs nachgewiesen werden [Kedersha *et al.*, 1999]. Dies könnte die hier vorliegenden Ergebnissen erklären. Während IL-1 eine Stabilisierung der AU-reichen Hybrid-RNAs über den p38 Kinaseweg induziert, die Transkripte von Luziferase, GFP und TIMP-1 aber nicht stabilisiert, wird durch UV-Bestrahlung die Bildung von SGs induziert, die zur Akkumulation der meisten mRNAs führt, wodurch diese stabil in der Zelle vorliegen. Diese Effekte könnten nicht durch dominant-negative Formen der am p38 Kinaseweg beteiligten MAP Kinasen inhibiert werden. Außerdem wäre das Ergebnis von Blattner *et al.* [2000], daß die mRNA von dem Elongationsfaktor-1 nicht durch UV-C stabilisiert wird, möglicherweise physiologisch sinnvoll, da z.B. die mRNAs von Hitzeschockproteinen nicht in SGs akkumulieren [Übersicht in Kedersha *et al.*, 1999]. Da diese also bei Hitzeschock weiterhin translatiert werden, wäre denkbar, daß die mRNAs von den für die Translation notwendigen Elongationsfaktoren ebenfalls von der Akkumulation ausgenommen sind. Ob diese Annahmen tatsächlich zutreffen, müßte in weiteren Experimenten geklärt werden. Der mikroskopische Nachweis der SGs und die spezifische Anfärbung von in ihnen vorliegender RNA sollte dabei der erste Schritt sein. Zudem müßte die Abhängigkeit der UV-induzierten Transkriptstabilisierung von eIF-2 α analysiert werden.

Es stellt sich nun die Frage, ob die Bindung von HuR an die IL-8₁₀₃₉₋₁₂₀₀- und GM-CSF_{ARE}-RNA in dieses Gedankenmodell einzubeziehen ist. Bei Expression von MAP-Kinasen ist eine erhöhte Bindung von myc-HuR detektierbar. Die durch MAP-Kinasen

nachweislich erhöhte transiente Expression von myc-HuR (s. Abb. 3.23 und 3.24) könnte diese Beobachtung aber erklären. UV erhöht im Gegensatz dazu nicht die Expression. Da HuR eine *shuttling*-Sequenz besitzt [Fan und Steitz, 1998b], kann daher angenommen werden, daß UV einen verstärkten Wechsel von HuR vom Kern in das Zytoplasma induziert. Diese Hypothese wird von Wang *et al.* [2000] unterstützt. Der Grund für die höhere Intensität der detektierten Komplexe könnte also in einer Zunahme der HuR-Menge im Zytoplasma liegen. Damit wäre auch der additive Effekt bei Expression von MAP-Kinasen und gleichzeitiger UV-Bestrahlung erklärbar. Er ist zum einen auf eine erhöhte HuR-Konzentration innerhalb der Zelle, zum anderen auf eine Akkumulation im Zytoplasma zurückzuführen.

Die verstärkte myc-HuR Expression führt zu einer Intensivierung der Komplexe mit IL-8₁₀₃₉₋₁₂₀₀⁻ und GM-CSF_{ARE}-RNA. Dagegen war eine Beteiligung von HuR an Komplexen mit dem GFP-Transkript nicht nachweisbar. Auch eine stärkere Intensität der Komplexe mit der TIMP-1-mRNA nach UV-Bestrahlung konnte nicht gezeigt werden, was gegen eine Beteiligung von HuR spricht. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Bindung von HuR an AU-reiche RNA spezifisch ist, also nicht in einen generellen Stabilisierungsmechanismus involviert ist. Damit stellt sich das Problem, daß eine spezifische Bindung eines RNA-bindenden Proteins bei einem als unspezifisch angenommenen Stimulus nachgewiesen wurde. Eine Erklärung wäre die Hypothese von Gallouzi *et al.* [2000], daß die Akkumulation von HuR im Zytoplasma nach Hitzeschock auf eine Inhibierung des Zytoplasma-Kern-Transports zurückzuführen ist. Dies deckt sich mit der Annahme von Kedersha *et al.* [1999], daß die beiden Proteine TIA-1 und TIAR ebenfalls durch eine Streß-induzierte Hemmung des Kern-Imports im Zytoplasma angehäuft werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um zwei RNA-bindende, invariante Komponenten von SGs. Sie rekrutieren möglicherweise poly(A)⁺ mRNA in SGs. Es besteht also die Möglichkeit, daß UV zwar den Transport von HuR in das Zytoplasma bewirkt, bzw den Rücktransport verhindert, aber keine spezifische Bindung an die AU-reichen RNAs induziert. In Gel-Retardationstests würde es aufgrund der hohen zytoplasmatischen HuR-Konzentrationen zu irreführenden Ergebnissen kommen. Interessanterweise konnten Gallouzi *et al.* [2000] keine Bindung von im Zytoplasma akkumuliertem HuR an poly(A)⁺ mRNA nachweisen. Sie gehen davon aus, daß Hitzeschock zu einer Segregation von HuR und mRNA führt, und HuR sich in mikroskopisch

nachweisbaren Foci ablagert. Allerdings schließen sie nicht aus, das es sich bei diesen Foci möglicherweise um SGs handelt.

Es besteht die Möglichkeit, daß nicht das gesamte zytoplasmatische HuR in solchen Strukturen akkumuliert. Wang *et al.* [2000] beschreiben eine Stabilisierung der p21 mRNA durch direkte Interaktion mit HuR nach UV-C-Bestrahlung. Zellen in denen HuR *antisense*-mRNAs exprimiert wurden, zeigten nach UV-C-Bestrahlung eine deutlich geringere Stabilität der p21 mRNA. Von dem p21 Protein wird angenommen, daß es in die Inhibition von Zellwachstum nach Streßeinwirkung involviert ist. Eine Ausnahme von der Akkumulation in SGs und der damit verbundenen Translationshemmung [Kedersha *et al.*, 1999] wäre physiologisch sinnvoll. Dies würde bedeuten, daß es sich bei der Stabilisierung der p21 mRNA durch HuR um keinen Effekt einer allgemeinen Transkriptstabilisierung handelt. Der Unterschied zum Elongationsfaktor-1, der durch UV nicht stabilisiert wird [Blattner *et al.*, 2000], wäre möglicherweise damit erklärbar, daß EF-1 im Gegensatz zu p21 nicht post-transkriptionell reguliert wird. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob ein Teil der in dieser Arbeit verwendeten Hybrid-RNAs vielleicht doch durch HuR stabilisiert wird und nicht in SGs akkumuliert. In diesem Fall sollte eine Translation dieser Transkripte nachweisbar sein. Ein möglicher physiologischer Sinn wäre eine inflammatorische Reaktion auf hohe UV-Dosen. Ob das Modell einer UV-induzierten sehr breiten Transkriptstabilisierung durch SGs zutrifft, und darüber hinaus die Translation eines Teils der mRNAs aufrechterhalten wird, muß in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß UV eine Stabilisierung von mRNAs induzieren kann. Im Gegensatz zum pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 wird dieser Effekt nicht über den p38 MAP Kinaseweg vermittelt. Die Verlängerung der Halbwertszeit der artfremden Transkripte von GFP und Luziferase läßt einen unspezifischen Stabilisierungsmechanismus vermuten. Möglicherweise bieten Streß-Granula ein geeignetes Modell zur Erklärung der vorliegenden Ergebnisse. In ihnen könnte die mRNA für eine Phase der Regeneration in der Zelle konserviert, und anschließend für die Wiederaufnahme des normalen Zellstoffwechsels genutzt werden.

Literaturverzeichnis

- ABE, J., KUSUHARA, M., ULEVITCH, J., BERK, B.C., LEE, J.-D. (1996)
Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 16586-16590
- ARAO, Y., KURIYAMA, R., KAYAMA, F., KATO, S. (2000)
A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of
AUF1/hnRNP D0
ARCH BIOCHEM BIOPHYS 380, 228-236
- BAGGIOLINI, M., DEWALD, B., MOSER, B. (1994)
Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines
ADV. IMMUNOL. 55, 97-179
- BAGGIOLINI, M., LOETSCHER, P., MOSER, B. (1995)
Interleukin-8 and the chemokine family
INT. J. IMMUNOPHARMAC. 17(2), 103-108
- BEELMAN, C.A. und PARKER, R. (1995)
Degradation of mRNA in eukaryotes
CELL 81, 179-183
- BENDER, K., BLATTNER, C., KNEBEL, A., IORDANOV, M., HERRLICH, P.,
RAHMSDORF, H.J. (1997)
UV-induced signal transduction
JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B 37, 1-17
- BERGER, S.L. (1984)
The use of Cerenkov radiation for monitoring reactions performed in minute
volumes: examples from recombinant DNA technology
ANAL. BIOCHEM. 136, 515-519
- BERNSTEIN, P.L., HERRICK, D.J. PROKIPCAK, R.D., ROSS, J. (1992)
Control of *c-myc* mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a
coding region stability determinant
GENES & DEVELOPMENT 6, 642-654
- BICKEL, M., COHEN, R.B., PLUZNIK, D.H. (1990)
Post-transcriptional regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating
factor synthesis in murine T cells
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 145, 840-845
- BINDER, R., HOROWITZ, J.A., BASILION, J.P., KOELLER, D.M., KLAUSNER, R.D.,
HARFORD, J.B. (1994)
Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves
an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A)
tail shortening
THE EMBO JOURNAL 13, 1969-1980

- BLANK, J.L., GERWINS, P, ELLIOTT, E.M., SATHER, S., JOHNSON, G.L. (1996)
Molecular cloning of mitogen-activated protein (ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 5361-5368
- BLATTNER, C., KANNOUCHE, P., LITFIN, M., BENDER, K., RAHMSDORF, H.J., ANGULO, J.F., HERRLICH, P. (2000)
UV-induced stabilization of *c-fos* and other short-lived mRNAs
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 20, 3616-3625
- BRADFORD, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
ANAL. BIOCHEM. 72, 248-254
- BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H. (2000)
Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1477, 267-283
- BREWER, G. und ROSS, J. (1988)
Poly(a) shortening and degradation of the 3' A+U-rich sequences of human *c-myc* mRNA in a cell-free system
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 8, 1697-1708
- CARBALLO, E., LAI, W.S., BLACKSHEAR, P.J. (1998)
Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by Tristetraprolin
SCIENCE 281, 1001-1005
- CASEY, J.L., KOELLER, D.M., RAMIN, V.C., KLAUSNER, R.D., HARFORD, J.B. (1989)
Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA
THE EMBO JOURNAL 8, 3693-3699
- CHAN, P.-C., LAI, J.-F., CHENG, C.-H., TANG, M.-J., CHIU, C.-C., CHEN, H.-C. (1999)
Suppression of ultraviolet irradiation-induced apoptosis by overexpression of focal adhesion kinase in Madin-Darby Canine kidney cells
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 274, 26901-26906
- CHAUDHARY, L.R. und AVIOLI, L.V. (1996)
Regulation of interleukin-8 gene expression by interleukin-1beta, osteotropic hormones, and protein kinase inhibitors in normal human bone marrow stromal cells.
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 16591-16596

- CHEN, C.-Y., DEL GATTO-KONCZAK, F., WU, Z., KARIN, M. (1998)
Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway
SCIENCE 280, 1945-1948
- CHEN, C.-Y., GHERZI, R., ANDERSEN, J.S., GAIETTA, G., JÜRCHOTT, K., ROYER, H.-D., MANN, M., KARIN, M. (2000)
Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation
GENES & DEVELOPMENT 14, 1236-1248
- CHEN, C.-Y. A. und SHYU, A.-B. (1995)
AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation
TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES 20, 465-470
- CHEN, C.-Y. A., XU, N., SHYU, A.-B. (1995)
MRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from *c-fos* and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 15, 5777-5788
- CLARK, S.C. (1988)
Biological activities of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
INTERNATIONAL JOURNAL OF CELL CLONING 6, 365-377
- COBB, M.H. (1999)
MAP kinase pathways
PROGRESS IN BIOPHYSICS & MOLECULAR BIOLOGY 71, 479-500
- CODY, C.W., PRASHER, D.C., WESTLER, W.M., PRENDERGAST, F.G., WARD, W.W. (1993)
Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein
BIOCHEMISTRY 32, 1212-1218
- CRAWLEY, J.B., RAWLINSON, L., LALI, F.V., PAGE, T.H., SAKLATVALA, J., FOXWELL, M.J. (1997)
T cell proliferation in response to interleukin 2 and 7 requires p38 MAP kinase activation
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 15023-15027
- DAY, D.A. und TUIITE, M.F. (1998)
Post-transcriptional gene regulatory mechanism in eukaryotes: an overview
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 157, 361-371
- DECKER, C.J. und PARKER, R. (1994)
Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes
TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES 19, 336-340

- DEHLIN, E., WORMINGTON, M., KÖRNER, C.G., WAHLE, E. (2000)
Cap-dependent deadenylation of mRNA
THE EMBO JOURNAL 19, 1079-1086
- DEMARIA, C.T., SUN, Y., LONG, L., WAGNER, B.J., BREWER, G. (1997)
Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A+U-rich elements
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 27635-27643
- DERIJARD, B., HIBI, M., WU, I.H., BARRET, T., SU, B., DENG, T., KARIN, M., DAVIS, R.J. (1994)
JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain
CELL 76, 1025-1037
- DERIJARD, B., RAINGEAUD, J., BARRETT, T., WU, I.H., HAN, J., ULEVITCH, R.J., DAVIS, R.J. (1995)
Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms
SCIENCE 267, 682-685
- DETMERS, P.A., LO, S.K., OLSEN-EGBERT, E., WALZ, A., BAGGIOLINI, M., COHN, Z.A. (1990)
Neutrophil-activating protein 1/interleukin-8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils
J. EXP. MED. 171(4), 1155-1162
- DEVARY, Y., GOTTLIEB, R.A., LAU, L.F., KARIN, M. (1991)
Rapid and preferential activation of the *c-jun* gene during the mammalian UV response
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 11, 2804-2811
- DE VOS, S., BRACH, M., BUDNIK, A., GREWE, M., HERRMANN, F., KRUTMANN, J. (1994)
Post-transcriptional regulation of interleukin-6 gene expression in human keratinocytes by ultraviolet B radiation
J. INVEST. DERMATOL. 103, 92-96
- DE WET, J.R., WOOD, K. V., DELUCA, M., HELINSKI, D.R., SUBRAMANI, S. (1987)
Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 7, 725-737
- DHANASEKARAN, N., und REDDY, E.P. (1998)
Signaling by dual specificity kinases
ONCOGENE 17, 1447-1455
- DODEL, R.C., DU, Y., BALES, K.R., LING, Z.D., CAREY, P.M., PAUL, S.M. (1998)
Peptide inhibitors of caspase-3-like proteases attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity of cultured fetal rat mesencephalic dopamine neurons
NEUROSCIENCE 86, 701-707

- DOYLE, G.A., SAARIALHO, U.K., PARKS, W.C. (1997)
Distinct mechanisms regulate TIMP-1 expression at different stages of phorbol ester-mediated differentiation of U937 cells.
BIOCHEMISTRY 36, 2492-2500
- EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M., KAUFMANN, S.H. (1999)
Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis
ANNU REV BIOCHEM 68, 383-424
- el-DEIRY, W.S. (1998)
Regulation of p53 downstream genes
SEMIN CANCER BIOL 8, 345-357
- ELIAS, J.A. und LENTZ, V. (1990)
IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 145, 161-166
- ENGEL, K., SCHULTZ, H., MARTIN, F., KOTLYAROV, A., PLATH, K., HAHN, M., HEINEMANN, U., GAESTEL, M. (1995)
Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 270, 27213-27221
- ENGLARO, W., DÉRIJARD, B., ORTONNE, J.-P., BALLOTTI, R. (1998)
Solar ultraviolet light activates extracellular signal-regulated kinases and the ternary complex factor in human keratinocytes
ONCOGENE 16, 661-664
- ENSLÉN, H., RAINGEAUD, J., DAVIS, R.J. (1998)
Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinase MKK3 and MKK6
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 273, 1741-1748
- FAN, X.C. und STEITZ, J.A. (1998a)
Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increase the *in vivo* stability of ARE-containing mRNAs
THE EMBO JOURNAL 17(12), 3448-3480
- FAN, X.C. und STEITZ, J.A. (1998b)
HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 95, 15293-15298
- FRANKLIN, C.C. und KRAFT, A.S. (1997)
Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells
THE JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 16917-16923

- FRESHNEY, N.W., RAWLINSON, L., GUESDON, F., JONES, E., COWLEY, S., HSUAN, J., SAKLATVALA, J. (1994)
Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in phosphorylation of Hsp27
CELL, 78, 1039-1049
- GALLOUZI, I.-E., BRENNAN, C.M., STENBERG, M.G., SWANSON, M.S., EVERSOLE, A., MAIZELS, N., STEITZ, J.A. (2000)
HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock
PNAS 97, 3073-3078
- GERWINS, P., BLANK, J.L., JOHNSON, G.L. (1997)
Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway
THE JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 8288-8295
- GOSSEN, M. und BUJARD, H. (1992)
Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive element
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89, 5547-5551
- GRAVES, D.T. und JIANG, Y. (1995)
Chemokines, a family of chemotactic cytokines
CRIT. REV. ORAL. BIOL. MED. 6(2), 109-118
- GUAN, Z., BUCKMAN, S.Y., PENTLAND, A.P., TEMPLETON, D.J., MORRISON, A.R. (1998)
Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1→SEK1/MKK4→p38 mitogen-activated protein kinase pathways
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 273, 12901-12908
- GUPTA, S., BARRETT, T., WHITMARSH, A.J., CAVANAGH, J., SLUSS, H.K., DERIJARD, B., DAVIS, R.J. (1996)
Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors
The EMBO Journal 15, 2760-2770
- HAMILTON, B.J., BURNS, C.M., NICHOLS, R.C., RIGBY, W.F.C. (1997)
Modulation of AUUUA response element binding by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in human T lymphocytes
THE JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 28732-28741
- HAN, J., JIANG, Y., LI, Z., KRAVCHENKO, V.V., ULEVITCH, R.J. (1997)
Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation
Nature 386, 269-299
- HAZZALIN CA, CANO E, CUENDA A, BARRATT MJ, COHEN P, MAHADEVAN LC. (1996)
p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient
CURR BIOL. 6,1028-1031

- HE, F., PELTZ, S.W., DONAHUE, J.L., ROSBASH, M., JACOBSON, A. (1993)
Stabilization and ribosome association of unspliced pre-mRNAs in a yeast *upf1*⁻ mutant
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 90, 7034-7038
- HIRAI, S.I., IZAWA, M., OSADA, S.-I., SPYROU, G., OHNO, S. (1996)
Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases MEKK and MUK
ONCOGENE 12, 641-650
- HIRAI, S.I., KATOH, M., TERADA, M., KYRIAKIS, J.M., ZON, L.I., RANA, A., AVRUCH, J., OHNO, S. (1997)
MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 15167-15173
- HIRSCH, D.D. und STORCK, P.J. (1997)
Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress-activated protein kinase pathways *in vivo*
THE JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 4568-4575
- HOLLAND, P., SUZANNE, M., CAMPBELL, J.S., NOSELLI, S., COOPER, J.A. (1997)
MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase functionally related to hemipterous
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 24994-24998
- HOLTMANN, H., ENNINGA, J., KALBLE, S., THIEFES, A., DORRIE, A., BROEMER, M., WINZEN, R., WILHELM, A., NINOMIYA-TSUJI, J., MATSUMOTO, K., RESCH, K., KRACHT, M. (2000)
The MAPKKK TAK1 plays a central role in coupling the IL-1 receptor to both, transcriptional and RNA-targetted mechanisms of gene regulation
JBC PAPERS IN PRESS PUBLISHED ON OCTOBER 24, 2000 AS 10.1074/JBC.M004376200
- HOLTMANN, H., WINZEN, R., HOLLAND, P., EICKEMEIER, S., HOFFMANN, E., WALLACH, D., MALININ, N.L., COOPER, J.A., RESCH, K., KRACHT, M. (1999)
Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcriptional and mRNA Degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 19(10), 6742-6753
- HOUVEN VAN OORDT, W. VAN DER, DIAZ-MECO, M.T., LOZANO, J., KRAINER, A.R., MOSCAT, J., CACERES, J.F. (2000)
The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation
J Cell Biol 149, 307-316

- HUBER, A.R., KUNKEL, S.L., TODD, R.F., WEISS, S.J. (1991)
Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin8
SCIENCE 254(5028), 99-102
- ICHIJO, H., NISHIDA, E., IRIE, K., DIJKE, P.T., SAITOH, M., MORIGUCHI, T.,
TAKAGI, M., MATSUMOTO, K., MIYAZONO, K., GOTOH, Y. (1997)
Induction of apoptosis by ASK-1, a mammalian MAPKKK that activates
SAPK/JNK and p38 signaling pathways
SCIENCE 275, 90-94
- IODANOV, M., BENDER, K., ADE, T., SCHMID, W., SACHSENMAIER, C.,
ENGEL, K., GAESTEL, M., RAHMSDORF, H.J., HERRLICH, P. (1997)
CREB is activated by UVC through p38/HOG-1-dependent protein kinase
THE EMBO JOURNAL 16, 1009-1022
- JACOBSON, A. und PELTZ, S.W. (1996)
Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in
eukaryotic cells
ANNU. REV. BIOCHEM. 65, 693-739
- JANEWAY, C.A. Jr., TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA, J.D. (1999)
Immuno Biology – The Immune System in Health and Disease, Fourth Edition
CURRENT BIOLOGY PUBLICATIONS, ISBN 0-8153-3217-3
- JIANG, Y., GRAM, H., ZHAO, M., NEW, L., GU, J., FENG, L., PADOVA, F.D.,
ULEVITCH, R.J., HAN, J. (1997)
Characterization of the structure and function of the fourth member of p38
group mitogen-activated protein kinases, p38 δ
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 30122-30128
- KAJITA, Y., NAKAYAMA, J., AIZAWA, M., ISHIKAWA, F. (1995)
The UUAG-specific RNA binding protein, heterogeneous nuclear
ribonucleoprotein D0
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 270, 22167-22175
- KASAHARA, T., MUKAIDA, N., YAMASHITA, K., YAGISAWA, H., AKAHOSHI, T.,
MATSUSHIMA, K. (1991)
IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating
factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line
IMMUNOLOGY 74, 60-67
- KATO, Y., KRAVCHENKO, V.V., TAPPING, R.I., HAN, J., ULEVITCH, R.J. LEE, J.-
D. (1997)
BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through
transcription factor MEF2C
THE EMBO JOURNAL 16, 7054-7066
- KEDERSHA, N.L., GUPTA, M., LI, W., MILLER, I., ANDERSON, P. (1999)
RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the
assembly of mammalian stress granules
THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 147, 1431-1441

- KEENE, J.D. (1999)
Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 96, 5-7
- KELNER, G.S., KENNEDY, J., BACON, K.B., KLEYENSTEUBER, S.,
LARGAESPADA, D.A., JENKINS, N.A., COPELAND, N.G., BAZAN, J.F.,
MOORE, K.W., SCHALL, T.J. *et al.* (1994)
Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine
SCIENCE 266(5189), 1395-1399
- KESSLER, O. UND CHASIN, L.A. (1996)
Effects of nonsense mutations on nuclear and cytoplasmic adenine
phosphoribosyltransferase RNA.
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 16, 4426-4435
- KIM, J.H., HAHM, B., KIM, Y.K., CHOI, M., JANG, S.K. (2000)
Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and
cytoplasm
J MOL BIOL 298, 395-405
- KISHORE, R., TEBO, J.M., KOLOSOV, M., HAMILTON, T.A. (1999)
Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated
mRNA destabilization in mouse macrophages
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 162, 2457-2461
- KONDO, S., KONO, T., SAUDER, D.N., MCKENZIE, R.C. (1993)
IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their
modulation by UVB
JOURNAL INVEST. DERMATOL. 101, 690-694
- KUMAR, S. (1999)
Regulation of caspase activation in apoptosis: implications in pathogenesis
and treatment of disease
CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY 26, 295-303
- KYRIAKIS, J.M., APP, H., ZHANG, X.-F., BANERJEE, P., BRAUTIGAN, D.L., RAPP,
U.R., AVRUCH, J. (1992)
Raf-1 activate MAP kinase-kinase
NATURE 358, 417-421
- LAEMMLI, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T4
NATURE 227, 680-685
- LAFON, I., CARBALLE, F., BREWER, G., POIRET, M., MORELLO, D. (1998)
Developmental expression of AUF1 and HuR, two *c-myc* mRNA binding
proteins
Oncogene 16, 3412-3421

- LAI, W.S., CARBALLO, E., STRUM, J.R., KENNINGTON, E.A., PHILLIPS, R.S., BLACKSHEAR, P.J. (1999)
Evidence that Tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 19, 4311-4323
- LANGE-CARTER, C.A., PLEIMAN, C.M., GARDNER, A.M., BLUMER, K.J., JOHNSON, G.L. (1993)
A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK and Raf
SCIENCE 260, 315-319
- LAROIA, G., CUESTA, R., GREWER, G., SCHNEIDER, R.J. (1999)
Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasom pathway
SCIENCE 284, 499-503
- LASA, M., MAHTANI, K.R., FINCH, A., BREWER, G., SAKLATVALA, J., CLARK, A.R. (2000)
Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 20, 4265-4274
- LEE, F.S., HAGLER, J., CHEN, Z.J., MANIATIS, T. (1997)
Activation of the I κ B α kinase complex by MEKK-1, a kinase of the JNK pathway
CELL 88, 213-222
- LEE, J.C., LAYDON, J.T., McDONNELL, P.C., GALLAGHER, T.F., KUMAR, S., GREEN, D., McNULTY, D., BLUMENTHAL, M.J., HEYS, J.R., LANDVATTER, S.W., STRICKLER, J.E., McLAUGHLIN, M.M., SIEMENS, I.R., FISHER, S.M., LIVI, G.P., WHITE, J.R., ADAMS, J.L., YOUNG, P.R. (1994)
A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis
NATURE 372, 739-746
- LEE, N.H. und MALEK, R.L. (1998)
Nerve growth factor regulation of m4 muscarinic receptor mRNA stability but not gene transcription requires mitogen-activated protein kinase activity
The Journal of Biological Chemistry 273, 22317-22325
- LEVERKUS, M., YAAR, M., ELLER, M.S., TANG, E.H., GILCHREST, B.A. (1998)
Post-transcriptional regulation of UV induced TNF-alpha expression
J. INVEST. DERMATOL. 110, 353-357
- LEVY, N.S., CHUNG, S., FURNEAUX, H., LEVY, A.P. (1998)
Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 273, 6417-6423

- LI, M., ONA, V.O., GUEGAN, C., CHEN, M., JACKSON-LEWIS, V., ANDREWS, L.J., OLSZEWSKI, A.J., STIEG, P.E., LEE, J.P., PRZEDBORSKI, S., FRIEDLANDER, R.M. (2000)
Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model
SCIENCE 288, 335-339
- LILES, W.C. und VAN VOORHIS, W.C. (1995)
Review: Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response
THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 172, 1573-1580
- LIN, L.L., WARTMANN, M., LIN, A.Y., KNOPF, J.L., SETH, A., DAVIS, R.J. (1993)
cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase
CELL 72, 269-278
- LOFLIN, P., CHEN, C.-Y. A., SHYU, A.-B. (1999)
Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the *in vivo* mRNA destabilization directed by the AU-rich element
GENES & DEVELOPMENT 13
- LUDWIG, S., ENGEL, K., HOFFMEYER, A., SITHANANDAM, G., NEUFELD, B., PALM, D., GAESTEL, M., RAPP, U.R. (1996)
3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 16, 6687-6697
- MA, W.-J., CHUNG, S., FURNEAUX, H. (1997)
The ELAV-like proteins bind to AU-rich elements and the poly(A) tail of mRNA
NUCLEIC ACIDS RESEARCH 25, 3564-3569
- MACK, A., FÜHRMANN, C., HÄCKER, G. (2000)
Detection of caspase-activation in intact lymphoid cells using standard caspase substrates and inhibitors
JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 241, 19-31
- MANSOUR, S.J., MATTEN, W.T., HERMANN, A.S., CANDIA, J.M., RONG, S., FUKASAWA, K., VANDE WOUDE, G.F., AHN, N.G. (1994)
Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase
SCIENCE 265, 966-970
- McLAUGHLIN, M.M., KUMAR, S., McDONNELL, P.C., HORN, S.V., LEE, J.C., LIVI, G.P., YOUNG, P.R. (1996)
Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 8488-8492
- MILLER, C.C., HALE, P., PENTLAND, A.P. (1994)
Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 269, 3529-3533

- MING, X.-F., KAISER, M., MORONI, C. (1998)
c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells
THE EMBO JOURNAL 17(20), 6039-6048
- MORIGUCHI, T., TOYOSHIMA, F., GOTOH, Y., IWAMATSU, A., IRIE, K., MORI, E., KUROYANAGI, N., HAGIWARA, M., MATSUMOTO, K., NISHIDA, E. (1996)
Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor- α , and H₂O₂
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 26981-26988
- MUDA, M., THEODOSIOU, A., RODRIGUES, N., BOSCHERT, U., CAMPS, M., GILLIERON, C., DAVIES, K., ASHWORTH, A., ARKINSTALL, S. (1996)
The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 27205-27208
- NAGATA, S. (2000)
Apoptotic DNA fragmentation
EXP CELL RES 256, 12-18
- NEMOTO, S., DIDONATO, J.A., LIN, A. (1998)
Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF κ B inducing kinase
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 18, 7336-7343
- NG, S.B., TAN, Y.H., GUY, G.R. (1994)
Differential induction of the interleukin-6 gene by tumor necrosis factor and interleukin-1
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 269, 19021-19027
- NICHOLSON, D.W. und THORNBERRY, N.A. (1997)
Caspases: killer proteases
TRENDS BIOCHEM SCI 22, 299-306
- NICOTERA, P. (2000)
Caspase requirement for neuronal apoptosis and neurodegeneration
IUBMB LIFE 49, 421-425
- NINOMIYA-TSUJI, J., KISHIMOTO, K., HIYAMA, A., INOUE, J., CAO, Z., MATSUMOTO, K. (1999)
The kinase TAK1 can activate the NIK kappa B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway
NATURE 398, 252-256
- PENG, S. S.-Y., CHEN, C.-Y. A., XU, N., SHYU, A.-B. (1998)
RNA stabilisation by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein
THE EMBO JOURNAL 17, 3461-3470

- PENG, X., ANGELASTRO, J.M., GREENE, L.A. (1996)
Tyrosine phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase 4 in response to growth factors
J. Neurochem. 66, 1191-1197
- PIMENTEL, E. (1990)
Colony-stimulating factors
ANN. CLIN. LAB. SCI. 20(1), 36-55
- POSADA, J., YEW, N., AHN, N.G., VANDE WOUDE, G.F., COOPER, J.A. (1993)
Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase *in vitro*
Molecular and Cellular Biology 13, 2546-2553
- PRIESCHL, E.E., KULMBURG, P.A., BAUMRUKER, T. (1995)
The nomenclature of cytokines
INT. ARCH. ALLERGY IMMUNOL 107, 475-483
- PROOST, P., WUYTS, A., VAN DAMME, J. (1996)
The role of chemokines in inflammation
INT. J. CLIN. LAB. RES. 26, 211-223
- RAINGEAUD, J., GUPTA, S., ROGERS, J.S., DICKENS, M., HAN, J., ULEVITCH, R.J., DAVIS, R.J. (1995)
Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 270, 7420-7426
- RAINGEAUD, J., WHITMARSH, A.J., BARRETT, T., DERIJARD, B., DAVIS, R.J. (1996)
MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway
Molecular and Cellular Biology 16, 1247-1255
- RANA, A., GALLO, K., GODOWSKI, P., HIRAI, S.-I., OHNO, S., ZON, L., KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. (1996)
The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 19025-19028
- ROBERTSON, J.D. und ORRENIUS, S. (2000)
Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals
CRIT. REV. TOXICOL. 30, 609-627
- ROUSSE, J., COHEN, P., TRIGON, S., MORANGE, M., ALONSO-LIAMAZARES, A., ZAMANILLA, D., HUNT, T., NEBRED, A.R. (1994)
A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins
CELL 78, 1027-1037

- SACHS, A.B. (1993)
Messenger RNA degradation in eukaryotes
CELL 74, 413-421
- SACHSENMAIER, C., RADLER-POHL, A., ZINCK, R., NORDHEIM, A., HERRLICH, P., RAHMSDORF, H.J. (1994)
Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response
CELL 78, 963-972
- SALMERON, A., AHMAD, T.B., CARLILE, G.W., PAPPIN, D., NARSIMHAN, R.P., LEY, S.C. (1996)
Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase
THE EMBO JOURNAL 15, 817-826
- SAUMA, S. und FRIEDMANN, E. (1996)
Increased expression of protein kinase C beta activates ERK3
The Journal of Biological Chemistry 271, 11422-11426
- SCHAEFFER, H.J. und WEBER, M.J. (1999)
Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers
Molecular and Cellular Biology 19, 2435-2444
- SCHALL, T.J. (1991)
Biology of the RANTES/SIS cytokine family
CYTOKINE 3(3), 165-183
- SCHIAVONE, N., ROSINI, P., QUATTRONE, A., DONNINI, M., LAPUCCI, A., CITTI, L., BEVILACQUA, A., NICOLIN, A., CAPPACIOLI, S. (2000)
A conserved AU-rich element in the 3' untranslated region of *bcl-2* mRNA is endowed with a destabilizing function that is involved in *bcl-2* down-regulation during apoptosis
FASEB J. 14, 174-184
- SCHULZE-OSTHOFF, K., FERRARI, D., RIEHEMANN, K., WESSELBORG, S. (1997)
Regulation of NF- κ B activation by MAP kinase cascades
IMMUNOBIOLOGY 198, 35-49
- SCHWARZ, T. und LUGER, T.A. (1989)
Effect of UV irradiation on epidermal cell cytokine production
JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B 4, 1-13
- SHAW, G. und KAMEN, R. (1986)
A conserved AU sequence from the 3' untranslated Region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation
CELL 46, 659-667

- SHEARWIN-WHYATT, L.M. und KUMAR, S. (1999)
Caspases in developmental cell death
IUBMB LIFE 48, 143-150
- SHIBUYA, H., YAMAGUCHI, K., SHIRAKABE, K., TONEGAWA, A., GOTOH, Y., UENO, N., IRIE, K., NISHIDA, E., MATSUMOTO, K. (1996)
TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- β signal transduction
SCIENCE 272, 1179-1182
- SHIMIZU, H., BANNO, Y., SUMI, N., NAGANAWA, T., KITAJIMA, Y., NOZAWA, Y. (1999)
Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells
J. INVEST. DERMATOL. 112, 769-774
- SHIRAKABE, K., YAMAGUCHI, K., SHIBUYA, H., IRIE, K., MATSUDA, S., MORIGUCHI, T., GOTOH, Y., MATSUMOTO, K., NISHIDA, E. (1997)
TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 8141-8144
- SHYU, A.-B., BELASCO, J.G., GREENBERG, M.E. (1991)
Two distinct destabilizing elements in the *c-fos* message trigger deadenylation as first step in rapid mRNA decay
GENES & DEVELOPMENT 6, 221-231
- SIRENKO, O.I., LOFQUIST, A.K., DEMARIA, C.T., MORRIS, J.S., BREWER, G., HASKILL, S.J. (1997)
Adhesion-dependent regulation of an A+U-rich element-binding activity associated with AUF1
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 17, 3898-3906
- STEARNS, T. (1995)
The green revolution
CURRENT BIOLOGY 5, 262-264
- STEIN, B., BRADY, H., YANG, M.X., YOUNG, D.B., BARBOSA, M.S. (1996)
Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 11427-11433
- STEIN, B., RAHMSDORF, H.J., STEFFEN, A., LITFIN, M., HERRLICH, P. (1989)
UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, *c-fos*, and metallothionein
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 9, 5169-5181
- STOECKLE, M.Y. (1991)
Post-transcriptional regulation of *gro* α , β , γ , and IL-8 mRNAs by IL-1 β
NUCLEIC ACIDS RES. 19, 917-920

- STOKOE, D., CAMPBELL, D.G., NAKIELNY, S., HIDAKA, H., LEEVERS, S.J., MARSHALL, C., COHEN, P. (1992)
MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase
THE EMBO JOURNAL 11, 3985-3994
- TAKEKAWA, M., POSAS, F., SAITO, H. (1997)
A human homolog of the yeast Ssk/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways
The EMBO Journal 16, 4973-4982
- TAN, Y., ROUSE, J., ZHANG, A., CARIATI, S., COHEN, P., COMB, M.J. (1996)
FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2
THE EMBO JOURNAL 15, 4629-4642
- TOBLER, A., MEIER, R., SEITZ, M., DEWALD, B., BAGGIOLINI, M., FEY, M.F. (1992)
Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts.
BLOOD 79, 45-51
- TYRRELL, R.M. (1995)
Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight- from models to reality
BioEssays 18, 139-148
- VAILLANCOURT, R.R., GARDNER, A.M., JOHNSON, G.L. (1994)
Raf-dependent regulation of the MEK-1/mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells and regulation by cyclic AMP
Molecular and Cellular Biology 14, 6522-6530
- VAN RANST, M., NORGA, K., MASURE, S., PROOST, P., VANDEKERCKHOVE, F., AUWERX, J., VAN DAMME, J., OPDENAKKER, G. (1991)
The cytokine-protease connection: identification of a 96-kD THP-1 gelatinase and regulation by interleukin-1 and cytokine inducers
CYTOKINE 3, 231-239
- VILLARETE, L.H. und REMICK, D.G. (1996)
Transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin-8.
AM J PATHOL. 149,1685-1693
- WAGNER, B.J., DEMARIA, C.T., SUN, Y., WILSON, G.M., BREWER, G. (1998)
Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms
GENOMICS 48, 195-202
- WALZ, A., PEVERI, P., ASCHAUER, H., BAGGIOLINI, M. (1987)
Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 149(2), 755-761

- WANG, J. und LENARDO, M.J. (2000)
Roles of caspases in apoptosis, development and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies
JOURNAL OF CELL SCIENCE 113 (PT 5), 753-757
- WANG, W., FURNEAUX, H., CHENG, H., CALDWELL, M.C., HUTTNER, D., LIU, Y., HOLBROOK, N., GOROSPE, M. (2000)
Hur regulates p21 mRNA stabilization by UV light
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 20, 760-769
- WANG, X.S., DIENER, K., MANTHEY, C.L. WANG, S., ROSENZWEIG, B., BRAY, J., DELANEY, J., COLE, C.N., CHAN-HUI, P.Y. MANTLO, N., LICHENSTEIN, H.S. ZUKOWSKI, M., YAO, Z. (1997)
Molecular cloning and characterization of a novel p 38 mitogen-activated protein kinase
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272, 23668-23674
- WANG, X.Z. und RON, D. (1996)
Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase
Science 272, 1347-1349
- WARD, S.G., PARRY, R.V., MATTHEWS, J., O'NEILL, J. (1997)
A p38 MAP kinase inhibitor SB203580 inhibits CD28-dependent T cell proliferation and IL-2 production
Biochem Soc Trans 25, 304S
- WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M.B. JOHNSON, G.L. (1999)
Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human
PHYSIOLOGICAL REVIEW 79, 143-180
- WILSON, T. und TREISMANN, R. (1988)
Removal of poly(A) and consequent degradation of *c-fos* mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences
NATURE 336, 396-399
- WINZEN, R., KRACHT, M., RITTER, B., WILHELM, A., CHEN, C.-Y.A., SHYU, A.-B., MÜLLER, M., GAESTEL, M., RESCH, K., HOLTMANN, H. (1999)
The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism
THE EMBO JOURNAL 18(18), 4969-4980
- WODNAR-FILIPOWICZ, A. und MORONI, C. (1990)
Regulation of interleukin 3 mRNA expression in mast cells occurs at the posttranscriptional level and is mediated by calcium ions
PRO. NATL. ACAD. SCI. USA 87, 777-781

- WOO, M., HAKEM, R., SOENGA, M.S., DUNCAN, G.S., SHAHINIAN, A., KÄGI, D., HAKEM, A., McCURRACH, M., KHOO, W., KAUFMAN, S.A., SENALDI, G., HOWARD, T., LOWE, S.W., MAK, T.W. (1998)
Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes
GENES & DEVELOPMENT 12, 806-819
- WU, X., NOH, S.J., ZHOU, G., DIXON, J.E., GUAN, K.-L. (1996)
Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated HeLa cells
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271, 3265-3271
- XU, N., CHEN, C.-Y. A. SHYU, A.-B. (1997)
Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 17, 4611-4621
- XU, N., LOFLIN, P., CHEN, C.-Y. A. SHYU, A.-B. (1998)
A broader role for AU-rich element-mediated mRNA-turnover revealed by a new transcriptional pulse strategy
Nucleic Acids Research 26, 558-565
- YAMAGUCHI, K., SHIRAKABE, K., SHIBUYA, H., IRIE, K., OISHI, I., UENO, N., TANIGUCHI, T., HISHIDA, E., MATSUMOTO, K. (1995)
Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction
SCIENCE 270, 2008-2011
- YAMAIZUMI, M. und SUGANO (1994)
U.v.-induced nuclear accumulation of p53 is evoked through DNA damage of actively transcribed genes independent of the cell cycle
ONCOGENE 9, 2775-2784
- YAN, M., DAL, T., DEAK, J.C., KYRIAKIS, J.M., ZON, L.I., WOODGETT, J.R., TEMPLETON, D.J. (1994)
Activation of stress-activated protein kinase by MEKK-1 phosphorylation of its activator SEK1
NATURE 372, 798-800
- YANG, D.D., KUAN, C.Y., WHITMARSH, A.-J., RINCON, M., ZHENG, T.S., DAVIS, R.J., RAKIC, P., FLAVELL, R.A. (1997)
Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the JNK3 gene
NATURE 389, 865-870
- YOUNG, P., McDONNELL, P., DUNNINGTON, D., HAND, A., LAYDON, J., LEE, J. (1993)
Pyridinyl imidazoles inhibit IL-1 and TNF production at the protein level
Agents Actions 39 Spec No:C67-69

- YUJIRI, T., SATHER, S., FANGER, G.R., JOHNSON, G.L. (1998)
Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption
SCIENCE 282, 1911-1914
- ZERVOS, A.S., FACCIO, L., GATTO, J.P., KYRIAKIS, J.M., BRENT, R. (1995)
Mxi2, mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein
PRO. NATL. ACAD. SCI. USA 92, 10531-10534
- ZHANG, W., WAGNER, B.J., EHRENMANN, K., SCHAEFER, A.W., DEMARIA, C.T., CRATER, D., DEHAVEN, K., LONG, L., BREWER, G. (1993)
Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF-1
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 13, 7652-7665
- ZHANG, Y., McCLUSKEY, K., FUJII, K., WAHL, L.M. (1998)
Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF- α , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 β through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 161, 3071-3076

Lebenslauf

Name : Arno Wilhelm

geboren am : 21.11.1973

geboren in : Hannover

Ausbildung : 1980-1984 Brüder-Grimm-Schule Hannover,
Grundschule

1984-1986 Gottfried-Keller-Straße Hannover,
Orientierungsstufe

1986-1993 Käthe-Kollwitz-Schule Hannover,
Gymnasium

14.05.1993 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

1993-1998 Studium der Biologie, Universität Hannover

Hauptfach : Genetik

Nebenfächer: Mikrobiologie

Biochemie

Immunologie

Diplomarbeit im Lehrgebiet Molekulargenetik der
Universität Hannover (Prof. Dr. H.J. Jacobsen)

30.09.1998 Diplom im Fachbereich Biologie

ab 01.11.1998 Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover,

Institut für Pharmakologie (Prof. Dr. K. Resch),

Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Holtmann

Assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs

„Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und
ihrer Zielproteine“

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfarbeit verwendet wurde.

Arno Wilhelm

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. K. Resch danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung und das Interesse an meiner Arbeit.

Besonders danke ich Prof. Dr. Helmut Holtmann für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die Betreuung und das Referat meiner Arbeit.

Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Dr. Ursula Dreikhausen bedanke ich mich für die kritischen Anmerkungen zu dem Manuskript.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Pharmakologie bedanke ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere bedanke ich mich bei den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Holtmann: Birgit Ritter, Frank Bollig und Reiner Winzen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Sandra Mischke und meinen Freunden und Freundinnen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.