

**Untersuchungen zur Funktion
von MAP Kinase Kinase 7 (MKK7) auf mRNA und
Proteomebene durch regulierbare Expression von aktiven
und inaktiven MKK7 Mutanten
in der humanen Zelllinie HEK293**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochemikerin Sabine Wolter

geboren am 20. November 1964 in Wolfenbüttel

2000

Referent: Prof. Dr. W. H. Müller

Korreferent: PD Dr. M. Kracht

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Kracht am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leitung: Prof. Dr. K. Resch) im Rahmen des SFB 244 / B18 „Chronische Entzündung“ durchgeführt.

Tag der Promotion: 19.12.2000

ZUSAMMENFASSUNG

Durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 oder zellulären Stress erfolgt die Aktivierung von Jun N-terminalen Proteinkinase (JNK). Obwohl bereits viele involvierte Moleküle des JNK Signalweges identifiziert werden konnten, sind die zellbiologischen Auswirkungen seiner Aktivierung unzureichend geklärt.

Um diese Fragestellung zu untersuchen wurde ein System etabliert, um durch den spezifischen JNK Aktivator, MAP Kinase Kinase 7 (MKK7), den Signalweg in intakten Zellen zu aktivieren. Verschiedene Mutanten von MKK7 wurden an das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert und zellulär klonierte HEK293 Zelllinien hergestellt, die mit Hilfe von Ekdyson-responsiven Promotoren eine regulierbare Expression der Fusionsproteine erlauben.

Die Induktion mit den synthetischen Ekdyson Analoga Ponasteron oder Muristeron zeigte eine dosis- und zeitabhängige Expression der MKK7 Fusionsproteine anhand von Western-Blot Untersuchungen mit anti-GFP und anti-MKK7 Antikörpern. In nicht-induzierten Zellen war keine Expression detektierbar.

Durch die Expression der konstitutiv aktiven Mutante GFP-MKK7_{3E}, aber nicht durch die inaktiven Mutanten GFP-MKK7_{3A} und GFP-MKK7_{K149M}, konnte eine spezifische Aktivierung endogener JNK1 und JNK2 Isoformen erreicht werden. Eine Aktivierung des ERK2 oder des p38 MAPK Signalweges durch die GFP-MKK7 Proteine wurde nicht festgestellt.

Die von MKK7-abhängigen zellulären Veränderungen sollten durch Untersuchungen der Genexpression auf mRNA Ebene und auf Proteinebene erfasst werden. Hierbei wurde jeweils die Genexpression einer Zelllinie vor und nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} verglichen. Auf mRNA Ebene konnten mit dem verwendeten *cDNA array* keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen in der Genexpression von 588 mRNAs festgestellt werden.

Für die Proteomuntersuchungen wurden 2D Elektrophoresen zellulärer Proteine unter Verwendung von immobilisierten pH Gradienten verschiedener Bereiche und Längen durchgeführt, wobei die Proteine durch Silberfärbung und Fluoreszenzfarbstoffe oder nach metabolischer Markierung mit ³²P oder ³⁵S detektiert wurden. Zusammenfassend zeigen die Analysen von ca. 1500-2000 Proteinspots, dass nur in präparativen Gelen mit einer extrem sensitiven Silberfärbung oder durch metabolische Markierung und Auftrennung der Proteine auf engen pH Gradienten

einige wenige GFP-MKK7_{3E}- abhängige Proteinveränderungen detektierbar waren. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen dieser Proteine liegen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass in einem exakt definierten regulierbaren Expressionssystem der Einfluss einer aktiven GFP-MKK7_{3E} Mutante auf die globale Proteinexpression von HEK293 Zellen nur Proteine betrifft, die mit den etablierten Nachweismethoden der Proteomanalytik kaum erfassbar sind.

MKK7, Ecdyson-induzierbares Expressionssystem, Proteomanalysen

Abstract

Pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, or cellular stress activate Jun N-terminal protein kinases (JNK). Although many components of the JNK pathway have been identified, information on the cellular consequences of its activation is still limited.

Therefore a strategy was employed to activate the JNK pathway by the specific upstream activator, MAP kinase kinase 7 (MKK7), in intact cells. Different mutants of MKK7 were fused to GFP and expressed in HEK293 cells under the control of an ecdysone responsive promoter. Treatment of clonal cell lines with the synthetic ecdysone analogues ponasterone or muristerone showed time- and dose-dependent expression of fusion proteins as analyzed by western blot using α -GFP and α -MKK7 antibodies. No significant expression was observed in non-induced cells. Expression of the constitutive active mutant GFP-MKK7_{3E}, but not of the inactive mutants GFP-MKK7_{3A} or GFP-MKK7K_{149M}, increased the activity of endogenous JNK1 and JNK2 isoforms. GFP-MKK7 proteins did not activate ERK or p38 MAP kinases.

MKK7-dependent changes in gene expression were analyzed at the mRNA and protein level. This was achieved by comparing gene expression of a cell line before and after induction of GFP-MKK7_{3E}. cDNA array based analysis of 588 mRNA species did not reveal any reproducible changes between induced and non-induced cells.

Proteome investigations were performed by separating cellular proteins by 2-dimensional electrophoresis using various immobilized pH gradients and gels of different length. Proteins were detected by silver staining and fluorescent dyes or by *in-vivo* labeling with ³²P and ³⁵S. Collectively about 1500-2000 different proteins have been analysed. A few GFP-MKK7_{3E}-dependent changes were detectable only after preparative gel electrophoresis followed by high sensitivity silver staining or by narrow pH gradient gels of ³⁵S labelled proteins. At present these proteins are being analysed by mass spectrometry. In conclusion these data suggest that in a well-defined system, inducible expression of the GFP-MKK7_{3E} mutant only affects those proteins of HEK293 cells, whose expression is barely detectable with current proteome analysis methods.

MAP kinase kinase 7/ ecdyson-inducible expression/ proteome analysis

	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Proteinkinasen.....	1
1.2	MAP Kinasen.....	1
1.2.1	Einteilung der MAP Kinasen.....	2
1.2.2	Spezifität innerhalb der MAP Kinasekaskaden.....	3
1.3	Der ERK Signalweg.....	5
1.4	Der p38 MAPK Signalweg.....	6
1.5	Der JNK Signalweg.....	7
1.5.1	Extrazelluläre Aktivierung des JNK Signalweges.....	8
1.5.2	MAPK Kinasen Kinasen (MKKK) des JNK Signalweges.....	9
1.5.3	Die MKK des JNK Signalweges.....	10
1.5.3.1	Extrazelluläre Aktivierung von MKK7.....	13
1.5.3.2	MAPK Kinasen Kinasen , die MKK7 aktivieren.....	13
1.5.4	Aktivierungsmechanismus von JNK durch MKK4 und MKK7.....	14
1.5.5	Zielmoleküle des JNK-Signalweges.....	15
1.5.6	„Knock-out“ Untersuchungen zu Molekülen aus dem JNK-Signalweg.....	16
1.6	Fragestellung.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Geräte.....	19
2.2	Materialien.....	20
2.2.1	Chemikalien.....	20
2.2.2	Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits.....	20
2.2.3	Antikörper und rekombinante Proteine.....	21
2.2.4	Plasmide.....	23
2.2.5	Primer.....	23
2.3	Zellkultur.....	24
2.3.1	Zelllinien.....	24
2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	25
2.3.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	25
2.3.4	Stimulation von Zellen.....	26
2.4	Präparative und analytische Methoden für Proteine.....	26
2.4.1	Präparation von Proteinen aus einem Ganzzelllysat.....	26
2.4.2	Präparation von zytosolischen Extrakten und Kernextrakten.....	28
2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	29
2.4.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE).....	29
2.4.5	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot).....	31
2.4.6	Immundetektion transferierter Proteine mittels Chemilumineszenz (ECL).....	32
2.4.7	Färbung von Proteingelen mit Coomassie.....	33
2.4.8	Aufreinigung von Kinasen mit Ionenaustauscherchromatographie.....	33

2.5	Aktivitätsbestimmung von Proteinkinasen.....	34
2.5.1	<i>In-vitro</i> Kinase Versuch mit Ganzzellysaten.....	35
2.5.2	<i>In-vitro</i> Kinase Versuch nach Immunpräzipitation.....	36
2.6	Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen.....	36
2.6.1	Kalzium Phosphat Transfektion.....	37
2.6.2	Liposomale Transfektion mit Dospere.....	38
2.7	Zelluläre Klonierung.....	39
2.7.1	Herstellung stabiler Transfektanten-Zellpools.....	39
2.7.2	Einzelzellklonierung von Transfektanten mit Hilfe des <i>Limiting Dilution</i> Verfahrens.....	39
2.8	Expression von Reporter-gen-Konstrukten.....	40
2.8.1	Photometrische Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität.....	40
2.8.2	Histochemischer Nachweis der β -Galaktosidase (X-Gal Färbung).....	41
2.9	Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren.....	41
2.9.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	41
2.9.2	Gelelektrophoretische Auftrennung.....	42
2.9.3	Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorptionsmessung.....	43
2.9.4	Polymerase Ketten Reaktion (PCR) und RT-PCR.....	43
2.9.5	Umklonierung.....	45
2.9.6	Agarosegelelektrophorese und Northern Blotting von RNA.....	48
2.9.7	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	50
2.10	Zweidimensionale Elektrophorese von Ganzzellysaten.....	51
2.10.1	Vorbereitung und Lyse der Zellen.....	51
2.10.2	Isoelektrische Fokussierung mit der IPGPhor.....	52
2.10.3	Isoelektrische Fokussierung mit der Multiphor II.....	53
2.10.4	SDS-PAGE (2. Dimension der 2 D Elektrophorese).....	54
2.10.5	Silberfärbung von Proteingelen.....	54
2.10.6	Silberfärbung von Proteingelen... (Ammoniacal Silver (Diamine) Staining/Geneva.....	54
2.10.7	Färbung mit fluoreszierenden Farbstoffen.....	56
2.10.8	<i>In-vivo</i> Markierung von Proteinen mit ^{32}P ortho-Phosphat und anschließender 2D-Elektrophorese.....	56
2.10.9	<i>In-vivo</i> Markierung von Proteinen mit ^{35}S und anschließender 2D-Elektrophorese.....	57
2.10.10	Immunpräzipitation nach <i>in-vivo</i> Markierung mit ^{35}S	58
2.11	Atlas Human cDNA <i>Expression Array</i>	60
2.12	FACS Untersuchungen.....	62

3	Ergebnisse	63
3.1	Funktionelle Charakterisierung von regulierbarer und konstitutiver Expression von GFP-MKK7	63
3.1.1	Klonierung der GFP-MKK7 cDNAs in den Expressionsvektor pIND	63
3.1.2	Vergleich der Aktivität von MKK7 fusioniert an MYC oder GFP Polypeptide unter transienten Transfektionsbedingungen.....	67
3.1.2.1	Nachweis der Proteinexpression.....	67
3.1.2.2	Nachweis der Aktivität der verschiedenen MKK7 Fusionsproteine.....	68
3.1.3	Etablierung des induzierbaren Ekdysen Expressionssystems.....	71
3.1.3.1	Nachweis des humanen Retinoid X Rezeptors RxRa in HEK293 und EcR-293 Zellen	72
3.1.3.2	Ekdysen regulierbare Expression von β -Galaktosidase unter transienten Transfektionsbedingungen mit EcR-293 Zellen	73
3.2	Etablierung stabil transfizierter Zelllinien nach Einzelzellklonierung.....	74
3.2.1	Zeit- und Dosis abhängige induzierbare Expression von GFP-MKK7 _{3E}	77
3.2.2	Charakterisierung der basalen GFP-MKK7 _{3E} Proteininduktion in dem Klon E10 auf mRNA und Proteinebene	81
3.2.2.1	Nachweis von GFP-MKK7 _{3E} auf mRNA Ebene.....	81
3.2.2.2	Nachweis auf Proteinebene	82
3.2.2.3	Überprüfung der Expression von GFP-MKK7 _{3E} auf Einzelzellniveau im Klon E10.....	84
3.3	Auswirkungen der regulierbaren Expression von GFP-MKK7 auf die Signaltransduktion.....	86
3.3.1	Funktionelle Analyse ausgewählter Klone.....	86
3.3.3.1	Einfluß verschiedener Stimuli auf den JNK Signalweg am Bsp. von Klon E4.....	89
3.3.2	Aktivierung von JNK Isoformen durch MKK7 am Bsp. von Klon E10.....	91
3.3.3	Aktivierung von JNKs durch MKK7 _{3E} und verminderte Aktivierung durch MKK7 _{3A} in unterschiedlichen Zellkompartimenten	94
3.3.4	Direkte Messung der MKK7 Aktivität <i>in-vitro</i> nach Induktion von GFP-MKK7.....	96
3.3.5	Untersuchungen des JNK Signalweges nach Induktion von MKK7 Wildtyp und konstitutiv inaktiven Mutanten von MKK7	98
3.3.6	Einfluß der induzierbaren Expression von GFP-MKK7 auf andere MAP Kinasen.....	101
3.4	Funktionelle Auswirkung der Induktion von GFP-MKK7 _{3E} auf die Genexpression in den Klonen E4 und E10	104
3.4.1	Vergleich der mRNA Expression vor und nach Induktion von GFP-MKK7 _{3E} mittels Untersuchungen mit dem Atlas™ cDNA <i>expression array</i> (Clontech).....	104

3.4.2	Vergleich der Proteinexpressionsmuster vor und nach Induktion der Expression von GFP-MKK7 _{3E} mit Hilfe von zwei-dimensionaler Elektrophorese unter Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten.....	108
3.4.2.1	2D-Elektrophorese unter Verwendung von 13 cm IPG-Streifen.....	108
3.4.2.2	Auswertung der Gele: <i>Phoretix</i> 2D Analyse-Programm.....	112
3.4.2.3	Proteomuntersuchungen unter Verwendung von 18 cm IEF Streifen und der <i>Hofer Iso Dalt</i> Kammer	114
3.4.2.4	Bestimmung der Nachweisgrenze von BSA bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Sypro Ruby	117
3.4.2.5	Trennung von Proteingemischen mittels 2D-Elektrophorese unter Verwendung von 18 cm Streifen und Detektion der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	118
3.4.3	2D-Elektrophorese nach in-vivo Markierung mit ³² P-ortho Phosphat oder ³⁵ S-Methionin/Cystein	122
3.4.3.1	<i>In-vivo</i> Markierung von Phosphoproteinen mit ³² P-ortho Phosphat.....	123
3.4.3.2	<i>In-vivo</i> Markierung von Proteinen mit ³⁵ S-Methionin/Cystein.....	125
3.4.3.3	2D-Elektrophorese von mit ³⁵ S markierten sezernierten Proteinen.....	129
4	Diskussion	131
5	Zusammenfassung	147
6	Anhang	149
6.1	MKK7 - Isoformen.....	149
6.2	Nukleotidsequenz der MKK7a mRNA.....	150
7	Literatur	151

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampillicilin
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense
ATF-4	<i>activating transcription factor 4</i>
bidest	bidestilliert
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie; $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/Sekunde
CMV	Cytomegalo-Virus
Cpm	counts per minute (Zerfälle/Minute)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMEM	Dulbeco-modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanner (Fluoreszenzaktivierter Zellscanner)
FKS	fetal calf serum (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)
FRA-2	<i>Fos-related antigen 2</i>
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$) bzw. Gramm (Masse)
GFP	grünfluoreszierendes Protein

GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinethan-sulfonsäure
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1 α , β	Interleukin 1 alpha, beta
IP	Immunpräzipitation
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
JNK	Jun-N-terminale Kinase
KB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MOPS	3-(n-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NF κ B	Kernfaktor κ B
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NP-40	Nonidet [®] P-40
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline(Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
s	sense
s.	siehe
sec	Sekunde
SAPK	Streß-aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Saline Sodium Citrat (Natriumzitat-Kochsalzlösung)
SSPE	Saline Sodium Phosphat EDTA (Natriumphosphat-EDTA-Kochsalzlösung)
SV40	<i>Siamin Virus 40</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
taq-Pol.	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unit (Einheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp

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

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

1 EINLEITUNG

1.1 Proteinkinasen

Die reversible Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten durch Proteinkinasen ist eines der am häufigsten verwendeten Prinzipien zur Regulation der Aktivität von Proteinen. Alle Proteinkinasen der Eukaryoten besitzen im Aufbau vergleichbare homologe Kinasedomänen, die die katalytische Untereinheit bilden. Sie bestehen aus ca. 250-300 Aminosäuren (Hanks *et al.*, 1988), die in 12 konservierte Subdomänen unterteilt werden können, welche eine ähnliche dreidimensionale Struktur einnehmen (Blank *et al.*, 1996).

Die Kinasereaktion kann in folgende Abschnitte unterteilt werden: Bindung und Orientierung von ATP (oder GTP) als Phosphat-Donor in einem Komplex mit Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen, Bindung und Orientierung des Substrats (Protein oder Peptid), sowie Übertragung des γ -Phosphats vom ATP (oder GTP) auf die Hydroxyl-Akzeptorgruppe (Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest) des Substrats (Hanks *et al.*, 1988).

Proteinkinasen sind wichtige Komponenten der intrazellulären Signalleitung. Ein Beispiel dafür ist die Gruppe der MAP Kinasen (Mitogen aktiviert e Proteinkinase).

1.2 MAP Kinasen

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskaden stellen wichtige Signaltransduktionssysteme dar, die es der Zelle erlauben auf vielfältige extrazelluläre Stimuli zu reagieren. Es werden Signale von Rezeptoren an der Zelloberfläche über sequentiell aktivierte Proteinkinasen in den Zellkern geleitet. Dort erfolgt die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren oder anderen Protein-substraten, wodurch letztendlich die Genexpression beeinflusst wird. Viele Komponenten dieser Kaskaden sind stark konserviert. Homologe Proteine findet man bei Hefen, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und in Säugerzellen (Widmann *et al.*, 1999).

1.2.1 Einteilung der MAP Kinasen

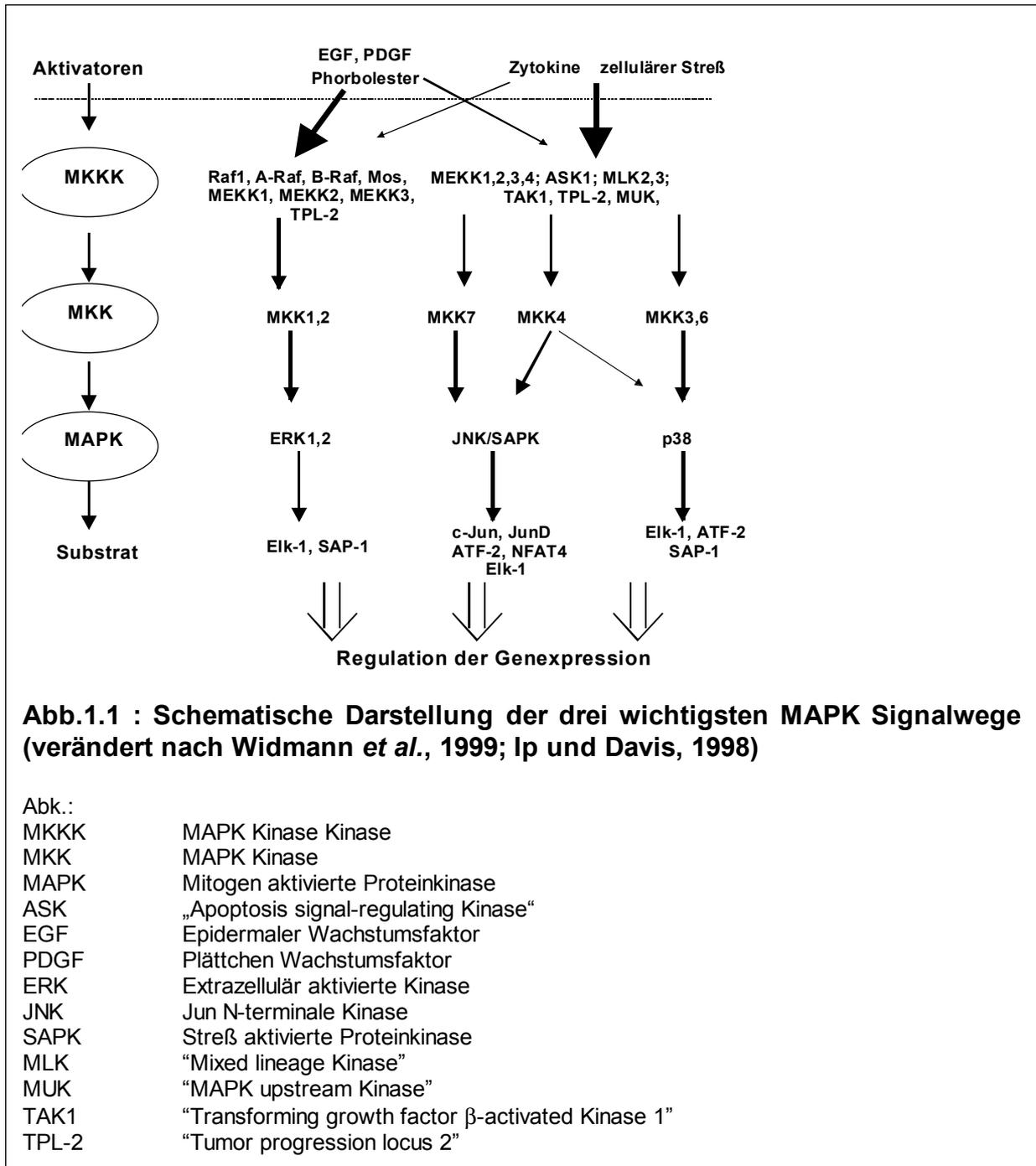
Ein MAPK Modul besteht aus drei hintereinandergeschalteten Kinasen: Eine MAPK Kinase Kinase (MKKK), MAPK Kinase (MKK) und eine MAPK. In Säugerzellen existieren sehr viel mehr MKKK als MAPK Kinasen, bis heute wurden in Säugerzellen 14 MKKK, 7 MKK und 12 MAPK gefunden (Widmann *et al.*, 1999). Durch die große Anzahl an diesen Molekülen können zahlreiche Signale in der Zelle in spezifische Signalkaskaden weitergeleitet werden. Dabei werden auch andere Signalwege mit aktiviert, so beeinflussen einige MKKK auch den NF κ B-Signalweg (Hirano *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997).

MAPK aus Säugerzellen können in 5 Gruppen unterteilt werden: Die Gruppe der extrazellulär aktivierten Kinasen (ERK1/2), die Gruppe der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK), die auch als Streß-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) bezeichnet werden, die p38 MAP Kinasen, sowie ERK3/4 und ERK5. Die drei ersten Gruppen sind am besten charakterisiert und untersucht, da sowohl die aktivierenden Stimuli, weitere Moleküle der Kaskade, sowie „downstream“ Substrate bekannt sind und bereits *in-vivo* die Funktionen anhand von „knock-out“ (KO) Untersuchungen für ERK, JNK und p38 MAPK untersucht wurden.

Für die MAPK-Aktivierung ist die duale Phosphorylierung des Threonin- und Tyrosinrestes in dem Motif Thr-X-Tyr notwendig (Payne *et al.*, 1991; Nakielny *et al.*, 1992). Alle MAP Kinasen phosphorylieren Serin oder Threonin in der Sequenz Pro-X-Ser/Thr-Pro (Alvarez *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1991; R. Davis, 1993). Die Einteilung in die oben genannten Gruppen beruht daher neben der Primärstruktur auch in den unterschiedlichen Aminosäuren in den regulatorischen Bereichen der Kinasedomäne VIII; so findet man die Sequenz Thr-Glu-Tyr bei den ERKs, Thr-Pro-Tyr bei JNKs und Thr-Gly-Tyr bei p38 MAPK (Ahn *et al.*, 1991; Derijard *et al.*, 1995).

Fast immer sind die involvierten Proteinkinasen inaktiv, d.h. sie liegen in nicht stimulierten Zellen in dephosphoryliertem Zustand vor, und werden durch regulierbare Phosphorylierungen aktiviert. Unterschiedliche MAP Kinasen werden über verschiedene Signalwege durch differentielle Stimuli aktiviert (Widmann *et al.*, 1999).

Die Komponenten der drei wichtigsten MAPK Signalwege sind in Abb. 1.1 schematisch aufgeführt.



1.2.2 Spezifität innerhalb der MAP Kinasekaskaden

Extrazelluläre Stimuli und MKKK können verschiedene MAPK Signalwege aktivieren. Dabei gibt es verschiedene Mechanismen, die die Spezifität der Signalweiterleitung über die MAPK Kinasen zu den MAPK und weiter nach distal festlegen. Nicht nur die lineare Sequenz um die regulatorischen Aminosäuren wird von den MAPK Kinasen erkannt, sondern die Tertiärstruktur der MAPK (Widmann *et al.*, 1999). Es gibt

hochaffine Wechselwirkungen zwischen einem Teil der MAP Kinase und einer kurzen Sequenz des Substrats, die auch als „docking-site“ bezeichnet wird. Ein MAPK Substrat kann mehrere dieser Bindungsstellen besitzen und dadurch die Affinität für eine entsprechende Kinase erhöhen.

So hat z.B der Transkriptionsfaktor c-Jun eine spezifische Bindungsstelle, die auch als delta-Domäne bezeichnet wird (Hibi *et al.*, 1993). Diese Domäne besteht aus 14 Aminosäuren und ist ca. 20 Aminosäuren N-terminal von den JNK-Phosphorylierungsstellen Ser-63 und Ser-73 entfernt. In die gleiche Familie dieser Transkriptionsfaktoren gehört JunD, das ebenfalls JNK-Phosphorylierungsstellen, aber dieses Motif nicht besitzt. Dagegen findet man die Sequenz bei JunB, dem dafür entsprechende Phosphorylierungsstellen fehlen. An JunB gebundenes JNK kann JunD in einem JunD-JunB Heterodimer phosphorylieren (Kallunki *et al.*, 1996). Als „docking-site“ für ERKs wurde in Proteinsubstraten eine sog. D-Domäne gefunden, die Ähnlichkeiten mit der delta-Domäne aufweist. ERKs besitzen zusätzlich noch ein weiteres Motif, das spezifisch für sie ist (Yang und Gabuzda, 1998; Holland und Cooper, 1999).

Auch in den MAPK selbst wurden konservierte Bindungsstellen für die entsprechenden Substrate, Aktivatoren und regulierenden Moleküle gefunden (Tanoue *et al.*, 2000). Diese Bindungsstellen befinden sich in der C-terminalen Region außerhalb der katalytischen Domäne.

Ebenfalls zur Erhöhung der Spezifität innerhalb der MAPK Signalwege dienen Scaffold-Proteine. Unter Scaffold-Proteinen versteht man spezifische Ankerproteine, die die Fähigkeit haben, mehrere Kinasen eines Signalweges zu binden. Dadurch wird zum einen die Zeit zwischen der Aktivierung der Kinase und der Phosphorylierung des ersten Substratmoleküls verkürzt und außerdem die Lokalisation innerhalb der Zelle beeinflusst.

Als Scaffold-Protein im JNK Signalweg wurde ein zytoplasmatisches Protein entdeckt, das einen Komplex mit MLK3, MKK7 und JNK bilden kann. Dieses Protein wurde als JIP-1 (JNK interacting protein 1) bezeichnet. Zuerst wurde von diesem Protein eine spezifische Inhibierung des JNK Signalweges durch zytosolische Retention von JNK beobachtet (Dickens *et al.*, 1997), später wurde gezeigt, dass dieses Protein auch eine positive regulatorische Funktion in dem Signalweg besitzt (Whitmarsh *et al.*, 1998). Zu der Genfamilie gehören auch noch JIP-2 und JIP-3 (Yasuda *et al.*, 1999). Außer MLK3 sind auch andere MKKK, DLK und MLK2, zu

spezifischen Interaktionen mit JIP-1 und JIP-2 fähig (Yasuda *et al.*, 1999). Kürzlich konnte ein weiteres Scaffold-Protein kloniert werden, JIP-3, das im Gegensatz zu den davor gefundenen Proteinen eine spezifische Interaktion mit MLK3 zeigt. JIP-3 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, in geringen Mengen noch im Herz und anderen Geweben. Es existieren mehrere Isoformen. Außerdem wurde gezeigt, dass JIP-3 durch JNKs *in-vitro* und *in-vivo* phosphoryliert werden kann (Kelkar *et al.*, 2000).

Im ERK-Signalweg wurde in Säugerzellen MP-1 (MEK Partner 1) als Scaffold-Protein von MEK1 und ERK1 identifiziert (Schaeffer *et al.*, 1998). Bei Hefen wurden Ste-5 und Pbs-2 als Scaffold-Proteine gefunden. Diese Proteine können in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli unterschiedliche Moleküle binden. So wird die Antwort auf Hyperosmolarität über die MAPKK Ste11, Pbs-2 und Hog-1 weitergeleitet (Printen *et al.*, 1994).

1.3 Der ERK Signalweg

Zu der Gruppe der ERKs (Extrazellulär regulierte Protein Kinasen) werden 5 Proteinkinasen gezählt (ERK1/2, ERK3/4 und ERK5) (Widmann *et al.*, 1999). Vergleiche bezüglich der Aminosäuresequenz zeigen, dass diese aber zu unterschiedlichen Gruppen gehören (Seger und Krebs, 1995; Cheng *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996). Die weitere Beschreibung des ERK Signalweges bezieht sich auf die MAPK ERK1 und ERK2, die zu den am besten untersuchten MAPK gehören. Aktiviert werden sie vor allem durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF oder dem hämatopoietischen Wachstumsfaktor (Cobb *et al.*, 1991; Welham *et al.*, 1992). Aktivierte ERKs sind in der Lage zytosolische Proteine, z. B. Phospholipase A₂ (Lin *et al.*, 1993) zu aktivieren oder sie wandern in den Zellkern und phosphorylieren Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Elk-1 (Gilles *et al.*, 1992) und c-Myc (Davis, 1993). Der ERK Signalweg ist entscheidend für die Zellproliferation (Pages *et al.*, 1993). Eine spezifische Hemmung ist z. B. durch die niedermolekulare Substanz PD098059 auf der Ebene von MEK1/2 möglich (Dudley *et al.*, 1995).

ERK1 hat eine spezifische Funktion in der Entwicklung von T-Zellen. Versuche mit ERK1^{-/-} (KO) Mäusen zeigten, dass diese Defekte in der Reifung von T-Zellen haben,

ansonsten sind die Mäuse lebensfähig, fruchtbar und von normaler Größe (Pages *et al.*, 1999).

1.4 Der p38 MAPK Signalweg

p38 MAPK (auch als *reactivating kinase*, RK, bezeichnet) wurde gleichzeitig von verschiedenen Gruppen entdeckt. Zuerst als eine Kinase, die durch LPS-Zugabe aktiviert werden kann (Han *et al.*, 1994), außerdem als Kinase im IL-1 Signalweg (Freshney *et al.*, 1994) und als Rezeptor eines niedermolekularen Inhibitors der Biosynthese von inflammatorischen Zytokinen (Lee *et al.*, 1994). Die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges kann durch zellulären Streß, wie UV-Licht oder osmotischen Schock und auch durch verschiedene Zytokine (IL-1, TNF α) erfolgen (Goedert *et al.*, 1997). In Säugerzellen wurden 4 Isoformen der p38 MAPK identifiziert, die als p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ bezeichnet werden (Enslin *et al.*, 1996). Die spezifische Inhibierung des p38 MAPK Signalweges ist durch den Inhibitor SB 203580 möglich (Lee *et al.*, 1994). p38 α und p38 β werden durch diese Pyridinyl-Imidazol Verbindung inhibiert, p38 γ und p38 δ sind dagegen insensitiv gegenüber der Substanz (Lee *et al.*, 1999). Eine direkte Phosphorylierung von p38 erfolgt durch MKK4, MKK3 und MKK6 *in-vivo* und *in-vitro* (Enslin *et al.*, 1996; Enslin *et al.*, 2000). Als Substrate von p38 MAPK wurden MAPKAP-2 und -3 identifiziert, die kleine Hitzschockproteine, wie Hsp27 (Freshney *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994), sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren, z.B. ATF-2 und Elk-1 (Raingeaud *et al.*, 1996), phosphorylieren.

Eine wichtige Funktion des p38 MAPK Signalweges besteht in der Regulation der Zytokinexpression. So wurde in MKK3^{-/-} KO Mäusen, die ansonsten lebensfähig und fruchtbar sind, ein Defekt in der IL-12 Produktion von Makrophagen und dendritischen Zellen festgestellt (Lu *et al.*, 1999). Fibroblasten von MKK3^{-/-} KO Mäusen zeigten nach TNF α Stimulation eine reduzierte p38 MAPK Aktivität und Zytokinexpression (Wysk *et al.*, 1999). p38 α ^{-/-} Mäuse haben eine normale Morphologie, sind aber anämisch und haben eine verminderte Erythropoese (Tamura *et al.*, 2000). Allerdings starben auch viele p38 α ^{-/-} KO Mäuse während der Embryonalentwicklung. Embryonale p38 α ^{-/-} KO Stammzellen zeigten nach Stimulation mit Anisomycin oder Arsenit eine deutlich verringerte bzw. keine MAPKAP-2 Aktivierung mehr (Allen *et al.*, 2000).

1.5 Der JNK Signalweg

1990 wurde eine neue MAPK mit einem Molekulargewicht von 54 kDa biochemisch charakterisiert (Kyriakis und Avruch, 1990). Die Aktivierung dieser neuen Kinase erfolgte durch Cycloheximid. Sie phosphoryliert den N-terminalen Bereich des Transkriptionsfaktors c-Jun und nicht wie ERKs den C-terminalen, inhibitorischen Bereich (Pulverer *et al.*, 1991). Die durch Cycloheximid aktivierte Kinase wurde isoliert und die cDNA aus einer Ratten-cDNA Bank kloniert. Das Enzym wurde als SAPK (Streß-aktivierte Protein Kinase) bezeichnet (Kyriakis *et al.*, 1994). Parallel dazu konnte über eine Affinitätssäule eine Kinase aufgereinigt werden, die c-Jun bindet und an Ser-63 und Ser-73 phosphoryliert. Entsprechend erfolgte die Namensgebung der Kinase als JNK (c-Jun N-terminale Kinase) (Hibi *et al.*, 1993). Die cDNA des Proteins wurde wenig später kloniert (Derijard *et al.*, 1994).

Molekulare Untersuchungen zeigten, dass JNKs von 3 Genen codiert werden (*JNK1*, *JNK2* und *JNK3*) (Derijard *et al.*, 1994; Kallunki *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996). Durch alternatives Prozessieren der jeweiligen mRNA entstehen 10 verschiedene JNK-Isoformen von 45 bis 57 kDa: JNK1- α 1, - α 2, - β 1, - β 2; JNK2- α 1, - α 2, - β 1, - β 2 sowie JNK3- α 1 und - α 2.

In der Kinase-Domäne von JNK1 und JNK2, nicht aber bei JNK3, befindet sich eine zusätzliche Schnittstelle (Gupta *et al.*, 1996). Zur JNK1- und JNK2-Gruppe gehören 4 Isoformen, die sich durch alternative Sequenzen zwischen den Kinase Subdomänen IX und X unterscheiden, zusätzlich ergeben sich durch alternatives Spleißen unterschiedliche COOH-Enden.

Weiterhin konnten 2 JNK3-Isoformen identifiziert werden, die unterschiedliche COOH-Enden haben.

Zwischen den 46 und 55 kDa JNK1 und JNK2 Isoformen wurden keine funktionellen Unterschiede festgestellt. Dagegen findet man bei den Isoformen, die aus dem alternativen Spleißen der Schnittstelle in der Kinase-Domäne entstanden sind, Unterschiede in der Substratspezifität. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Isoformen *in-vivo* unterschiedliche Zielmoleküle besitzen können (Gupta *et al.*, 1996; R. Davis, 1999).

Extrazelluläre Stimuli	Quelle
Cycloheximid	Kyriakis und Avruch, 1990
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994
Hitzeschock	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994
Tunicamycin	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994
Tumor Nekrosis Faktor (TNF α)	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994 ; Cavigelli <i>et al.</i> , 1995
Anisomycin	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994
Emetin	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994
Puromycin	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994
Actinomycin D	Kyriakis <i>et al.</i> , 1994
Ceramid	Westwick <i>et al.</i> , 1995
Interleukin-1 (IL-1)	Kracht, 1994
CD3/CD28	Su <i>et al.</i> , 1994
CD40	Sakata <i>et al.</i> , 1995
Osmotischer Streß	Galcheva-Gargova <i>et al.</i> , 1994
Erythropoietin	Nagata <i>et al.</i> , 1997
Thrombopoietin	Nagata <i>et al.</i> , 1997
IL-3	Nagata <i>et al.</i> , 1997
IL-17	Shalom-Barak <i>et al.</i> , 1998
T- Zellaktivierung	Su <i>et al.</i> , 1994
Hämatopoietischer Wachstumsfaktor	Foltz und Schrader, 1997
Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)	Foltz und Schrader, 1997
Nervenwachstumsfaktor (NGF)	Xia <i>et al.</i> , 1995
UV Strahlung	Zanke <i>et al.</i> , 1996
γ -Strahlung	Chen <i>et al.</i> , 1996
Arsenit	Cavigelli <i>et al.</i> , 1996
Einfluß der Zelldichte	Lallemund <i>et al.</i> , 1998
Fas (Apoptose)	Goillot <i>et al.</i> , 1997 ; Wilson <i>et al.</i> , 1996
Cis-Platinum	Zanke <i>et al.</i> , 1996

Tabelle 1: JNK aktivierende Stimuli

1.5.2 MAPK Kinasen Kinasen (MKKK) des JNK Signalweges

Die am besten untersuchte MKKK, die den JNK Signalweg aktiviert, ist MEKK1 (Xu *et al.*, 1996). MEKK1 bindet dabei an JNK und MKK4; dafür ist die N-terminale

Region von MKK4, die nicht zu der katalytischen Domäne gehört, notwendig. Es bildet sich ein ternärer Komplex aus MEKK1, MKK4 und JNK (Xia *et al.*, 1998). Weitere MKKK, die in den JNK Signalweg involviert sind, sind MEKK2 (Blank *et al.*, 1996), ASK1 (Wang *et al.*, 1996), TAK1 (Yamaguchi *et al.*, 1995), MST/MLK-2 (Hirai *et al.*, 1997), MLK3 (Rana *et al.*, 1996), MUK (Hirai *et al.*, 1996) und TPL-2 (Salmeron *et al.*, 1996). Diese MKKK aktivieren wie MEKK1 oft auch noch weitere MAPK Signalwege oder auch den NF κ B Signalweg.

1.5.3 Die MKK des JNK Signalweges

Bis jetzt wurden MKK4 und MKK7 als Aktivatoren der JNKs identifiziert.

1994 wurde eine Kinase, die von MEKK1 aktiviert wird und selber Streß-aktivierte Kinasen (SAPK/JNK) phosphorylieren und aktivieren kann, gefunden. Diese Kinase wurde zuerst mit SEK1 bezeichnet (Yan *et al.*, 1994). Weitere Synonyme Bezeichnungen der Kinase sind u.a. MKK4 und JNKK1. Es wurden drei MKK4 Proteine mit unterschiedlichen N-terminalen Bereichen identifiziert. Die Rolle der MKK4 Isoformen konnte bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden (Davis, 2000).

MKK4 kann außer dem JNK Signalweg auch p38 MAPK aktivieren (Derijard *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995). Versuche mit dominant-negativen Mutanten von MKK4 zeigten eine stärkere Bindungsaffinität von MKK4 zu JNK als zu p38 (Davis, 1999).

Für die Existenz einer weiteren MAPK Kinase im JNK Signalweg neben MKK4 gab es zum einen den Befund, dass der JNK Signalweg in den MKK4^{-/-} Zellen noch aktivierbar ist, und zum anderen auch die Beobachtung, dass in vielen Säugerzellen der zentrale Aktivator von JNK durch Anwendung chromatographischer Verfahren von MKK4 trennbar ist (Meier *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1996).

MKK7 wurde 1997 von verschiedenen Gruppen identifiziert, meistens als das Homologon des Genproduktes *hep* von *Drosophila melanogaster* in Säugerzellen (Moriguchi *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997).

Dabei wurden verschiedene Methoden verwendet und die gefundenen Kinasen unterschiedlich bezeichnet.

Durch molekularbiologische Untersuchungen konnten verschiedene Arbeitsgruppen die neue Kinase identifizieren. Tournier *et al.* führten RT-PCR Untersuchungen mit

mRNA aus Mäusegewebe durch und entdeckten cDNAs, die verschiedene Formen der neuen Kinase, die als MKK7 bezeichnet wurde, kodierten. Holland *et al.* benutzen das „yeast two hybrid system“ mit MKK1 als Köder. Durch Durchsuchen von verschiedenen Datenbanken fanden Wu *et al.*, Moriguchi *et al.* und Yao *et al.* eine cDNA, die eine bis dahin unbekannte MKK kodiert. Ebenfalls 1997 wurde von Lawler *et al.* eine cDNA kloniert, deren offener Leseraster für ein Protein kodiert, das die konservierten Aminosäuren der Domänen I-XI, die charakteristisch für eine Kinase sind, enthält. Die Proteine hatten leicht unterschiedliche Größen und wurden von den Arbeitsgruppen verschiedenen charakterisiert.

Eine MKK7 cDNA kodiert für ein Protein mit 419 Aminosäuren. Dieses Protein wurde als JNKK2 bezeichnet (Wu *et al.*, 1997). Die von Lawler klonierte cDNA hatte ein offenes Leseraster (ORF) für ein Protein mit 333 Aminosäuren, das als SKK4 bezeichnet wurde (Lawler *et al.*, 1997). Yao *et al.* entdeckten eine cDNA mit einem offenem Leseraster von 347 Aminosäuren, das für ein Protein der molaren Masse von ca. 39 kDa kodiert. In der Aminosäuresequenz wurden 11 Kinase Subdomänen gefunden. Das Protein besitzt eine große Homologie zu hep, sowie zu den anderen MAPK Kinasen und wurde mit MKK7 bezeichnet. Transfektionsversuche zeigten, dass MKK7 den JNK Signalweg durch Phosphorylierung der Aminosäuren Thr-183 und Tyr-185 von SAPK β aktiviert. Durch den Einsatz einer Kinase-inaktiven Form von MKK7 konnte eine Inhibierung der JNK Aktivierung nach Stimulation mit IL-1 β und LPS erreicht werden (Yao *et al.*, 1997).

Moriguchi *et al.* entdeckten ein Protein aus 428 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 52,5 kDa. Das Protein wurde als MKK7 bezeichnet. Es konnte eine hohe Übereinstimmung zu den Kinasedomänen von hep und MKK4 festgestellt werden. Antikörper gegen MKK7 wurden generiert und die Kinase konnte mit chromatographischen Verfahren aus stimulierten Zellen aufgereinigt werden. MKK7 wurde als spezifischer Aktivator für JNKs *in-vitro* und *in-vivo* identifiziert (Moriguchi *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 1997).

Untersuchungen an transgenen Fliegen zeigten, dass MKK7 Funktionen von hep, das u.a. für den Rückenschluß bei *Drosophila* zuständig ist, übernehmen kann (Holland *et al.*, 1997).

Die neu identifizierte MAP Kinase Kinase wurde außer als MKK7, auch als JNKK2 und als SEK4/SKK4 bezeichnet.

MKK7 aktiviert spezifisch den JNK Signalweg. Eine Phosphorylierung von p38 MAPK oder ERKs findet nicht statt (Wu *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997, Lawler *et al.*, 1997; Foltz *et al.*, 1998).

Analysen von MKK7 aus Säugerzellen zeigten, dass diese Kinase in vielen adulten und embryonalen Geweben exprimiert wird, vorwiegend im Skelettmuskel, sowie im Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Niere und Pankreas (Wu *et al.*, 1997; Lawler *et al.*, 1997; Moriguchi *et al.*, 1997; Foltz *et al.*, 1998).

In Geweben aus adulten Mäusen wurden 2 mRNAs für MKK7 von 2,2 und 4,6 kb Größe identifiziert (Tournier *et al.*, 1997). Das Gen von MKK7 (Maus) wurde identifiziert und dabei festgestellt, dass es 14 Exons enthält. Bei weiteren molekularen Untersuchungen des Gens für MKK7 konnten 6 verschiedene Isoformen identifiziert werden, die durch alternatives Spleißen und die Verwendung verschiedener Exons gebildet werden. So entsteht eine Gruppe von Proteinkinasen mit drei unterschiedlichen aminoterminalen Enden (α , β , γ - Isoformen) und zwei verschiedenen carboxyterminalen Enden (1 und 2 Isoform). Die Unterschiede zwischen den Isoformen befinden sich ausschließlich im N- und C- terminalen Bereich. Bereiche mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen, wie bei den JNK-Isoformen, wurden bei MKK7 nicht festgestellt. Außerdem gibt es noch eine Deletion bei der β -Form zwischen den Aminosäuren 42-59 (Tournier *et al.*, 1999).

MKK7 bindet am aminoterminalen Bereich sein Substrat JNK. Dieser Bereich fehlt bei der α -Isoform. Das führt zu einer leicht geringeren basalen Aktivität der α -Form und zu einer etwas stärkeren induzierbaren Aktivierung (Tournier *et al.*, 1999). Allerdings zeigen diese Daten auch, dass die funktionellen Unterschiede zwischen den Isoformen gering sind.

In Untersuchungen mit T-Lymphozyten wurde festgestellt, dass MKK7 für die Aktivierung des JNK Signalweges und die IL-2 Synthese notwendig ist (Matsuda *et al.*, 1998). In CD4⁺CD8⁺-Zellen im Thymus wurden hohe Konzentrationen an MKK7 und niedrige an MKK4 festgestellt. In diesen Zellen ist die Aktivierung des JNK Signalweges wichtig für die negative Selektion (Rincón *et al.*, 1998). Neue Untersuchungen zeigen, dass MKK7 auch einen Einfluß auf die mRNA Stabilität besitzt. Dies wurde für die mRNA von IL-2 in Jurkat Zellen während der T-Zell Aktivierung gezeigt (Chen *et al.*, 2000).

Bei Lokalisationsuntersuchungen wurde festgestellt, dass sowohl endogenes MKK7 als auch endogenes MKK4 im Zytoplasma und im Nukleus vorkommen. Die Stimulation mit UV-Strahlung oder IL-1 α änderte die Lokalisation der Kinasen kaum. Versuche mit überexprimierten MKK7 Isoformen zeigten eine vermehrte Anhäufung der rekombinanten Proteine im Kern (Tournier *et al.*, 1999).

1.5.3.1 Extrazelluläre Aktivierung von MKK7

Die selben Stimuli die JNK aktivieren, aktivieren auch MKK7. Dazu gehören proinflammatorische Zytokine (Finch *et al.*, 1997), TNF α und IL-1 β , Hyperosmolarität, Anisomycin und UV-Strahlung. Durch EGF wurde MKK7 am wenigsten aktiviert (Wu *et al.*, 1997). Es wurden Unterschiede zwischen der Aktivierung von MKK7 und MKK4 durch verschiedene Stimuli in unterschiedlichen Zelltypen festgestellt. In KB- und U937 Zellen erfolgte durch osmotischen Streß eine Aktivierung beider Kinasen. Durch TNF α wurde eine preferentielle Aktivierung von endogenem MKK7 festgestellt (Moriguchi *et al.*, 1997). In KB-Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl MKK7 als auch MKK4 durch Streßstimuli (osmotischen Schock, UV-Strahlung, sowie dem Proteinsynthesehemmer Anisomycin), aber nur MKK7 durch proinflammatorische Zytokine (IL-1 und TNF α) aktiviert werden (Lawler *et al.*, 1997). In PC12 Zellen erfolgt eine Aktivierung von MKK4 durch UV und Mannitol, dagegen wurde in diesen Zellen durch Mannitol nur MKK7 aktiviert (Butterfield *et al.*, 1999). In Mastzellen wiederum erfolgte die Aktivierung des JNK Signalweges nach UV-Stimulation durch MKK7 (Kawakami *et al.*, 1998).

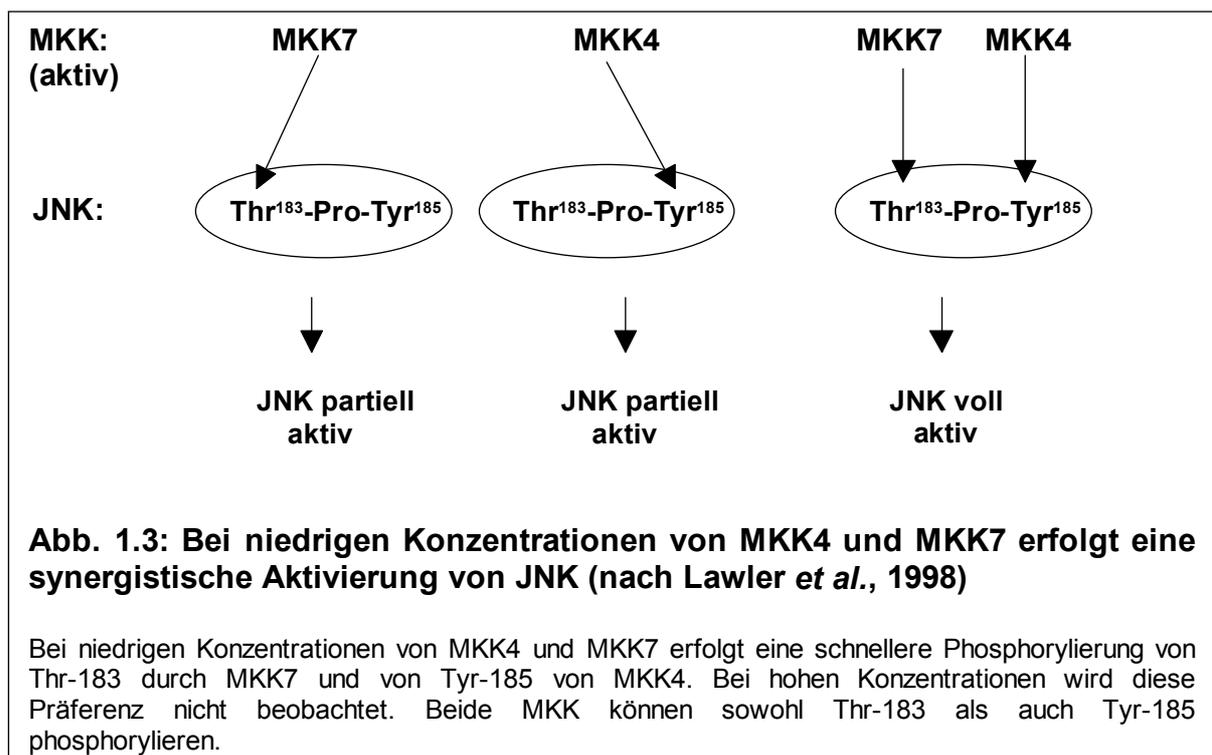
1.5.3.2 MAPK Kinasen Kinasen , die MKK7 aktivieren

In Kotransfektionsexperimenten wurden MEKK1, MEKK2 und ASK als MKK7 Aktivatoren identifiziert (Wu *et al.*, 1997). Yao *et al.* konnten 1997 MEKK1 als Aktivator von MKK7 identifizieren, indem eine Kinase-inaktive MKK7-Mutante eingesetzt wurde und diese von MEKK1 induzierte JNK Aktivierung inhibieren konnte. Ebenfalls in Expressionsversuchen wurde festgestellt, dass auch MEKK3 MKK7 aktiviert (Deacon and Blank, 1999). Durch MLK2 erfolgt eine stärkere Aktivierung von rekombinantem MKK7 als von MKK4 (Hirai *et al.*, 1998). In Neuronen konnte eine Aktivierung von MKK7 durch DLK *in-vitro* nachgewiesen werden (Merritt

et al., 1999). Eine Aktivierung von MKK4 durch DLK findet nicht statt, dagegen kann MLK3 sowohl MKK4 als auch MKK7 phosphorylieren.

1.5.4 Aktivierungsmechanismus von JNK durch MKK4 und MKK7

Für die Phosphorylierung und Aktivierung von JNKs ist die duale Phosphorylierung in der Kinase Subdomäne VIII in dem Motif Thr-Pro-Tyr an Thr-183 und Tyr-185 durch die MAPK Kinase MKK4 und MKK7 erforderlich. MKK4 phosphoryliert bevorzugt Tyrosin-185 und MKK7 eher Threonin-183 in diesem Motif (Lawler *et al.*, 1998, s. auch Abb. 1.3). Entsprechend ist die JNK Aktivierung durch jede der beiden Kinasen allein eher niedrig und durch beide Kinasen synergistisch. *In-vitro* Versuche mit durch MEKK1 aktivierten MKK4 und MKK7 zeigten, dass dieses Phänomen konzentrationsabhängig ist, so wurde die selektive Phosphorylierung hauptsächlich bei niedrigen Konzentrationen von MKK4 und MKK7 festgestellt. Bei hohen Konzentrationen beider Kinasen wurde schon durch MKK4 allein eine starke JNK1-Aktivierung gemessen, die durch MKK7 kaum noch erhöht werden konnte. Weiter wurde gezeigt, dass beide Kinasen unter diesen Bedingungen- MKK4 und MKK7- im Prinzip sowohl Tyr als auch Thr phosphorylieren können, MKK4 aber schneller das Tyr-185 und MKK7 preferentiell und schneller das Thr-183 (Lawler *et al.*, 1998).



1.5.5 Zielmoleküle des JNK Signalweges

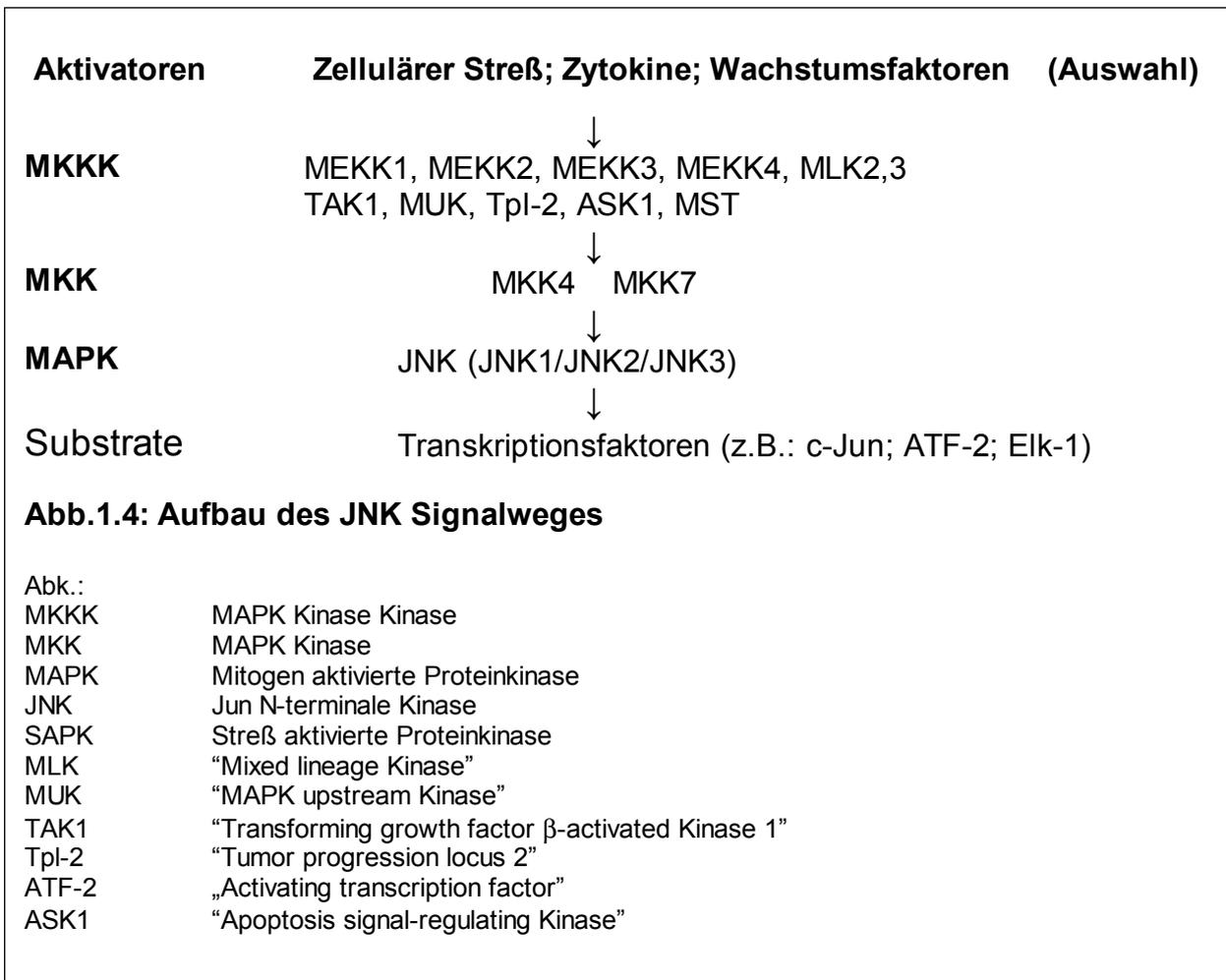
Die Transkriptionsfaktoren, die als Zielmoleküle für JNKs identifiziert wurden, gehören zu der Gruppe von bZIP-Molekülen, die als Komplexe an AP-1 (Aktivator Protein 1) oder AP-1 ähnlichen Bindungsstellen von Promotoren binden. AP-1 ist das am besten charakterisierte Zielmolekül des JNK Signalweges. JNKs phosphorylieren *in-vivo* und *in-vitro* Komponenten von AP-1, das als Homo- bzw. Heterodimer aus den Proteinen Jun (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD), Fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), ATF2, ATF3 oder B-ATF gebildet wird (Karin *et al.*, 1997). Bindungsstellen für AP-1 sind in Promotoren vieler Gene enthalten (Karin *et al.*, 1997).

c-Jun, codiert durch das Proto-Onkogen *c-jun*, hat vielfältige Funktionen während der Zellproliferation als auch bei Transformationen. Die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren führt zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität, z.B. in dem AP-1 Komplex. Der Promotor von c-Jun enthält eine AP-1 ähnliche Bindungsstelle, deshalb wird bei erhöhter AP-1 Aktivität die Expression von c-Jun verstärkt. Außerdem erhöht sich die Halbwertszeit von c-Jun, da die Phosphorylierung von c-Jun durch JNKs den durch Ubiquitin vermittelten Abbau des Moleküls verringert (Musti *et al.*, 1997).

Allerdings ist AP-1 selten der alleinige Regulator von Promotoren, desweiteren ist AP-1 meistens ein Heterodimer aus c-Fos und Jun, wobei c-Fos nicht von JNK phosphoryliert wird. Die Fos Kinase ist bis jetzt unbekannt (Karin *et al.*, 1997).

JNKs phosphorylieren auch andere Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1 (Zinck *et al.*, 1995), SAP1 und NFAT4 (Chow *et al.*, 1997), die nicht zu AP-1 gehören.

Ein spezifischer Inhibitor für den JNK Signalweg, wie PD098059 für den ERK und SB203580 für den p38 MAPK Signalweg, wurde 1999 von Karin erwähnt, dieser ist aber nicht kommerziell erhältlich (Chu *et al.*, 1999).



1.5.6 Knock-out Untersuchungen zu Molekülen aus dem JNK Signalweg

Versuche mit T-Zellen von JNK1^{-/-} KO und JNK2^{-/-} KO Mäusen zeigten, dass die Aktivierung von T-Zellen und die IL-2 Synthese nicht verändert ist, aber keine funktionelle Differenzierung in Th-1 und Th-2 Zellen stattfindet (Dong *et al.*, 1998; Sabapathy *et al.*, 1999). Die Gabe von Kaininsäure führt zu verstärkter c-Jun Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu zeigten JNK3^{-/-} KO Mäuse nach Gabe von Kaininsäure eine geringere Phosphorylierung von c-Jun *in-vivo* (Yang *et al.*, 1997). Es war auch nicht möglich lebensfähige MKK4^{-/-} KO Mäuse zu generieren, die Embryonen zeigten Leber Apoptose (Yang *et al.*, 1997; Ganiatsas *et al.*, 1998; Nishina *et al.*, 1999). Die Untersuchungen wurden deshalb mit embryonalen Zellen aus diesen Tieren durchgeführt. In embryonalen MKK4^{-/-} KO Stammzellen wurde nach Stimulation mit dem Proteinsyntheseinhibitor Anisomycin und nach Hitzeschock eine geringere JNK-Aktivierung als in normalen Stammzellen aus MKK4^{+/+} Mäusen

festgestellt. Dagegen zeigten MKK4^{-/-} KO Stammzellen nach Stimulation mit UV und Sorbitol eine ähnliche JNK-Aktivierung wie die MKK4^{+/+} Stammzellen (Nishina *et al.*, 1997). In der Regulation des p38 MAPK Signalweges haben MKK4^{-/-} KO Zellen keine Defekte. Dies kann durch Substitution von MKK4 Funktionen durch MKK3 und/oder MKK6 (Aktivatoren von p38 MAPK) erklärt werden. In MKK4^{-/-} KO Fibroblasten dagegen wurde sowohl eine geringere JNK- als auch eine schwächere p38 MAPK-Aktivierung nach Stimulation mit IL-1, TNF α , Anisomycin und Sorbitol festgestellt (Ganiatsas *et al.*, 1998).

Die Untersuchungen an den MKK4^{-/-} KO Stammzellen und Fibroblasten sowie biochemische Untersuchungen zeigten, dass es außer MKK4 noch mindestens einen weiteren Aktivator von JNKs geben muß, da bei den verwendeten Zellen zwar die JNK-Regulation verändert war, aber kein vollständiger Verlust des JNK Signalweges festgestellt wurde.

Das Zerstören des Gens von MKK7 führte ebenso wie bei analogen Versuchen mit MKK4 zum Sterben der Mäuse-Embryonen. Deshalb wurden auch für diese KO Versuche embryonale Stammzellen verwendet. Embryonale Stammzellen von MKK7^{-/-} KO, in denen die Expression von MKK4 nachweisbar war, zeigten nach Stimulation mit UV-Strahlung eine stark verminderte JNK-Aktivität und eine unveränderte p38 MAPK Aktivität (Dong *et al.*, 2000). Zusammenfassend sind die Gene von MKK4 und MKK7 für einen lebensfähigen Organismus notwendig.

1.6 Fragestellung

MKK7 ist ein spezifischer Aktivator des JNK Signalweges. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass dieser Signalweg wesentlich die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert. In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von MKK7 in intakten Zellen untersucht werden. Dazu sollte ein System etabliert werden, welches eine regulierbare Expression von verschiedenen MKK7 Mutanten gewährleistet und dadurch die kontrollierte intrazelluläre Aktivierung MKK7-abhängiger Signalwege ermöglicht.

Durch Untersuchungen auf mRNA sowie auf Proteinebene sollte versucht werden, von MKK7 abhängige Änderungen der Genexpression zu identifizieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Brutschrank	CO ₂ Autozero, Heraeus (Hanau)
Durchflußzytometer	FACScan (Becton-Dickinson, Heidelberg)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Elektrophoresekammern	Mightly Small SE245, Hoefer (USA) Vertikale duale Elektrophoreskammer, Sigma (Osterode) IPGPhor, Pharmacia (Freiburg) Hoefer DALT System, Pharmacia (Freiburg)
Filmentwicklungsmaschine	Optimex, Protec
Geltrockner	GSD4, Pharmacia (Freiburg) Maxidry D64, Biometra (Göttingen)
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifugen	RC2B, Sorvall (Bad Homburg) Sigma 3K20 und 6K10 (Osterode, Harz)
Mikroskope	Laborlux 11, Leitz ULWCD Olympus (Tokyo, Japan)
Mikrotestplattenleser	MR 6500, Dynatech (Denkendorf)
Spektralphotometer	UV-160A, Shimadzu (Hannover)
Sterilwerkbank	Lamin Air HB 2472, Heraeus (Hanau)
Szintillationsmeßgerät	Wallac 1410, Pharmacia (Freiburg)
Thermocycler	Vario V, Landgraf (Hannover)
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus (Hanau)
Ultra-Zentrifuge	TL-100, Beckmann (München)
UV-Transilluminator	Gel Doc 1000 System, Bio Rad (München)
Western-Blot-Kammer	<i>Semy-Dry-Blotter</i> , Schleicher&Schuell (Dassel)
Zellzentrifuge	RT 6000, DuPont (Bad Homburg)

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

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

2.2.2 Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits

Bradford-Kit	Protein Assay Dye Reagent, Bio Rad (München)
dNTP Set	New England Biolabs (Schwalbach)
GSH-Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
G418 (Geneticin)	Calbiochem (Bad Soden /Taunus)
Hybond-N	Amersham (Braunschweig)
IPG-Streifen	Pharmacia (Freiburg), BioRad (München)
IPG-Puffer	Pharmacia (Freiburg)
Kationenaustauschersäule	Pharmacia (Freiburg)
„Fast Flow“ S-Sepharose	
Medium und Zusätze (Zellkultur)	GibcoBRL (Eggstein)
Molekulargewichtsstandard für	
SDS-PAGE (ungefärbt)	Pharmacia (Freiburg)
Mini-Präp Kit	Pharmacia (Freiburg)
pI-Standards	Pharmacia (Freiburg)
Protein A-/G-Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
PVDF-Membran	Millipore (Eschede)
pd(N ₆)	Pharmacia (Freiburg)
Qiagen Plasmid Kit	Qiagen (Hilden)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)
Radioaktive Isotope	ICN
	Hartmann Analytics (Braunschweig)
	Pharmacia (Freiburg)
Restriktionsendonukleasen	MBI (St. Leon-Rot), Pharmacia (Freiburg)
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen (Hilden)

Röntgenfilme	Biomax-ML, Biomar-MR (Kodak)
Taq-DNA-Polymerase	GibcoBRL (Eggstein)
<i>Silver staining</i> Kit	Pharmacia (Freiburg)
Zellkulturmaterial	Nunc (Wiesbaden)

2.2.3 Antikörper und rekombinante Proteine

SAK-9 (Prof. Saklatvala, London, UK)

Antiserum aus Kaninchen, polyklonal (nicht aufgereinigt)

immunisierendes Peptid von p54SAPK α (Ratte)/human JNK2 α 2(409-423) abgeleitet

DSSLDDASTGPLEGCR-COOH

SAK-10 (Prof. Saklatvala, London, UK)

Antiserum aus Kaninchen, polyklonal (nicht aufgereinigt)

immunisierendes Peptid von p54SAPK β (Ratte)/human JNK3 α 1(307-384) abgeleitet

GVVKGQPSPAQVQQ-COOH

SAK-7 (Prof. Saklatvala, London, UK)

Antiserum aus Kaninchen, polyklonal (nicht aufgereinigt)

immunisierendes Peptid vom C-Terminus von p38 MAPK α abgeleitet

ISFVPPLDQEEMES

SAK16-1, SAK16-2 (Prof. Saklatvala, London, UK)

Antiserum aus Kaninchen, polyklonal (nicht aufgereinigt)

immunisierendes Peptid vom C-Terminus von GST-MKK7 (128 Aminosäuren)

anti-MKK7 (I.Foltz, Canada)

polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, immunisierendes Peptid abgeleitet von N-terminalen Aminosäuren von MKK7 α (4-26), Antikörper wurde fusioniert mit dem N-Terminus vom T-Zellepitop des Tetanus Toxin und aufgereinigt aus dem Serum der immunisierten Kaninchen mit Protein-A-Sepharose

anti-GFP (Boehringer Mannheim)

Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern aus der Maus (Klon 7.1 und 13.1) gegen GFP; Immunisierung von Mäusen mit partiell gereinigtem rekombinanten *Aequorea victoria* GFP als Immunogen

anti-c-myc (9E10) (Boehringer, Mannheim)

monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen ein Peptid des humanen Myc Proteins, aufgereinigt mit Protein G

(erkannt wird 9E10 Epitop: EQKLISEEDL)

Antikörper erhalten nach Immunisierung von BALB/c Mäusen mit AEEQKLISSEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA (Aminosäuren 408-439)

anti-HA (Boehringer Mannheim)

monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon 12CA5) gegen ein Peptid-Epitop aus dem Hämagglutinin-Protein des humanen Influenza-Virus

erkennt die Sequenz: YPYDVPDYA

immunisierendes Peptid: Aminosäuren 76-111 des X47 Haemagglutinin

anti-RXR α (D-20; Santa Cruz)

polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus Kaninchen,

immunisierendes Peptid abgeleitet von den N-terminalen Aminosäuren des humanen RXR α (2-21)

anti-ERK2 (C-14, Santa Cruz)

polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus Kaninchen,

immunisierendes Peptid abgeleitet von C-terminalen Aminosäuren von p42 (ERK2) der Ratte

anti-JNK1 (C-17, Santa Cruz)

polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus Ziege,

immunisierendes Peptid abgeleitet von C-terminalen Aminosäuren von humanen JNK1

anti-JNK2 (D-2. Santa Cruz)

monoklonaler IgG aus Maus, erhalten durch Immunisierung mit dem vollständigen rekombinanten JNK2-Protein (1-424) aus *E. coli*

anti-Maus IgG-POD	Pharmacia, Freiburg
anti-Kaninchen IgG-POD	Pharmacia, Freiburg
humanes, rekombinantes GST-c-Jun (1-135)	zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kracht
GST-SAPK β	zur Verfügung gestellt von Prof. Saklatvala
humanes, rekombinantes IL-1 α	zur Verfügung gestellt von Prof. Saklatvala
His-MAPKAP	zur Verfügung gestellt von Prof. Gaestel

2.2.4 Plasmide

pIND	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pVgRXR	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pCS3MTMKK7-Konstrukte	zur Verfügung gestellt von P. Holland, USA
pEGFP-C1	Clontech, Heidelberg
peVHAJNK2	Arbeitsgruppe PD Dr. Kracht
pINDlacZ	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

2.2.5 Primer

MKK7(s): *Bam*HI Schnittstelle, ohne Startcodon
GCGCGGATCCGGGAAGATAGCGGCGTCCT

MKK7(as): *Bam*HI Schnittstelle, mit Stop Codon
GCGCGGATCCCTACCTGAAGAAGGGCAGA

GFP-C1:
CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG

pIND(s): Ekdysen forward (Invitrogen)

CTCTGAATACTTTCAACAAGTTAC

pIND(as): BGH reverse (Invitrogen)

TAGAAGGCACAGTCGAGG

FRA-2(s): GAGAAGCGTCGCATCCGGCGGGA

FRA-2(as): ACTACAGCGCCCACCGAGCCACC

SRPK-1(s): TTGCTGAAGTCAGTTCGCAATTCAGACC

SRPK-1(as): CAGATCGCTGCCATTCTGTTGCTTCTG

ATF-4(s): AATGGCTGGCTGTGGATGGGTTGGTCA

ATF-4(as): GATCATGGCAACGTAAGCAGTGTAGTCTG

TFPI-2(s): GGAGCCAACAGGAAATAACG

TFPI-2(as): CGTCCACACTCACTTGCAGC

2.3 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien sind adhärent und wurden in 25 oder 75 mm² Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und einer wassergesättigten Atmosphäre in Vollmedium kultiviert.

2.3.1 Zelllinien

HEK293: adenovirus-transformierte embryonale Nierenzelle (human), DSZM, Braunschweig

Medium: Nut-Mix F12 mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

EcR-293: stabil mit pVgRxR transfizierte HEK293 (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Medium: DMEM mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Die Passage der adhärennten Zellen erfolgte alle 3-4 Tage, sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten. Dazu wurde das Medium dekantiert, neues Medium zugefügt, die Zellen abgeschlagen und in diesem resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche, in denen Medium vorgelegt wurde, pipettiert.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die mit Medium abgelösten Zellen bei 1200 UpM für 5 Minuten bei RT sedimentiert. Danach wurde das Zellpellet in 500 µl DMEM (mit 40 % (v/v) FKS resuspendiert und in Eis auf 0°C gekühlt. In ein Kryoröhrchen wurden 500 µl DMEM (20 % (v/v) DMSO) vorgelegt und die resuspendierte Zellsuspension dazu pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten *Nalgene-Cryo Freezing Container* über Nacht in einem –80°C Tiefkühlschrank gestellt und zur längeren Lagerung in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde aus dem Dewargefäß ein Kryoröhrchen entnommen, schnell aufgetaut und in 10 ml Medium überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 Minuten, 1200 UPM, RT), um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, und die Zellen wurden im Brutschrank weiter kultiviert.

2.3.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt, indem die Zellsuspension 1+1 mit Trypanblau (0,8 % (v/v) in PBS) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage Trypanblau aktiv auszuscheiden, während tote oder geschädigte Zellen dazu nicht in der Lage sind und blau gefärbt werden.

Zellzahl / ml = ausgezählte Zellen / Großquadrat x 2 x 10⁴

2.3.4 Stimulation von Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte in Medium mit FKS und den anderen Zusätzen. Das jeweilige Agens wurde in der entsprechenden Konzentration für die bestimmten Zeiten zu den Zellen gegeben. Für die Sorbitol-Stimulation wurde das entsprechende Volumen der Sorbitol-Stammlösung zuerst mit Medium versetzt und dann zu den Zellen zugefügt.

In den Versuchen wurden verschiedene Stimuli eingesetzt.

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
IL-1 α	10 ng/ml
EGF	50 ng/ml
TNF α	50 ng/ml
Sorbitol	500 mM
Anisomycin	10 μ g/ml
Arsenit	50 μ M

2.4 Präparative und analytische Methoden für Proteine

2.4.1 Präparation von Proteinen aus einem Ganzzelllysat

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

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten, die die zu untersuchenden Kinasen enthielten, wurde die Zellmembran mit Hilfe von Detergenzien aufgebrochen (z.B. Triton X-100). Alternativ erfolgte der Aufschluß der Zellmembran durch Scheren der Membran. Dazu wurden die im Kinase-Lysepuffer befindlichen Zellen je 3x durch eine Kanüle mit 0,9 mm Durchmesser (20 gauge) und anschließend durch eine Kanüle mit 0,45 mm Durchmesser (26 gauge) gepreßt.

Die Proteinbestimmung der Extrakte erfolgte in einer geeigneten Verdünnung nach der Bradford-Methode. Die Lysate wurden bei -80°C aufbewahrt.

Lysepuffer für Ganzzelllysate

10	mM	Tris, pH 7,05
30	mM	Natriumpyrophosphat
50	mM	NaCl
1	% (v/v)	Triton X-100
50	mM	NaF
20	mM	β -Glycerophosphat

Lysepuffer für zytosolische Extrakte (für Kationenaustauscherchromatographie)

20	mM	Tris, pH 7,4
50	mM	NaF
1	mM	EDTA
1	mM	EGTA
0,2	mM	Na_3VO_4

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

Lysepuffer für Ganzzelllysate

0,5	mM	PMSF
0,5	$\mu\text{g/ml}$	Leupeptin
0,5	$\mu\text{g/ml}$	Pepstatin
400	nM	Okadainsäure

Lysepuffer für zytosolische Extrakte (für Kationenaustauscherchromatographie)

1	mM	PMSF
10	μM	E64
0,5	$\mu\text{g/ml}$	Pepstatin
4	mM	DTT

Je nach zu lysierender Zellmenge variierte das verwendete Volumen zwischen 50 μl ($0,4 \times 10^7$ Zellen) bis zu 200 μl ($1,5 \times 10^7$ Zelle).

2.4.2 Präparation von zytosolischen Extrakten und Kernextrakten

Die Gewinnung der Extrakte orientierte sich an der Methode von Dignam (1990), wobei den Puffern weitere Inhibitoren und Zusätze zugefügt wurden:

300	µM	PMSF
10	µM	E64
400	nM	Okadainsäure
0,5	µg/ml	Leupeptin
0,5	mg/ml	Pepstatin
5	mM	DTT

Die Gewinnung der Extrakte wurde ausschließlich unter Eiskühlung durchgeführt. $1-1,5 \times 10^7$ Zellen wurden mit kaltem PBS vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, durch Zentrifugation sedimentiert (1200 UPM, 5 Minuten, 4 °C) und in 150 µl Puffer A resuspendiert und wieder pelletiert (10000 x g, 5 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Puffer A, dem 0,1 % (v/v) NP-40 zugesetzt wurden, resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Um den Zellaufschluß mit dem milden Detergenz zu unterstützen, wurden die Proben zwischendurch gevortext. Nach der Zentrifugation bei 10000 x g für 5 Minuten bei 4°C pipettierte man den zytosolischen Überstand vorsichtig ab und das Pellet mit den Kernen wurde in 50-75 µl Puffer B aufgenommen. Die Proben wurden für 1 Stunde auf Eis inkubiert und mehrmals gevortext. Nach einer weiteren Zentrifugation (10000 x g, 5 Minuten, 4°C) erhielt man die gelösten nuklearen Proteine im Überstand (Kernfraktion).

Die Proteinbestimmung der Extrakte erfolgte in einer geeigneten Verdünnung nach der Bradford-Methode. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Puffer A

10	mM	HEPES
10	mM	KCl
1,5	mM	MgCl ₂
0,3	mM	Na ₃ VO ₄
20	mM	β-Glycerophosphat
		pH 7,9 mit KOH einstellen

Puffer B

20	mM	HEPES
1,5	mM	MgCl ₂
420	µM	NaCl
0,2	mM	EDTA
0,3	mM	Na ₃ VO
20	mM	β-Glycerophosphat
		pH 7,9 mit KOH einstellen

Puffer B wurde mit 25 % (v/v) Glycerin versetzt

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

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

Durchgeführt wurde die Proteinbestimmung im Mikromaßstab mit dem *Protein Assay Kit* der Firma Bio-Rad. 100 µl einer geeigneten Probenverdünnung in PBS (1:50 bis 1:1000) wurden in einer 96-Loch Flachbodenplatte (Mikrotiterplatte) vorgelegt und mit 100 µl des Bio-Rad Reagenz (40 % (v/v)) versetzt. Nach 5 Minuten Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion gegen einen Leerwert im Elisa-Reader bei 595 nm.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Eichreihe mit BSA (0-35 µg/ml in PBS) verwendet. Alle Messungen wurden in Dreifachwerten ausgeführt.

2.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Das Trennverfahren nach Lämmli (1970) ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Denaturierte Proteine bilden mit SDS einen negativen Ladungskomplex, der im elektrischen Feld zur Anode wandert, so dass alleine der Vernetzungsgrad des Acrylamid-Gels die Trennleistung bestimmt.

Der Vernetzungsgrad wurde durch Variation des Volumenanteils an der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung eingestellt.

In einem Gelgießstand wurde zuerst das Trenngel gegossen, nach dem Auspolymerisieren erfolgte dann die Herstellung des 5 %-igen Sammelgels mit den Probenaschen. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Lämmli-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, abzentrifugiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke, abhängig von den verwendeten Gelen.

Gele mit 10 cm Trennstrecke: 35 mA

Gele mit 18 cm Trennstrecke: 50 mA

Trenngel-Puffer

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

Sammelgel-Puffer

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

Lämmli-Auftragspuffer (4xLösung)

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

Lämmli-Elektrophorese Puffer

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

2.4.5 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Zur Immobilisierung der aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Membran und ihre anschließende immunologische Detektion wurde das „Semi-dry“-Verfahren angewendet. Dabei wurden die mit verschiedenen Lösungen getränkten 1,5 mm dicken Filterpapiere um das Gel und die mit Methanol und Wasser befeuchtete Membran gelegt, die dann in der Apparatur zwischen die zwei Graphit-Elektroden plaziert wurden. Aufgrund der geringen Pufferkapazität ist die Transferzeit beschränkt.

Aufbau der Elektrotransfer-Apparatur:

Anode

2 Lagen Filterpapier Puffer IV

1 Lage Filterpapier Puffer III

PVDF-Membran

SDS-PAGE (Gel)

1 Lagen Filterpapier Puffer II

2 Lage Filterpapier Puffer I

Kathode

Der Transfer erfolgte mit 0,75 mA pro cm² für 2 Stunden.

Puffer I

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

Puffer II

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

Puffer III

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

PufferIV

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

2.4.6 Immunodetektion transferierter Proteine mittels Chemilumineszenz (ECL)

Zur spezifischen Detektion der auf der PVDF-Membran befindlichen Antigene wurde nach Absättigung freier Bindungsstellen durch Blocken (5 % (w/v) Milchpulver in TBS) die Membran mit dem Primärantikörper (bei 4°C, über Nacht) inkubiert. Die Verdünnung (1:500 – 1:1500) des Antikörpers wurden in TBS 5 % (w/v) Milchpulver / 0,01 % (w/v) Natriumazid angesetzt und mehrere Male wiederverwendet. Nach Entfernen und mehrmaligem Waschen der Membran in TBS (6 x 10 min) wurde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000 – 1:3000 in TBS 5 % (w/v) Milchpulver für 3 h bei RT inkubiert. Nach dem Abgießen des Sekundärantikörpers und dem erneuten Waschen (4 x 10 min) mit TBS bei RT erfolgte die Detektion der Banden als Chemilumineszenzsignale mittels einem ECL-Reagenz und Autoradiographiefilmen.

Eine PVDF-Membran konnte mehrmals für verschiedene Immunfärbungen eingesetzt werden. Um gebundenes HRP zu inaktivieren, wurde die Membran in 100 % Methanol gewaschen und anschließend wieder in TBS äquilibriert. Dadurch werden zwar nicht die an die Proteine gebundenen Antikörper entfernt, es sind aber meistens noch weitere Detektionen mit anderen Antikörpern möglich.

TBS

20	mM	Tris
500	mM	NaCl
pH 7,4		

2.4.7 Färbung von Proteingelen mit Coomassie

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

Coomassie-Färbelösung

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

Entfärbelösung

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

2.4.8 Aufreinigung von Kinasen mit Ionenaustauscherchromatographie

Mittels Kationenaustauschersäulen können Kinasen aus Zellextrakten separiert und auch angereinigt werden. MKK7 kann dabei von anderen Kinasen, auch von MKK4 getrennt werden (Moriguchi *et al*, 1997; Holland *et al*, 1997). Verwendet wurde dafür eine „Fast Flow“ S-Sepharose Säule (Pharmacia, Volumen der Säule: 0,5 ml). 1 mg Protein entsprechendes Volumen des zytosolischen Extraktes wurde mit 50 mM MES, pH 6,0, ad 1 ml aufgefüllt und auf die mit Lösung A äquilibrierte Säule gegeben. Nach Waschen mit 2 ml Lösung A wurden die Proteine mit 4 mal 0,5 M

NaCl eluiert. Anschließend wurde die Säule mit 1 ml Lösung C gespült. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mit 20 µl Tris, pH 8,5 (1M), 1 µl PMSF (200 mM) und 1 µl Pepstatin (1 mM) versetzt. Aliquote der Fraktionen wurden zur Bestimmung der MKK7 Aktivität in einen gekoppelten Kinase Versuch eingesetzt.

Lösung A

20	mM	MES, pH 6,0
20	mM	β-Glycerophosphat
10	mM	NaF
0,5	mM	EGTA
0,5	mM	EDTA
0,1	mM	Na ₃ VO ₄
2	mM	DTT

Lösung B: Lösung A mit 0,6 M NaCl

Lösung C: Lösung A mit 1 M NaCl

2.5 Aktivitätsbestimmung von Proteinkinasen

Der Aktivitätsnachweis der Proteinkinasen (JNK, MKK7, ERK2 oder p38 MAPK) in Zelllysaten wurde mittels verschiedener Methoden durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, ein exogen zugeführtes Substrat in Anwesenheit von radioaktiv markierten γ -ATP *in-vitro* zu phosphorylieren, die Reaktion durch Inkubation in Lämmli Auftragspuffer zu stoppen, die Proteine auf einem SDS-PAGE zu trennen und das radioaktiv markierte Substrat mittels einer Autoradiographie sichtbar zu machen.

Als Substrate dienten folgende Proteine:

GST-c Jun₁₋₁₃₅

GST-SAPKβ

MBP

His-MAPKAP

Die final eingesetzte Menge betrug, soweit nicht anders angegeben, 1 µg.

2.5.1 *In-vitro* Kinase Versuch mit Ganzzelllysaten

30 – 50 µg Protein ad 10 µl mit Triton-Lysepuffer werden mit dem entsprechenden Substrat (1 µg), wobei es sich um ein GST-Fusionsprotein oder ein Fusionsprotein mit einem anderen geeigneten Epitop handelt, bei Anwesenheit von γ -³²P-ATP in ATP Puffer für 15 min inkubiert. Anschließend wird das Substrat durch Inkubation für 30 min mit 30 µl in Triton-Lysepuffer äquilibrierter Glutathion Sepharose Suspension (bei einem GST-Fusionsprotein) aus dem Reaktionsansatz entfernt. Nach Zentrifugation (13 000 UpM, 3 min, 4°C) und quantitavem Entfernen des Überstandes, wurden die Sepharose-Kügelchen dreimal mit jeweils 200 µl Triton-Lysepuffer (mit 1 mM DTT versetzt) gewaschen. Die Sepharose-Kügelchen wurden mit 20 µl Lämmli-Auftragspuffer aufgenommen und die GST-Fusionsproteine durch Inkubation bei 95°C für 5 min eluiert. Nach erneuter Zentrifugation (13 000 UpM, 3 min, 4°C) wurde der Überstand auf einem SDS Gel getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, in Entfärbelösung entfärbt und auf einem Gelrockner unter Vakuum getrocknet und autoradiographiert. Das Anfärben der Proteinbanden ermöglichte eine quantitative Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen.

Durch Entfernen des Substrats aus dem Ansatz werden Phosphoproteine, die sonst mit auf der Autoradiographie detektiert werden, abgetrennt. Die Sensitivität dieser Nachweismethode wird dadurch stark erhöht.

ATP/* ATP Mix

60	µM	ATP
0,2	µCi/µl	γ ³² P-ATP in ATP-Puffer

ATP-Puffer

150	mM	Tris, pH 7,4
30	mM	MgCl ₂

2.5.2 *In-vitro* Kinase Versuch nach Immunpräzipitation

250 µg – 1 mg Protein entsprechendes Volumen eines Lysats wurden ad 500 µl mit IP-Puffer versetzt. Dazu fügte man einen entsprechenden Antikörper (1 µg, wenn nichts anders angegeben) und inkubierte den Ansatz bei 4 °C für mindestens 2 h bei 4°C unter ständigem Rotieren. Mit Hilfe der verwendeten Antikörper wurden die Proteine, deren Aktivität untersucht werden sollte, aus dem Ansatz entfernt. Die Antikörper wurden anschließend durch Inkubation mit Protein A- oder G-Sepharose für mindestens 1 h bei 4 °C unter ständigem Rotieren aus dem Ansatz entfernt. Die Sepharose-Kügelchen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (13 000 UpM, 3 min, 4°C) und dreimal mit 500 µl IP-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde zu den Sepharose-Kügelchen 10 µl IP-Puffer pipettiert und dies in die Kinase Reaktion eingesetzt. Für die Reaktion wurden ATP/*ATP in ATP-Puffer und das entsprechende Substrat zusammengegeben und für 30 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 4 fach Lämmli-Auftragspuffer und Inkubation bei 95°C für 5 min gestoppt. Das weitere Vorgehen entspricht dem Versuch 2.5.1.

IP-Puffer

20	mM	Tris, pH 7,4
154	mM	NaCl
50	mM	NaF
1	mM	Na ₃ VO ₄
1	% (v/v)	Triton X-100

ATP-Puffer und ATP/*ATP-Mix: wie bei 2.5.1

2.6 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von fremder DNA in eine Wirtszelle. Diese Methode wird verwendet für Untersuchungen von Funktionen und Komponenten von Genen. Es gibt verschiedene Techniken, um eukaryotische Zellen zu transfizieren, z. B. die Kalzium Phosphat Präzipitationsmethode, Elektroporation,

das Einsetzen viraler Vektoren oder die Verwendung von kationischen Liposomen als Transfektionsreagenz.

Alle verwendeten Lösungen für die Transfektion wurden entweder autoklaviert oder steril filtriert. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank ausgeführt.

2.6.1 Kalzium Phosphat Transfektion

Bei dieser Methode bildet sich ein Präzipitat aus Kalziumphosphat und DNA durch langsames Mischen einer HEPES gepufferten Salzlösung mit einer Lösung aus Kalziumchlorid und DNA. Das Präzipitat lagert sich auf der Oberfläche der Zellen an. In einem noch nicht näher geklärten Mechanismus wird die DNA von 10 bis 30 % Zellen aufgenommen. Die Transfektionseffizienz ist abhängig von den verschiedensten Parametern, z. B. den verwendeten Zellen, der angewandten Methode und auch der Größe und Qualität der transfizierten DNA.

Bei der stabilen Transfektion soll die DNA in das Genom der Zelle eingebaut werden, bei transienten Transfektion ist dies nicht der Fall.

Die Transfektion wurde in 6 Loch-Platten durchgeführt. Da die Zellen sich leicht ablösen, wurden die Platten zuerst mit 0,1 % steriler Gelatinelösung (in PBS) beschichtet und zweimal mit PBS gewaschen. Pro Loch wurden 4×10^5 Zellen ausgesät.

In jedes Loch wurden 225 μ l 2 x HEBS, 250 μ l H₂O und 20 μ l einer DNA-Verdünnung (1 – 10 μ g) zusammenpipettiert und gemischt. Nach vorsichtiger Zugabe von 31,5 μ l einer kalten 2 M CaCl₂-Lsg. bildeten sich Präzipitate. Die Suspension wurde auf die Zellen pipettiert und diese dann 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zum Entfernen der Präzipitate wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und erhielten anschließend 2 ml frisches Medium. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von Muristeron oder Ponasteron.

Bei transienten Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen nach 24 oder 48 stündiger Inkubation.

HEBS (2 x)

0,28	M	NaCl
0,05	M	HEPES (N-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethenesulfonsäure)

1,5 M Na_2HPO_4
pH 7.05
einstellen mit 5 M NaOH
sterilfiltrieren mit einem 0,45 μm Nitrocellulose Filter

2.6.2 Liposomale Transfektion mit Dosper

Kationische Liposome interagieren mit der DNA, dies führt zur Bildung von Liposom/Polynukleotid Komplexen, die positiv geladen sind und sich unspezifisch an die negativ geladene Zellmembran anlagern. Die DNA gelangt dann in die Zelle.

Die Vorgehensweise ist vergleichbar zu der oben genannten Methode. Unterschieden bestehen darin, dass pro 6 Loch 3×10^5 Zellen ausgesät wurden. Kurz vor Transfektionsbeginn wurden die Zellen zweimal mit DMEM ohne FKS gewaschen. Dann wurde 1 ml des serumfreien Mediums auf die Zellen gegeben. 2,5 μg DNA wurde mit HBS ad 50 μl aufgefüllt. 7,5 μl DOSPER-Reagenz wurde mit 42,5 μl HBS gemischt. Diese beiden Lösungen wurden zusammenpipettiert und durch Schwenken gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für zwei Stunden im Brutschrank wurde zu den Zellen 1 ml DMEM mit 20 % FKS pipettiert. Durch Zugabe von Ponasteron oder Muristeron wurde die Expression induziert.

HBS

20 mM HEPES
150 mM NaCl
pH 7,4
sterilfiltrieren mit einem 0,45 μm Nitrocellulose Filter

2.7 Zelluläre Klonierung

2.7.1 Herstellung stabiler Transfektanten-Zellpools

Als Ausgangszelllinie für die stabilen Transfektionen wurden entweder die EcR-293 Zellen, HEK293 Zellen von Invitrogen, stabil transfiziert mit pVgRXR, oder HEK293 eingesetzt.

Für die Transfektionen wurde das DOSPER Reagenz verwendet, da die Transfektionseffizienz größer ist als bei der Anwendung der Kalzium-Phosphat Methode. Es wurde jeweils die pINDGFPMKK7-Konstrukte (wt, 3E, 3A und K149M) allein (bei Verwendung der EcR-293 Zellen) oder die Konstrukte und das pVgRXR-Plasmid zusammen transfiziert.

Die Selektion der Transformanten erfolgte mit G-418 (Neomycin Resistenz auf dem pIND-Plasmid) und mit Zeozin (Resistenz auf pVgRXR-Plasmid).

Die Transfektion erfolgte in 6 Loch Platten. Nach 48 h wurden 3 der 6 Löcher vereinigt und in eine 80 cm² Zellkulturflasche überführt, in denen für 2-3 Wochen die Selektion mit Zeozin (400 µg/ml) und G-418 (400 µg/ml) durchgeführt wurde. Falls die Flaschen zu dicht wurden, wurden diese wie üblich geteilt.

2.7.2 Einzelzellklonierung von Transfektanten mit Hilfe des „*Limiting Dilution*“ Verfahrens

Um Einzelzellklone zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen in 96 Loch Platten ausgesät. Dazu bestimmte man die Zellkonzentration einer 80 cm² Zellkulturflasche nach Selektion und verdünnte die Zellsuspension in mehreren Schritten so, dass man zwischen 0,5 – 2 Zellen pro Loch in 200 µl Medium aussäen konnte. Die äußeren der 96 Loch Platte wurden dabei frei gelassen. Die Zellen wurden in konditioniertem Medium verdünnt und ausgesät.

Konditioniertes Medium besteht aus Kulturüberständen von HEK293, das nach Zentrifugation (600 x g, 10 min) und filtrieren (0,2 µm) 1 + 1 mit DMEM (10 % FKS, Pen., Strep. und L-Glutamin) gemischt wurde.

Durch mikroskopische Kontrolle wurden Löcher, in denen mehr als eine Zelle wuchs, aussortiert. Einzelzellklone wurden, wenn genügend Zellen gewachsen waren, in 2 96 Loch Platten überführt. In den Zellen der einen Platte wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von Muristeron oder Ponasteron induziert. Nach Fluoreszenzmikroskopie wurden die positiven Zellklonen identifiziert und weiter expandiert. Die Ergebnisse wurden durch Western-Blot Analysen überprüft.

2.8 Expression von Reporter-Gen-Konstrukten

2.8.1 Photometrische Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität

Das *lacZ* Gen von *E.coli* kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, welches verschiedene β -Galaktoside hydrolysieren kann. Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte im Mikromaßstab. Zellen wurden nach transienter Transfektion mit pIND/*lacZ* in einem β -Galaktosidase Lysepuffer lysiert. Die Vorgehensweise entspricht der Herstellung von Ganzzelllysaten, außer dass die Inkubation für 15 Minuten und die anschließende Zentrifugation bei 13000 UpM bei RT durchgeführt wurde.

10 – 60 μ l der β -Galaktosidaselysate wurden mit Reaktionspuffer A auf 100 μ l aufgefüllt und in eine 96 Lochplatte pipettiert. Dazu wurden 100 μ l o-Nitrophenyl- β -Galaktopyrosid Lösung (ONPG, Sigma) gegeben. Die Platte wurde anschließend für 1-3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der OD erfolgte mit einem *Elisa-Reader* (Dynatech 2000) bei 405 nm.

β -Galaktosidase Lysepuffer

0,2	% (v/v)	Triton X-100	
100	mM	Kaliumphosphatpuffer	pH 7,8

Reaktionspuffer A

100	mM	Natriumphosphat	pH 7,5
10	mM	KCl	
1	mM	MgSO ₄	

ONPG Färbelösung

4,4 mg ONPG / ml Reaktionspuffer A

2.8.2 Histochemischer Nachweis der β -Galaktosidase (X-Gal Färbung)

Die X-Gal Färbung liefert einen Nachweis der β -Galaktosidase auf Einzelzellebene. Die transfizierten Zellen werden zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml X-Gal Fixierer versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die fixierten Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml X-Gal Färbelösung folgte eine 12 - 24 stündige Inkubation bei 37 °C. Zellen, die die β -Galaktosidase exprimieren, färben sich blau.

X-Gal Fixierer

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

X-Gal Färbelösung

3 mM Kaliumferricynid [$K_3Fe(CN)_6$]
3 mM Kaliumferrocyanid [$K_4Fe(CN)_6$]
10 % (v/v) DMSO
2 mM $MgCl_2$ in PBS

vor Gebrauch 1 mg/ml X-Gal (40 mg/ml DMSO) frisch zugeben

2.9 Präparative und analytische Methoden für Nukleinsäuren

2.9.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation, bis 20 μ g DNA) wurde mit dem DNA-Plasmid Präparationskit der Firma Pharmacia, Präparationen im mittleren (Midi-Präparation, bis 100 μ g DNA) und großem (Maxi-Präparation, bis 500 μ g DNA) Maßstab wurden mit Hilfe des Plasmid-Isolations-Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

Ausgehend von Einzelzellklonen nach einer Transformation oder mit Bakteriensuspension aus einem -80°C gelagerter Glycerinkultur erfolgte die Anzucht der Kolonie in Selektionsmedium über Nacht unter Schütteln bei 37°C . Das Kulturvolumen (5 ml für eine Mini-Präparation, 100- 500 ml für eine Midi-/Maxi-Präparation) richtete sich nach der Präparationsmethode und dem Plasmid-Typ (*low-* oder *high-copy* Plasmid).

Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien (5000 x g, 10 min, RT) erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß den Herstellerangaben. Das Prinzip beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen nach Birnboim und Doly (1979) und der Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine patentierte Anionenaustauscher-Säule. Die DNA wurde in 50 – 200 μl sterilem Wasser gelöst.

2.9.2 Gelelektrophoretische Auftrennung

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarose-Gele verwendet. Die Agarose-Konzentration richtete sich hierbei nach der zu trennenden Fragmentgröße. Die erforderliche Agarosemenge wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle aufgekocht, nach Abkühlen auf ca 50°C mit Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurden die mit Auftragspuffer versetzten Proben aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 X TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm.

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ermöglicht so die Detektion mit einem UV-Transilluminator. Als Größenmarker wurde eine bp-Leiter der Firma MBI verwendet.

TAE-Puffer

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

2.9.3 Konzentrationsbestimmung durch UV-Absorptionsmessung

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

Für das Absorptionsmaximum gilt folgende Näherung:

- 1 OD (260 nm) entspricht 50 µg/ml dsDNA
- 40 µg/ml ssDNA
- 30 µg/ml Oligonukleotide
- 40 µg/ml RNA

2.9.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) und RT-PCR

Der PCR-Prozeß ist eine sehr effektive Methode zur *in-vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten durch mehrere Inkubationsschritte bei unterschiedlichen Temperaturen. Diese Technik macht sich die Eigenschaften der aus Archaeobakterien isolierten DNA-Polymerasen zunutze, die in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen auch nach Hitzedenaturierung der DNA bei 95°C noch biologische Aktivität aufweisen und DNA vervielfältigen können.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion mit einer vorgeschalteten reversen Transkription (RT-PCR) wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dazu wurde im ersten Schritt die aus den entsprechenden Zellen gewonnene RNA (pro Ansatz wurde 1,0 µg RNA eingesetzt) durch eine reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche dann im zweiten Schritt mit Hilfe von Taq-DNA-Polymerase amplifiziert wurde. Als Kontrolle und zur Überprüfung der RNA und der Reaktionen wurden Tubulin Primer verwendet. Bei β -Tubulin handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Genprodukt, das auch nach unterschiedlichen Stimulationsbedingungen keine Veränderungen in der cDNA-Ausbeute zeigt. Die so gewonnene DNA konnte anschließend in Agarosegelelektrophoresen analysiert werden.

A) Reverse Transkription

5 x RT-PCR-Puffer (1 x)	4 µl
dNTP-Mix je 10 mM (ATP, GTP, CTP, TTP)	4 µl
DTT (1mM)	2 µl
Oligo d(T) ₁₆ (2,5µM)	1 µl
RNase Inhibitor (1 U/µl)	1 µl
steriles bdest.	6,5 µl
RNA (0,5-1,5 µg)	1 µl
Reverse Transkriptase (1 U/µl)	0,5 µl

Gesamtvolumen: 20 µl

Um Verdunstung und Rückfluß zu vermeiden, wurde der Ansatz mit 50 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet und im Thermocycler inkubiert.

Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet :

10 min bei 23°C (Primerbindung), 60 min bei 37°C (Reaktion), 5 min 95°C (Denaturierung), 10 min 4 °C. Direkt im Anschluß wurden die Ansätze in die PCR eingesetzt.

B) DNA-Amplifikation

Für den zweiten Reaktionsschritt wurde in einem weiteren Mikroreaktionsgefäß ein zweiter Master-Mix angesetzt, der je nach Primerpaar optimierte Mengen von MgCl₂ enthält:

Reaktionsansatz für β-Tubulin (2,1 mM MgCl₂):

10 x PCR-Puffer (1 x)	10 µl
50 mM MgCl ₂ -Lösung (2,1 mM)	3 µl
dNTP-Mix je 10 mM (ATP, GTP, CTP, TTP)	8 µl
steriles bdest.	56,5 µl
Primer-Mix sense+antisense (je 0,2 µM)	3 µl
RT-Template	19 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl

Gesamtvolumen: 100 µl

Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet (50 µl). Folgendes Programm wurde durchgeführt:

5 min bei 95 °C (Schmelzen der DNA)

1 min 55°C (Primer-Anlagerung)

1 min bei 72 °C (DNA-Polymerisation)

Das Auftrennen der PCR-Produkte erfolgte auf einem Agarosegel (1 – 2 % (w/v)).

2.9.5 Umklonierung

- Vorbereitung des Inserts

Als Insert wurde die amplifizierte DNA aus einer PCR-Reaktion verwendet. Als Ausgangs-DNA diente pCS3MT mit den 4 verschiedenen MKK7 cDNAs.

Die PCR wurde mit folgenden Primern und Bedingungen durchgeführt:

MKK7(s): *Bam*HI Schnittstelle, ohne Startcodon

MKK7(as): *Bam*HI Schnittstelle, mit Stop Codon

5 min 95°C

5 min 85°C

1 min 95°C

1 min 55°C 25 Zyklen

2 min 72°C

anschließend 7 min 72°C und 4°C

Folgende Schritte wurden anschließend durchgeführt, um das PCR Produkt aufzureinigen und für die Ligation vorzubereiten.

1. Chloroformextraktion, Fällung

2. Konkatemisierung, Aufreinigung der Konkatemere durch Phenol-Chloroform / Chloroformextraktion, Fällung

3. Restriktionsschnitt
4. Auftrennung mittels Agarosegel
5. DEAE Membranextraktion, Fällung
6. analytisches Gel

- Chloroformextraktion

1 Vol. Chloroform wurde zu dem PCR-Produkt gegeben. Nach vortexen wurde für 30 sec bei 13000 UpM zentrifugieren. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die untere Phase (Chloroform) mit 1 Vol. sterilem bidest nachextrahiert, gevortext und 30 sec 13000 UpM anzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit der ersten oberen Phase vereinigt.

Die Fällung wurde mit genau 2,5 M Ammoniumacetat und 1 Vol. Isopropanol für 30 min bei 4 °C durchgeführt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15000 x g) sedimentiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und 15 min, 4 °C, 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert, das Pellet getrocknet und in einem geeigneten Vol. sterilem bidest aufgenommen.

- Konkatemerisierung

Bei der Konkatemerisierung werden die Inserts aneinanderligiert, um den Restriktionsenzymen längere DNA-Fragmente anzubieten, wodurch sich die Schnitteffizienz erhöht.

Ansatz 80 µl

xx	µl	DNA
8	µl	10 x T4 Ligasepuffer
1,6	µl	dNTP Mix (10 mM), final 0,2 mM
8	U	Klenow Polymerase
8	U	T4 Polynukleotid Kinase
30	U	T4 DNA-Ligase

Der Ansatz wurde über Nacht bei 15 °C im Thermocycler inkubiert.

- Aufreinigung der Konkatemere durch Chloroformextraktion

Die Konkatemerisierung wird auf auf einem Agarosegel überprüft.

Anschließend wurde der Konkatemeransatz mit den Restriktionsenzymen geschnitten, mit $\frac{1}{6}$ Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

- Die Gelextraktion aus dem Agarosegel erfolgt mit DEAE-Membranen

Die DEAE-Membranen wurde an entsprechender Stelle in das Gel eingesetzt, so dass die zu eluierenden DNA auf die Membran wanderte. Das Gel wurde für 30 min bei 70 V weiterlaufen gelassen. Die Membran wurde 3 x in Niedrigsalzpuffer gewaschen, danach erfolgte die Elution der DNA von der Membran durch Inkubation für 1 h bei 70 °C in 400 µl Hochsalzpuffer.

Die Isopropanol-Fällung erfolgte mit 400 µl Isopropanol über Nacht bei –20°C. Die DMA wurde sedimentiert (30 min, 4 °C, 15000 x g), das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 15 min, 4 °C, 15000 x g zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 5 µl sterilem bidest aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem analytischen Agarosegel.

- Vorbereitung des Zielvektors

Der Vektor wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert, aufgereinigt und anschließend dephosphoryliert. Danach erfolgte die Ligation von Vektor und Insert über Nacht bei 16 °C.

- Transformation der Ligationsansätze in kompetente Bakterien

200 µl kompetente *E.coli* wurden mit 5 µl des Ligationsansatzes und 1-10 ng Plasmid DNA in 10ml Polypropylen Röhren auf Eis für 30 min inkubiert, anschließend im vorgeheizten Wasserbad bei genau 42°C genau 45 sec inkubiert, sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Dazu wurden 800 µl LB Medium geben, und bei 37°C und 120 – 160

UpM im Schüttelinkubator ohne Antibiotikum inkubiert. Dann wurden die Bakterien bei 1000 UpM abzentrifugiert, 800 µl des Mediums abgenommen und die Bakterien in den restlichen 200 µl vorsichtig resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde auf einer LB Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin (oder einem anderen Resistenzmarker) ausgestrichen. Anschließend erfolgte eine Mini Plasmid Präparationen und die Plasmid DNA konnte durch geeignete Restriktionsverdauung auf Vorhandensein des Inserts überprüft werden.

LB-Medium

5	g	Hefextrakt
10	g	Trypton
10	g	NaCl

bidest ad 1 l, autoklavieren

LB/Ampicillin

50-100 µg/ml Ampicillin in autoklaviertes LB-Medium geben

LB-Ampicillin-Agar

15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium
autoklavieren, nach Abkühlen Ampicillin zufügen und Platten gießen

2.9.6 Agarosegelelektrophorese und Northern Blotting von RNA

Für die Elektrophorese und den Northern Transfer von RNA (nach Maniatis *et al*, 1989) wurden autoklavierte, RNase-freie Materialien verwendet. In einem 1 % (w/v) igen Agarose-Gel mit 6 % (v/v) Formaldehyd wurden gleiche Mengen RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde eine spezielle RNA-Flachbett-Elektrophoresekammer verwendet, die mit 1 x MOPS gefüllt wurde.

Vor dem Auftrag wurde die RNA je nach Menge mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt. Je 5 - 10 µg RNA pro Ansatz wurden eingesetzt und mit 12,5 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 56°C für 15 min, worauf die RNA-Probe kurz zentrifugiert und mit 6 µl RNA-Stoppuffer versetzt wurde.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (70 V, 3h) wurde das Gel auf einem UV-Tisch kontrolliert, um die Integrität der RNA sicherzustellen, sowie um die Auftragsmengen anhand der Anfärbungsintensität der 18S und 28S rRNA zu überprüfen.

10 x MOPS:

200	mM	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
50	mM	Natriumacetat
10	mM	EDTA

mit NaOH auf pH 7 eingestellt

RNA-Stoppuffer:

50	%(v/v)	Glycerol
1	mM	EDTA pH 8
0,25	%(w/v)	Bromphenolblau

RNA-Probenpuffer (für einen Ansatz):

7,5	µl	Formaldehyd
3	µl	10 x MOPS
2	µl	Ethidiumbromid (200 ng/ml)

RNA-Gel, große Kammer (360 ml):

3,6	g	Agarose
36	ml	5 x MOPS
67,5	ml	Formaldehyd
ad 360	ml	H ₂ O

Zur Vorbereitung auf den Northern-Blot wurde das Gel zweimal für je 30 min in sterilem Wasser und anschließend einmal in 10x SSC für 20 min leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine mit Blotpuffer (10 x SSC) gesättigte Whatman-(3MM)-Filterpapierbrücke gelegt. Dabei ragte das Filterpapier an beiden Enden in eine mit Blotpuffer gefüllte Plastikwanne. Auf das Gel wurde die Nylonmembran gelegt (Hybond N, Fa. Amersham, Braunschweig), darauf eine doppelte Lage auf Gelgröße geschnittenes 3MM-Filterpapier, das zuvor in

Blotpuffer getränkt wurde. Vor dem Auflegen wurde die Membran kurz in steriles Wasser getaucht und für 5 Minuten in Blotpuffer getränkt (Äquibrierung). Das Gel wurde mit einem Rahmen aus Parafilm umgeben und danach eine Einmal-Windel aufgelegt. Diese wurde mit einem etwa 1 kg schweren Stahlblock beschwert. Der Parafilm-Rahmen sollte einen direkten Pufferstrom zur Windel verhindern. Luftblasen wurden verhindert, indem einige Male vorsichtig mit einer 10-ml-Pipette über die Filterpapiere gerollt wurde. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt und nach ca. 18 Stunden beendet. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen, für 10 min bei 95°C getrocknet und anschließend für 90 Sekunden auf dem UV-Leuchttisch bestrahlt, um eine Kreuzvernetzung der RNA mit der Membran zu erreichen. Die Membran wurde anschließend lose in Klarsichtfolie eingepackt und bei 4°C gelagert.

10x SSC

3	M	NaCl
0,3	M	Tri-Na-Citrat x 2 H ₂ O

pH 7,0, autoklavieren

2.9.7 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die auf eine Membran transferierte RNA wurde mit verschiedenen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die Sonden bestanden aus Fragmenten der entsprechenden cDNAs. Die Markierung der doppelsträngigen DNA erfolgte mit radioaktiv markierten $\gamma^{32}\text{P}$ -dCTP. Eingesetzt wurde die Sonde einzelsträngig, sie wurde unmittelbar vor Gebrauch denaturiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte nach gängigem Standardprotokoll (Ausubel *et al*, 1996). Die Detektion der radioaktiven Banden erfolgte mittels Autoradiographie.

2.10 Zweidimensionale Elektrophorese von Ganzzelllysaten

2.10.1 Vorbereitung und Lyse der Zellen

Für die Elektrophorese wurden Lysate der adhärent wachsenden Zelllinie HEK293 verwendet. Die Zellen wurden mit Medium abgelöst und bei 700 x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit kalter physiologischer NaCl-Lsg gewaschen. Die Lyse erfolgte in 350 µl Lysepuffer für 10 min bei 30°C im Rüttler. Nach 20 sec Zentrifugation bei 13000 Upm konnte das Lysat direkt in die 1. Dimension eingesetzt werden. Pellets, die nicht sofort lysiert werden, wurden bei -80°C gelagert.

Für die Lyse wurden folgende Substanzen verwendet:

Harnstoff ist eine chaotrope, ungeladene Verbindung, die die Kohäsion der Wassermoleküle erniedrigt, dadurch werden hydrophobe Bereiche von Proteinen leichter in wässrigen Lösungen gelöst (Creighton, 1984 ; Rabilloud, 1996).

CHAPS ist ein zwitterionisches Detergenz (zwischen pH 1-12), das eine quartäre Amino- und eine Sulfonsäuregruppe trägt. Zwischen pH 1-12 wandert CHAPS nicht im elektrischen Feld. CHAPS wird ebenfalls wie Harnstoff für die Solubilisierung von hydrophoben Proteinen verwendet (Creighton, 1984 ; Rabilloud, 1996).

DTT (Dithiothreitol) reduziert Disulfid-Brückenbindung in oder zwischen Proteinen und trägt zur Löslichkeit der Proteine bei.

IPG-Puffer sind verschiedene Carrier-Ampholyte, die entsprechend dem verwendeten pH Gradienten, dem Lyse-Puffer zugesetzt werden.

TBP (Tributylphosphin) reduziert Disulfid-Brückenbindungen noch etwas wirksamer als DTT in Proteinen, wobei die Reaktion stöchiometrisch verläuft (Rabilloud, 1996).

physiologische NaCl

0,9 % (w/v) NaCl

Lyse-Puffer

9	M	Urea
4	% (w/v)	CHAPS
1/10	‰ (w/v)	Bromphenolblau
5	mM	DTT oder
5	mM	TBP

Tributylphosphin wurde zuletzt zugefügt.

Eine 200 mM Stammlösung wurde durch Mischen von 500 µl der Ausgangslösung (Fluka Nr. 92725) zu 9,65 ml Isopropanol hergestellt. Diese Lösung mußte unter Argon bei 4 °C aufbewahrt werden.

Resolyte: 0,5 % (v/v) bei pH 3 – 10
1,0 % (v/v) bei pH 4 – 7

2.10.2 Isoelektrische Fokussierung mit der IPGPhor

Als IPGs wurden auf Folie polymerisierte Flachgele, die kommerziell erworben wurden, verwendet. Die Trennung der Proteine in der 1. Dimension wurde in der IPGPhor durchgeführt, bei der es sich um ein geschlossenes System handelt, bei dem bis zu 8000 V für die Fokussierung eingestellt werden können. Dies führte zur Verringerung der Fokussierdauer.

13 cm Streifen pH 4-7, pH 3-10	17 cm Streifen pH 5-8	18 cm Streifen pH 4-7, pH 3-10	18 cm Streifen pH 5,5-6,7
2h Rehydrieren	2h Rehydrieren	2h Rehydrieren	2h Rehydrieren
50 V 10 h	50 V 12 h	50 V 10 h	50 V 20 h
500 V 1 h	150 V 1 h	500 V 1 h	500 V 2 h (Grad.)
2000 V 1h (Grad.)	300 V 1 h	2000 V 1 h (Grad.)	1000 V 2 h
8000 V 5h	600 V 1 h	80000 V 60000 Vh	2000 V 1 h
	1200 V 1 h		4000 V 1 h
	8000 V 2 h (Grad.)		6000 V 1 h
	8000 V 3 h		80000 V 120000 Vh

Tabelle 2.: Programme der isoelektrischen Fokussierung mit der IPGPhor

Temperatur: 20°C; (Abk.: Grad.: Gradient)

2.10.3 Isoelektrische Fokussierung mit der Multiphor II

Die Rehydration erfolgte für mindestens 6 h bei Raumtemperatur. Die rehydrierten Streifen wurden für 5 sec unter fließendem Wasser gespült und auf angefeuchteten Whatman-Papier getrocknet. Dann wurden die Streifen in die mit Öl gefüllte Vertiefungen der Multiphor gelegt. Als Elektrodenstreifen dienten mit Wasser angefeuchtete Whatman-Papierstreifen. Um Luft-Kohlendioxid abzufangen, wurde ein mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder NaOH getränktes Filterpapier auf eine Seite gelegt. Vor Schließen des Deckels wurde mit Argon überschichtet, um Verdunstungen zu vermeiden. Die Elektrodenstreifen wurden nach ca. der Hälfte der Fokussierzeit ausgetauscht.

Programm der IEF mit der Multiphor II

0,5	h	150 V
1	h	300 V
0,5	h	600 V
0,5	h	1500 V
20 – 40	h	3500 V

Die Streifen wurden nach der isoelektrischen Fokussierung zur Ölentfernung mit fließendem Wasser gespült, zwischen vorgefeuchteten *Whatman*-Papier getrocknet und für die zweite Dimension äquilibriert. In der ersten Lösung war DTT enthalten, um die Proteine in der reduzierten Form zu erhalten, die zweite Lösung hatte als Zusatz Iodacetamid, um überschüssiges DTT, dass bei anschließender Silberfärbung ‚point-streaking‘ verursachen würde, zu entfernen.

Äquilibrierungslösung

6	M	Urea		
4	% (w/v)	CHAPS		
0,05	M	Tris-HCl, pH 8,8		
2	% (w/v)	SDS		
2	% (w/v)	DTT bzw. 4,8	% (w/v)	Iodacetamid

2.10.4 SDS-PAGE (2. Dimension der 2D Elektrophorese)

Die IPG-Streifen wurden nach der isoelektrischen Fokussierung für 15 min bei RT in der Äquilibrungslösung inkubiert. Die Auftrennung der fokussierten Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte anschließend bei den 13 cm IPG Streifen in der Sigma-Kammer und bei den 17 / 18 cm Streifen in der 10 fach Laufkammer der Hoefer Iso Dalt Apparatur mit 10 - 12,5 % igen (w/v) Acrylamidgelen.

2.10.5 Silberfärbung von Proteingelen

Das Färben der Gele erfolgte mit dem „silver staining kit“ der Firma Pharmacia nach den Angaben des Herstellers.

2.10.6 Silberfärbung von Proteingelen (Ammoniacal Silver (Diamine) Staining/Geneva (Hochstrasser *et al*, 1989; Rabilloud, 1992, modifiziert nach Coligan *et al*, 1997))

Die Silberfärbung wird in 40x27 cm großen Pyrex-Schalen durchgeführt. Pro Gel werden 500 ml Lösung verwendet.

Für die Polyacrylamid Gele wird PDA (Piperazin Diacrylamid) als Quervernetzer eingesetzt, da Bisacrylamid bei basischen Bedingungen hydrolysiert wird und dies zu einem hohen Hintergrund bei der Silberfärbung führt (PDA: Hochstrasser *et al*, 1988).

Außerdem werden die Gele ohne SDS hergestellt, um die Bildung von Micellen, die Acrylamid Monomere enthalten, zu reduzieren. Dies führt zu einer höheren Homogenität der Porengröße und reduziert den Anteil von unpolymerisierten Monomeren im Gel. Der Einsatz von Natriumthiosulfat soll den Hintergrund bei der Silberfärbung ebenfalls erniedrigen.

Protokoll

Waschen	Wasser	5 min
Fixierung 1		1 h

Fixierung 2		2 h oder über Nacht
Waschen	Wasser	5 min
Fixierung 3		3 x 30 min
Waschen	Wasser	3 x 10 min
NDS (0.5 g/l 2,7-napthalene-disulfonic acid)		2 x 30 min
Waschen	Wasser	4 x 15 min
Silberfärbelösung		30 min
Waschen	Wasser	4 x 4 min
Entwickeln		5-10 min
Stop	5% (w/v) Tris, 2% (v/v) Essigsäure	10 min

Fixierung 1

40	% (v/v)	Ethanol
10	% (v/v)	Essigsäure

Fixierung 2

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

Fixierung 3

0,5	M	Natriumacetat
10	ml/l	Glutaraldehyd

Silberfärbelösung

0,8	% (w/v)	Silbernitrat
1,33	% (v/v)	Ammoniaklösung
0,08	% (w/v)	Natriumhydroxid

Entwickler

0,01	% (w/v)	Zitronensäure
0,1	% (v/v)	Formaldehyd

2.10.7 Färbung mit fluoreszierenden Farbstoffen

Nach der Elektrophorese werden die Gele in Plastikschaalen überführt. Die Fixierung der Proteine erfolgt in einer Lösung aus 10 % (v/v) Methanol und 7 % (v/v) Essigsäure für 30 min. Das Färben der Gele wird für ca. 3h bei Raumtemperatur und ständigem langsamen Schütteln (50 UpM) unter Lichtabschluß durchgeführt. Dabei müssen die Gele ausreichend von der Färbelösung bedeckt sein. Die Detektion der Proteine erfolgt durch Anregung mit ultraviolettem Licht (250 nm). Die optimalen Anregungswellenlängen für SYPRO Ruby betragen 300 nm und 618 nm. Die Detektion erfolgte mit dem *Gel doc 1000* Apparatur der Firma Bio Rad.

Für die Färbung mit Sypro Tangerine erfolgt die Fixierung der Proteine in den Gelen mit einer 10 % igen (v/v) Essigsäurelösung. Zur Fixierung darf kein Methanol verwendet werden, da durch Methanol SDS aus den Gelen entfernt, dass für die Färbung mit Sypro Tangerine notwendig ist.

2.10.8 *In-vivo* Markierung von Proteinen mit ^{32}P ortho-Phosphat und anschließender 2D-Elektrophorese

Markierung zellulärer Proteine mit ^{32}P ortho-Phosphat für 2 h:

Die Phosphorylierung in intakten Zellen wird in 12 Loch-Platten durchgeführt. Die Platten werden zuerst mit steriler Gelatine-Lösung (0,1 % (w/v) in PBS) beschichtet und nach mehrmaligem waschen mit sterilem PBS werden pro Loch 2×10^5 Zellen ausgesät. Die Induktion mit Ponasteron (5 μM) erfolgt nach 4 – 5 Stunden für 18 – 48 Stunden. Die Kultivierung wird über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 durchgeführt. Zur Verarmung an anorganischem Phosphat werden die Zellen zweimal mit DMEM (phosphatfrei) gewaschen. Pro Loch werden 200 μl DMEM (phosphatfrei, 10 % dialysiertes FKS, sterilfiltriert) und entsprechend Ponasteron auf die Zellen gegeben. Die Vorinkubation erfolgt für 30 Minuten. Nach Zugabe von ^{32}P (ortho-Phosphat, 150 $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$) werden die Platten für 2 Stunden weiterinkubiert.

Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend mit kaltem PBS runtergespült und durch Zentrifugation (5

Minuten, 735 x g bei 4°C) sedimentiert. Nach vollständiger Entfernung des PBS werden die Zellen in 20 µl des 2D-Lysepuffers (9,5 M Urea, 65 mM DTT) für eine Stunde bei Raumtemperatur bei mehrmaligen vortexen lysiert. Nach erneuter Zentrifugation (1 Stunde, 40000 x g (20000 UpM), 15 °C) wird 1 µl des Überstandes für die Szintillationsmessung abgenommen. Die weitere Analyse erfolgt mittels 2D-Elektrophorese und anschließender Autoradiographie.

Nach Zugabe der entsprechenden Rehydrierungslösung (80 mM DTT) wird die Probe in die Gefäße für die IEF pipettiert, der entsprechende IPG-Streifen aufgelegt und nach Überschichten mit Mineralöl in der IPG-Phor die erste Dimension ausgeführt. Die zweite Dimension ist die Auftrennung der fokussierten Proteine in einer 10 % oder 12,5 % iger SDS-PAGE. Nach CBB-Färbung für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur und Entfärbung in Entfärbe-Lösung wird das Gel auf einem Vakuumtrockner bei 80 °C für 2 – 3 h getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei –80 °C für 1-3 Tage. Als Film wird ein Biomax-ML verwendet.

Markierung zellulärer Proteine mit ³²P ortho-Phosphat für 18 h:

Die Zellen werden wie oben beschrieben in eine 24 Loch-Platte ausgesät (pro Loch 10⁵ Zellen) und bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit phosphatfreiem DMEM werden pro Loch 250 µl Medium und entsprechend Ponasteron auf die Zellen gegeben. Das Labeln erfolgt für 18 h bei 37°C, 5% CO₂ in der Konzentration von 0,5 mCi/ml.

Die weitere Vorgehensweise erfolgt wie oben beschrieben.

2.10.9 *In-vivo* Markierung von Proteinen mit ³⁵S und anschließender 2D-Elektrophorese

„Labeling“ Mix von Pharmacia: 2/3 Methionin ; 1/3 Cystein
2,5 mCi in 175 µl Lösung

Medium: DMEM (Methionin und Cystein frei) Gibco BRL 21013-024
10 % dialysiertes FKS, sterilfiltriert

Die Vorinkubation der Zellen und die Durchführung des Versuches einschließlich der SDS-PAGE erfolgt analog zu dem *in-vivo* Markierung mit ^{32}P (s. 2.10.8)

Aussäen der Zellen und *in-vivo* Markierung

Die 12 Loch-Platten werden zuerst mit steriler Gelatine-Lösung (0,1 % (w/v) in PBS) beschichtet und nach zweimaligem waschen mit sterilem PBS werden pro Loch 2×10^5 Zellen ausgesät. Zur Verarmung an Methionin und Cystein werden die Zellen zweimal mit DMEM (Methionin- und Cysteinfrei) gewaschen. Pro Loch werden 400 μl DMEM (Methionin- und Cysteinfrei, 10 % dialysiertes FKS, sterilfiltriert) und entsprechend Ponasteron auf die Zellen gegeben. Die Vorinkubation erfolgt für 30 Minuten. Nach Zugabe von ^{35}S (labeling mix) 0,16 mCi/400 μl) werden die Platten für 18 Stunden bei 37°C , 5 % CO_2 weiterinkubiert.

Die Fixierung der Proteine in den Gelen wird durch Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Lösung aus Isopropanol:Wasser:Essigsäure (25:65:10) erreicht. Danach werden die Gele in einer Amplify-Lösung (Amersham Pharmacia) für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Trocknen erfolgt wie bei den mit CBB gefärbten Gelen auf einem Vakuumtrockner bei $70 - 80^\circ\text{C}$ für mindestens 3 h. Die Autoradiographie erfolgt bei -80°C . Als Film wurde ein Biomax-MR verwendet. Die Gele werden nicht mit CBB gefärbt, da die anschließende Behandlung mit der Amplify-Lösung die Proteine wieder vollständig entfärben würde. Um überschüssiges ^{35}S zu entfernen, werden die Gele über Nacht in einer verd. Schwefelsäurelösung geschwenkt. Vor dem Trocknen werden die Gele mit Wasser gewaschen.

2.10.10 Immunpräzipitation nach *in-vivo* Markierung mit ^{35}S

„Labeling“ Mix von Pharmacia: 2/3 Methionin ; 1/3 Cystein
(2,5 mCi in 175 μl Lösung)

Medium: DMEM (Methionin und Cystein frei) Gibco BRL 21013-024
10 % dialysiertes FKS, sterilfiltriert

Immobilisierung des Antikörpers

Der Antikörper, der für die Immunpräzipitation (IP) eingesetzt werden soll, wird über Nacht an Protein A- bzw. G-Sepharose bei 4°C immobilisiert, da die spätere Inkubation bei RT durchgeführt wird. Z. B. für die Immunpräzipitation von GFP-MKK7 mit dem anti-GFP Antikörper werden 2 µl des Antikörpers an 30 µl äquilibrierte Protein-G Sepharose in 500 µl IP-Puffer immobilisiert.

Lyse der Zellen, Immunpräzipitation und SDS-PAGE

Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend mit kaltem PBS abgelöst und durch Zentrifugation (5 Minuten, 735 x g bei 4°C) sedimentiert. Zu dem Zellpellet wird 30 µl Ganzzelllyse-Puffer (mit Inhibitoren) pipettiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (15 min, 4°C, 10000 x g) wird das Lysat zu den über Nacht immobilisierten Antikörper gegeben und für 3 h bei RT gerüttelt.

Zur Überprüfung des Einbaus von ³⁵S wird 1 µl des Lysats in die Szintillationsmessung eingesetzt.

Protein A bzw. G-Sepharose werden sedimentiert (10000 x g, 2 min, 4°C). Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wird das Sediment dreimal mit 1 ml IP-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 20 µl eines SDS-Lämmli-Auftragspuffers werden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Dabei werden die Protein-Antikörperkomplexe von der Protein A bzw. G-Sepharose abgelöst. Nach Zentrifugation werden die Proteine auf einem SDS-Gel (7,5 – 10 %) aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese erfolgt die Fixierung der Proteine durch Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Lösung aus Isopropanol:Wasser:Essigsäure (25:65:10). Danach werden die Gele in einer Amplify-Lösung (Amersham Pharmacia) für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und auf einem Vakuumtrockner bei 70 – 80 °C für mindestens 3 h getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt bei –80 °C für 1 bis 7 Tage. Als Film wird ein Biomax-MR verwendet.

2.11 Atlas Human cDNA Expression Array

Die *Atlas Human cDNA Expression Array I* (Clontech) beinhaltet 588 humane cDNAs als Doppelspots auf einer positiv geladenen Nylonmembran, sowie Plasmid- und Bakteriophagen-DNA als Negativkontrollen für die Hybridisierungsspezifität, außerdem 9 „housekeeping „cDNAs, die als Positivkontrollen verwendet werden.

Präparation von Gesamt-RNA (Chomczynski and Sacchi, 1987)

D: Denaturierungslösung

4	M	Guanidiniumthiocyanat
25	mM	Natriumcitrat, pH 7,0
0,5	% (w/v)	Sarcosyl(N-lauroylsarcosin Natrium Salz)
0,1	M	2-Mercaptoethanol

Ansetzen der Ausgangslösung:

100 g Guanidiniumthiocyanat mit 117,2 ml Wasser, 7,04 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0 und 10,56 ml 10% (w/v) -iger Sarcosyl-Lsg. versetzen, bei 65°C lösen

Zu 50 ml der Ausgangslösung werden 0,36 ml 2-Mercaptoethanol pipettiert.

2	M	Natriumacetat-Lösung, pH 4,0
---	---	------------------------------

Durchführung:

Für 1×10^6 Zellen werden 0,1 ml der Denaturierungslösung verwendet.

Die mit PBS gewaschenen Zellpellets werden in 1 ml der Denaturierungslösung resuspendiert und homogenisiert. Dazu pipettiert man 0,1 ml einer 2 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,0, 1 ml Phenol (Wasser gesättigt) und 0,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol (49:1). Nach Zugabe jeder Lösung durch Invertieren mischen und dann für 10 Sekunden vortexen. 15 Minuten auf Eis inkubieren und anschließend für 20 Minuten bei 4°C und 10000 x g zentrifugieren. Die wässrige Phase enthält die RNA, die in ein frisches Röhrchen überführt und durch Zugabe von 1 ml Isopropanol und Inkubation bei -20°C für 1 Stunde präzipitiert wird. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) und Entfernen des Überstandes resuspendiert man das Pellet in 0,3 ml der Denaturierungslösung. Die nächste Präzipitation erfolgt nach Zugabe von 0,3 ml

Isopropanol und Inkubation bei -20°C für 1 Stunde. Nach Zentrifugation von 10 Minuten bei 4°C und $10000 \times g$ wäscht man das RNA-Pellet mit 75 % (v/v) -igen Ethanol und zentrifugiert für 20 Minuten bei $10000 \times g$. Das erhaltene RNA-Pellet wird getrocknet und anschließend in $50 \mu\text{l}$ einer 0,5 % (w/v) -igen SDS-Lösung bei 65°C für 10 Minuten gelöst.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Bestimmung der Extinktion einer geeigneten Verdünnung bei 260 nm.

$$40 \times A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Außerdem wird die RNA auf einem denaturierendem Agarosegel aufgetrennt.

DNase Behandlung der Gesamt-RNA

Um Verunreinigungen durch DNA zu vermeiden, wird die erhaltene Gesamt-RNA mit DNase behandelt. Das Vorgehen folgt der Anleitung des Handbuchs des Herstellers.

mRNA-Präparation

Die Präparation der mRNA erfolgt mit dem Qiagen-Kit nach den Angaben des Herstellers.

Nach Elution mit $2 \times 30 \mu\text{l}$ H_2O wird die mRNA erneut präzipitiert, da sonst die Volumina zu groß werden.

Die Präzipitation erfolgt durch Zugabe von $12 \mu\text{l}$ 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung, 0,3 ml Glycogen und 150 ml 99 %-igen (v/v) Ethanol bei -80°C für mindestens 1 Stunde. Durch Zugabe von Glycogen kann man das mRNA-Pellet sichtbar machen. Nach Zentrifugation bei $10000 \times g$, 4°C für 20 Minuten, entfernen des Überstandes wird das RNA-Pellet mit 80 %-igen (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.), wird das Pellet getrocknet und dann in $2 \mu\text{l}$ Wasser aufgenommen.

Synthese der cDNA aus der mRNA

Das weitere Vorgehen erfolgt nach dem Handbuch der Firma Clontech *AtlasTM cDNA Expression Arrays User Manual* (PT3140-1).

Die Hybridisierung erfolgt über Nacht für 18 h bei 42°C , nach Durchführung der Stringenzwäsche erfolgt die Detektion mittels Autoradiographie.

2.12 FACS Untersuchungen

Die Ansätze der indirekten Immunfluoreszenz werden in einem Durchflußzytometer FACS (Becton-Dickinson) analysiert. Die Zellen werden in einer sogenannten Markierung eingegrenzt. Es werden 10.000 Zellen pro Ansatz ausgewertet, wozu die LYSIS 2.1.-Software der Firma Becton-Dickenson verwendet wird.

Einfarbenhistogramme stellen die Anzahl der gemessenen Zellen auf der Ordinate und die GFP-Fluoreszenzintensität auf der Abszisse einer logarithmischen Skala gegenüber.

3 ERGEBNISSE

3.1 Funktionelle Charakterisierung von regulierbarer und konstitutiver Expression von GFP-MKK7

3.1.1 Klonierung der GFP-MKK7-cDNAs in den Expressionsvektor pIND

1. Amplifikation der MKK7 cDNA mittels PCR

Als Ausgangs-DNA für die Amplifikation von MKK7 cDNAs wurden Plasmide von Pamela Holland eingesetzt. Die cDNAs von MKK7 Wildtyp und 3 verschiedenen Mutanten wurden als *Bam* HI Fragmente in die *Bgl* II Schnittstelle des Vektors pCS3MT kloniert. Die kodierten Fusionsproteine enthalten N-terminal 6 myc-Epitope und werden unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Da durch diese Klonierungsstrategie die *Bam* HI Schnittstelle von pCS3MT zerstört wurde, wurde eine PCR Klonierung angewendet. Hierbei enthielten die verwendeten Primer *Bam* HI Schnittstellen, und die PCR Reaktionen wurden mit Pfu Polymerase durchgeführt.

Als Ausgangs-DNA wurden jeweils 50 ng eingesetzt. Es wurde eine PCR mit 25 Zyklen durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit des Einbaus falscher Basen klein zu halten.

2. Klonierung der MKK7 PCR Produkte in den Vektor pEGFP-C1

Die mittels PCR amplifizierten Konstrukte wurden über die *Bam* HI Schnittstelle in den Vektor pEGFP-C1 (Clontech) ligiert. Dies ermöglicht die N-terminale Fusion von MKK7 an GFP. Die entstehenden Proteine werden über einen CMV Promotor konstitutiv exprimiert.

3. Subklonierung in den pIND Vektor

Die kodierende Region der GFP-MKK7 cDNA wurde über *Nhe* I/*Xba* I Verdauung aus pEGFPMKK7 in den Vektor pIND subkloniert. Dieser Vektor wurde hergestellt, indem aus dem Plasmid pIND/*lacZ* (Invitrogen) das *lacZ* Gen durch *Nhe* I/*Xba* I entfernt worden war, und der Vektor religiert wurde.

Die verwendete Restriktionsendonuklease *Xba* I ist ein Enzym, deren Erkennungssequenz GATC teilweise mit der Dam-Methylierungssequenz überlappt. Die Methylase, die durch das *dam* Gen kodiert wird, überträgt eine Methylgruppe des S-

Adenosylmethionins auf die N⁶-Position des Adenosinrestes in der Sequenz GATC (Marinus und Morris, 1973). DNA, die aus Bakterien isoliert wird, die dieses Gen enthalten, wird nicht durch *Xba* I geschnitten. Deshalb wurden für diese Subklonierung dam-methylierungs-negative Bakterien (*E. coli* GM2163) verwendet.

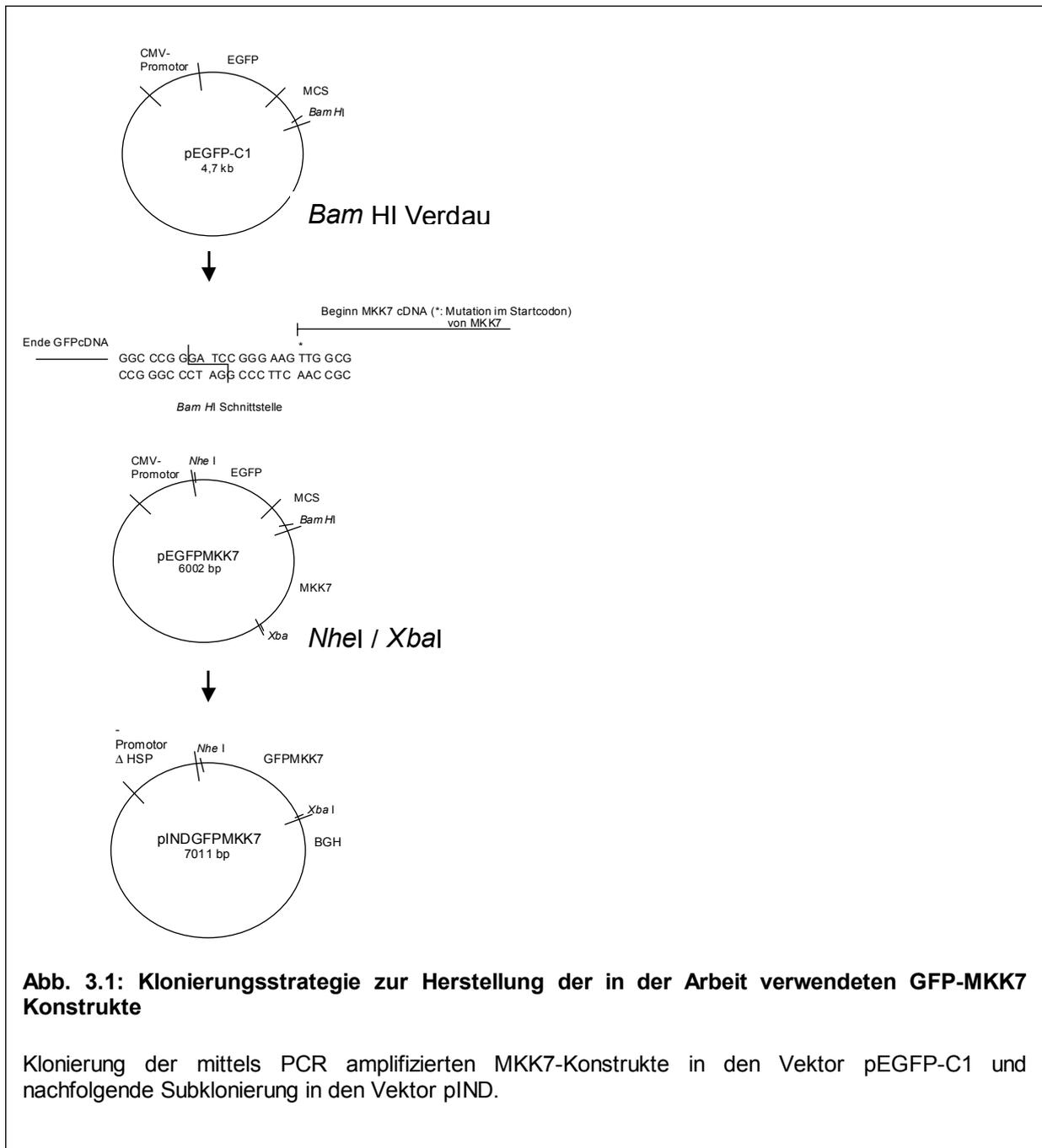


Abb. 3.1: Klonierungsstrategie zur Herstellung der in der Arbeit verwendeten GFP-MKK7 Konstrukte

Klonierung der mittels PCR amplifizierten MKK7-Konstrukte in den Vektor pEGFP-C1 und nachfolgende Subklonierung in den Vektor pIND.

Für die Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde eine MKK7-Isoform verwendet, die von P. Holland, USA, zur Verfügung gestellt wurde. Dabei handelt es sich um die murine Form MKK7- β 1, die eine Verkürzung im carboxyterminalen Bereich aufweist und außerdem eine Deletion zwischen der 42. und 58. Aminosäure hat. Die Aminosäuresequenz der humanen Form ist mit der verwendeten murinen MKK7 Form bis auf die Verkürzung identisch. (Die Isoformen der MKK7 Proteine sind im Anhang angegeben.)

Es wurden 4 verschiedene MKK7-Konstrukte kloniert:

MKK7 Wildtyp (wt)

MKK7_{3E} Mutante

MKK7_{3A} Mutante

MKK7_{K149M} Mutante

Bei MAPK Kinasen ist die Generierung von Mutanten durch Austausch von Aminosäuren in der Kinase-Domäne VIII möglich. Durch die mutierten Aminosäuren wird die Ladung in der Domäne verändert, und die Kinase nimmt eine aktive Konformation ein. Eine andere Möglichkeit eine konstitutiv aktive MAPK Kinase herzustellen, besteht in der Einführung einer Deletion, die zur Veränderung der N-terminalen Struktur führt. Beides wurde für MKK1 erfolgreich durchgeführt (Masour *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1996; Resing und Ahn, 1998). Der Austausch der Aminosäuren wurde bei MKK3 und MKK6 ebenfalls angewendet (Raingeaud *et al.*, 1996).

Der Austausch von Aminosäuren in der regulatorischen Thr-X-Tyr Sequenz führt dagegen bei MAPK nicht zu aktiven Kinasen (Widmann *et al.*, 1999).

Für die aktive Form von MKK7 wurden die Serine der regulatorischen Phosphorylierungsstellen, sowie ein zusätzlich nur in MKK7 vorhandenes Threonin, jeweils zu der geladenen Aminosäure Glutaminsäure mutiert (Ser-271, Thr-275 und Ser-277 zu E) (MKK7_{3E}). Die inaktiven Formen wurden generiert, indem die drei erwähnten Aminosäuren zu Alanin (MKK7_{3A}) bzw. die ATP Bindungsstelle Lysin in der Subdomäne II zu Methionin mutiert wurden (MKK7_{K149M}). Der Austausch dieses Lysins gegen andere Aminosäuren führt zum Verlust der Kinaseaktivität (Hanks *et*

al., 1988). Das Lysin scheint direkt in den Transfer des Phosphatrestes involviert zu sein, es könnte z.B. den Protonentransfer übermitteln (Kamps und Sefton, 1986).

```

1   MAASSLEQKL SRLEAKLKQE NREARRRIDL NLDISPQRPR PTLQLPLAND
51  GGSRSPPSES SPQHPTPPTR PRHMLGLPST LFTPRSMESI EIDQKLQEIM
      I                               II
101 KQTGYLTIGG QRYQAEINDL ENLGEMGSGT CGQVWKMFRF KTGHVIAVKQ
      III                             IV
151 MRRSGNKEEN KRILMDLDVV LKSHDCPYIV QCFGTFITNT DVFIAMELMG
      VI
201 TCAEKLKERM QGPIPERILG KMTVAIVKAL YYLKEKHGVI HRDVKPSNIL
      VII                             VIII
251 LDERGQIKLC DFGISGRLVD SKAKTRSAGC AAYMAPERID PPDPTKPDYD
      IX
301 IRADVWSLGI SLVELATGQF PYKNCKTDFE VLTQVLQEEP PLLPGHMGFS
      X
351 GDFQSFLKDC LTKDHRKRPK YNKLLHSFI KRYETLEVDV ASWFKDVMAK
      XI
400 TESPRTSGVL SQPHLPFFR 419

```

Abb. 3.2: Aminosäuresequenz von MKK7a (Human)

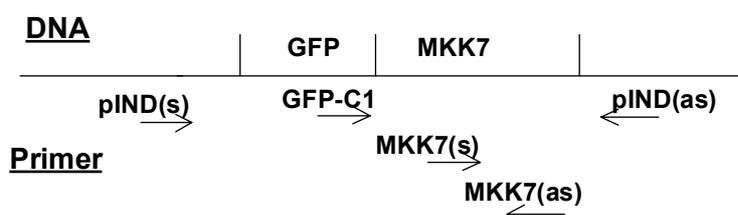
Das Lysin in der ATP-Bindungsdomäne (K149) und die regulatorischen Aminosäuren in der Subdomäne VIII (S271, T275 und S277) sind gekennzeichnet (●).

Alle Mutanten von MYC-MKK7, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, wurden auch von Holtmann *et al.*, 1999, eingesetzt und funktionell charakterisiert.

Die Integrität der Mutationen und das offene Leseraster wurde durch DNA-Sequenzierung mit fluoreszierenden Farbstoffen mit dem *ABI PRISM 310* Sequenziergerät verifiziert. Hierzu wurden folgende 5 Primer verwendet:

- MKK7(s) und MKK7(as)
- pIND(s): Ekdyson forward (Invitrogen) und pIND(as): BGH reverse (Invitrogen)
- GFP-C1

Schema der verwendeten Primer mit den jeweiligen „Annealing“-Stellen an der DNA



3.1.2 Vergleich der Aktivität von MKK7 fusioniert an MYC oder GFP Polypeptide unter transienten Transfektionsbedingungen

3.1.2.1 Nachweis der Proteinexpression

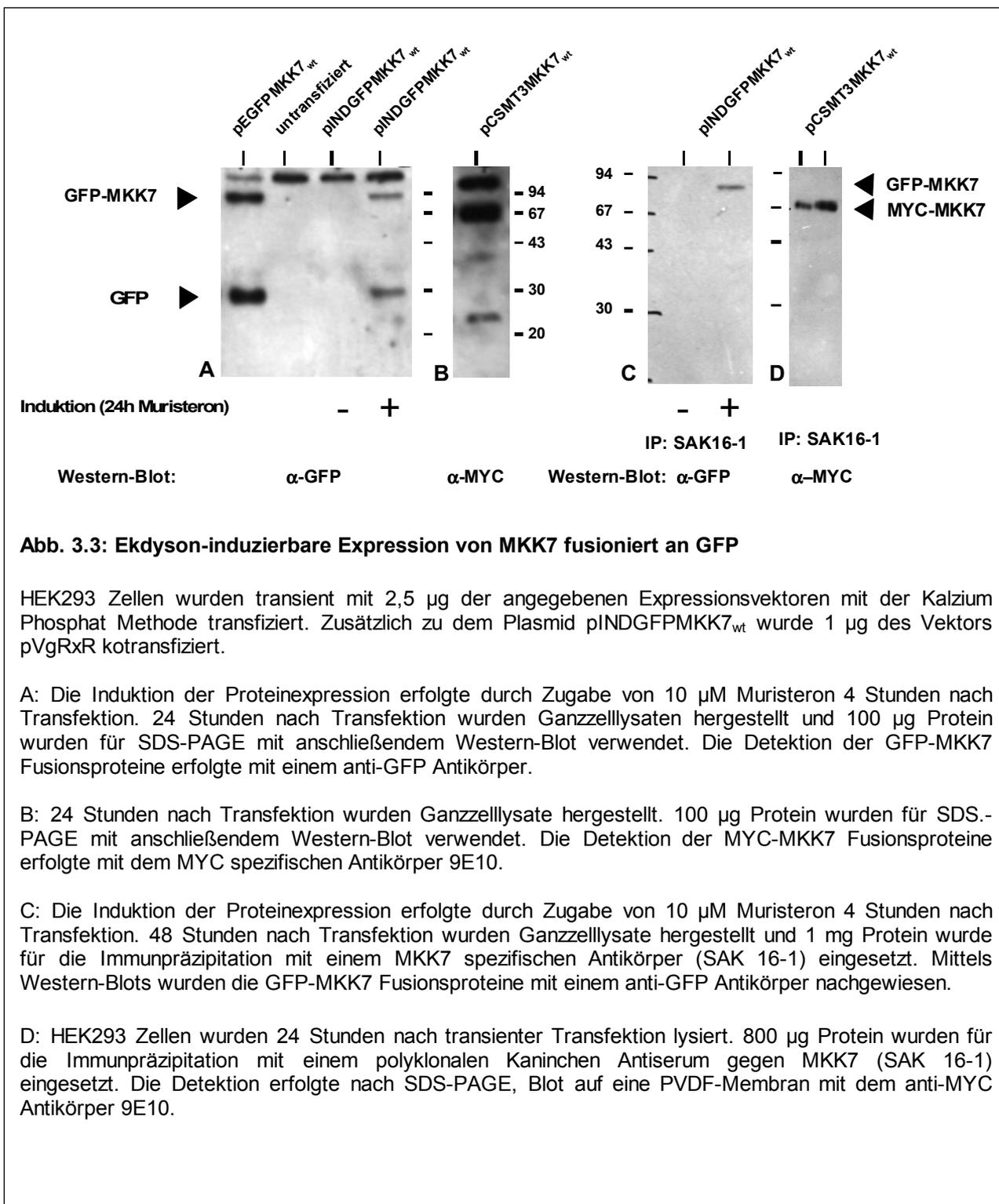
Um den Einfluß des GFP Anteils auf die MKK7 Aktivität zu untersuchen, wurden eine Reihe transienter Transfektionen durchgeführt. Dazu wurden parallele Transfektionen in HEK293 Zellen mit den MYC-MKK7 und den GFP-MKK7 Konstrukten durchgeführt.

Zusätzlich wurde das Ekdyson System unter transienten Bedingungen untersucht, indem die entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert wurden.

Die Expression der Fusionsproteine konnte mittels Western-Blot durch Verwenden von Antikörpern, die gegen die jeweiligen Epitope gerichtet waren, nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten Immunpräzipitationsversuche (IP) mit einem polyklonalen α MKK7 Antikörper anhand der MYC-getaggten MKK7 Proteine, dass diese Technik ebenfalls für den sensitiven Nachweis von MKK7 geeignet war.

Die Untersuchung des Ekdyson-Expressionssystems zeigte eine gute Induzierbarkeit. In den nicht induzierten Proben konnte keine basale Proteinexpression nachgewiesen werden.

Unter transienten Bedingungen ist die Expression der Proteine, die unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV Promotors exprimiert werden, etwas stärker als die der Proteine des Ekdyson-induzierbaren Expressionssystems.

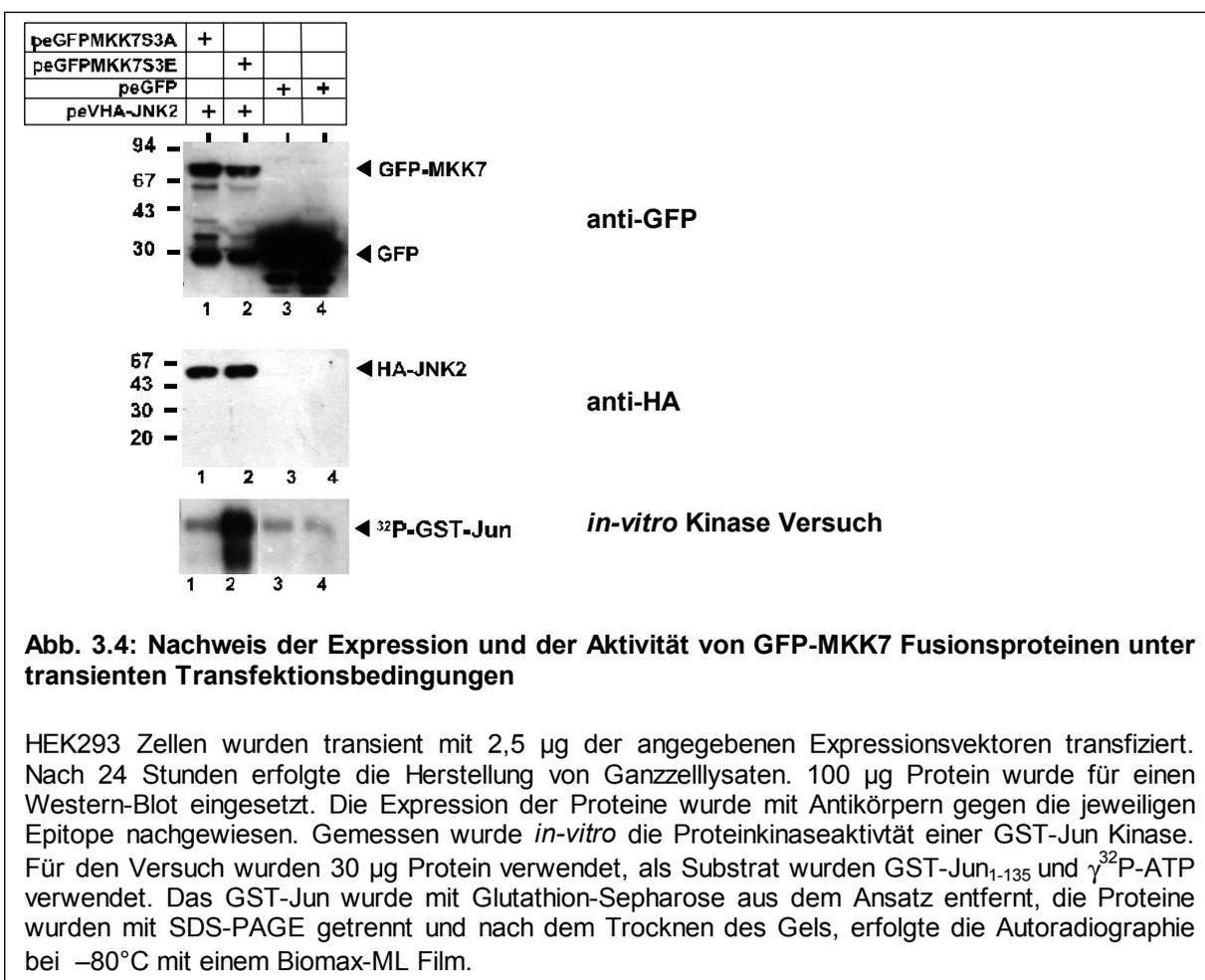


3.1.2.2 Nachweis der Aktivität der verschiedenen MKK7 Fusionsproteine

Die Aktivität der GFP-MKK7 Fusionsproteine wurde nach transienter Transfektion von unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV Promotors exprimierten Proteine in einem *in-vitro* Kinase Versuch untersucht. Es wurde die Aktivität der konstitutiv aktiven MKK7 Mutante 3E mit der inaktiven Mutante 3A verglichen. Weiter

wurde ein Expressionsvektor für JNK2, einem intrazellulärem Substrat von MKK7, kotransfiziert. Dadurch wurde der Kinase Versuch sensitiver. Die Durchführung einer Immunpräzipitation (IP) war für diese Versuche nicht erforderlich, da Jun ein spezifisches JNK Substrat darstellt. Die gleichmäßige Expression der Proteine wurde im Western-Blot mit Antikörpern gegen die jeweiligen „Tags“ nachgewiesen.

Die Expression der aktiven MKK7 Mutante 3E führte zu einer starken intrazellulären Aktivierung von JNK2, erkennbar daran, dass in Lysaten aus MKK7_{3E} transfizierten Zellen eine deutliche *in-vitro* Phosphorylierung von rekombinanten GST-Jun₁₋₁₃₅ durch in den Extrakten enthaltenen JNKs erfolgte. GST-Jun₁₋₁₃₅ wird nur von JNKs phosphoryliert. Im Vergleich dazu bewirkte die etwa gleichstark exprimierte Mutante 3A keine Erhöhung der zellulären JNK Aktivität über die in untransfizierten Lysaten beobachtbare hinaus.



In einem *in-vitro* Kinase Versuch erfolgte ein direkter Vergleich der Aktivität von konstitutiv aktiven (3E) und inaktiven (3A) MKK7 Mutanten, die entweder mit MYC bzw. GFP fusioniert waren.

Die Koexpression von JNK2 erhöhte die Sensitivität des Kinase Versuchs. Die stärkste Phosphorylierung von GST-Jun₁₋₁₃₅ wurde in den Lysaten der Zellen, die mit der aktiven Mutante von MKK7 fusioniert an GFP transfiziert wurden festgestellt (s. Spur 5).

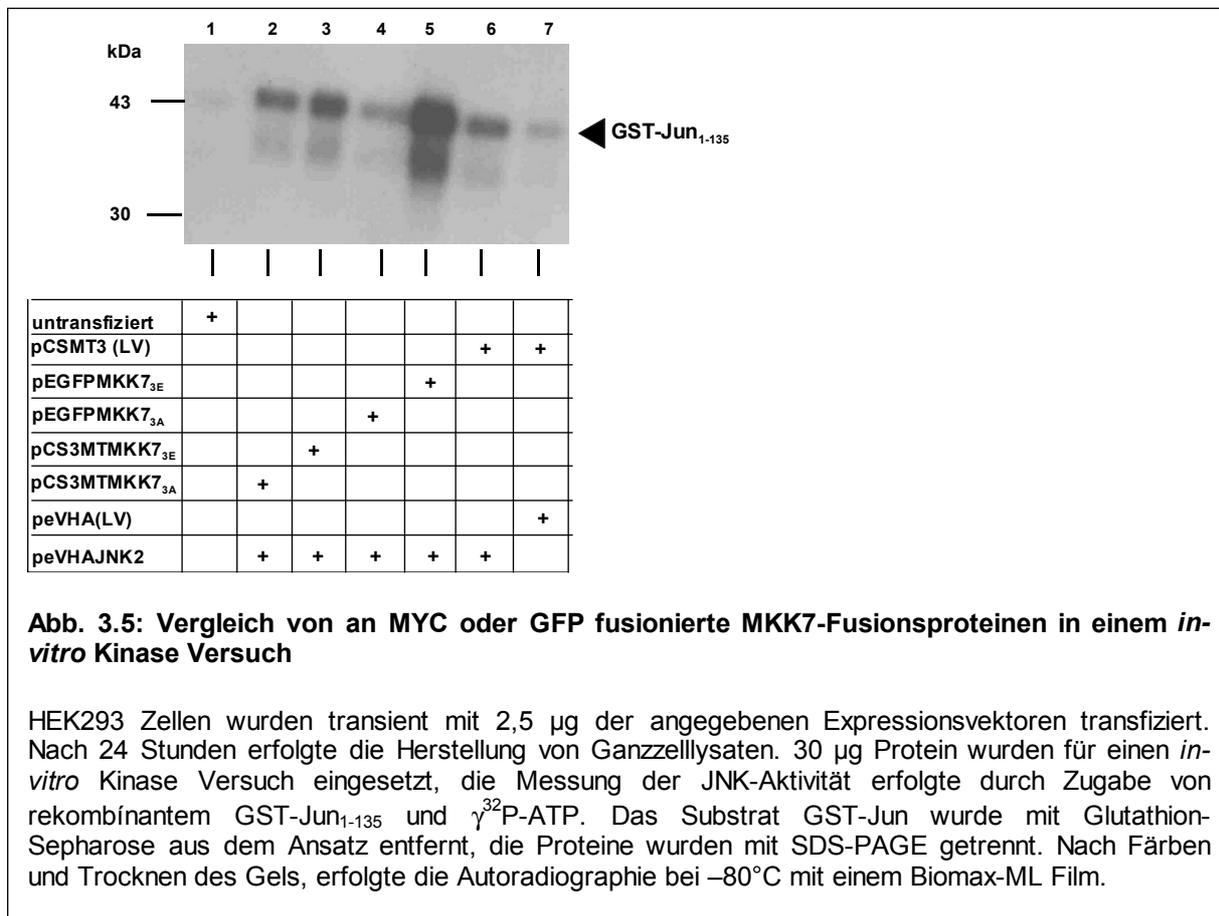


Abb. 3.5: Vergleich von an MYC oder GFP fusionierte MKK7-Fusionsproteinen in einem *in-vitro* Kinase Versuch

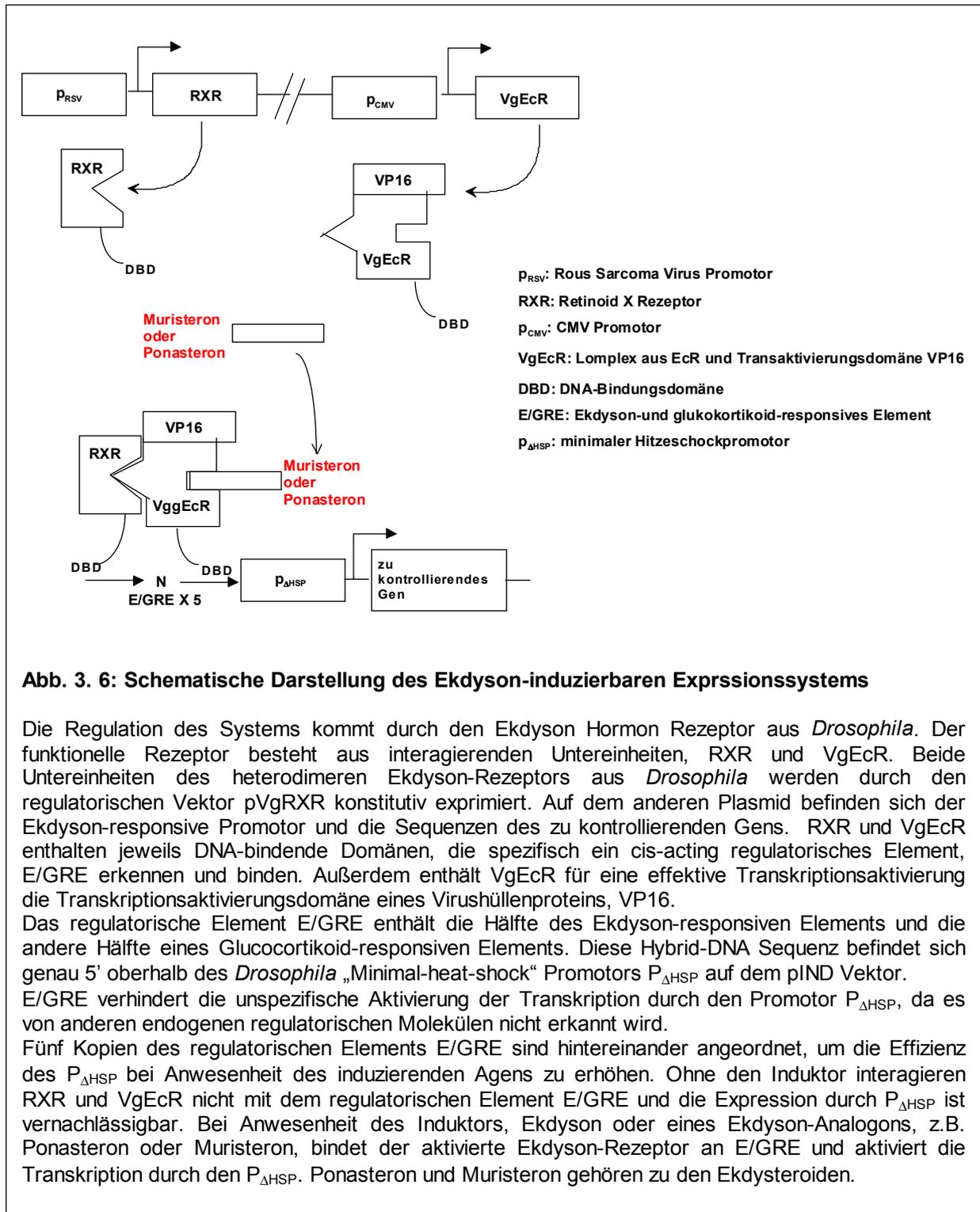
HEK293 Zellen wurden transient mit 2,5 µg der angegebenen Expressionsvektoren transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Herstellung von Ganzzelllysaten. 30 µg Protein wurden für einen *in-vitro* Kinase Versuch eingesetzt, die Messung der JNK-Aktivität erfolgte durch Zugabe von rekombinantem GST-Jun₁₋₁₃₅ und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Das Substrat GST-Jun wurde mit Glutathion-Sepharose aus dem Ansatz entfernt, die Proteine wurden mit SDS-PAGE getrennt. Nach Färben und Trocknen des Gels, erfolgte die Autoradiographie bei -80°C mit einem Biomax-ML Film.

Der durchgeführte Kinase Versuch ist eine indirekte Messung der MKK7 Aktivität. Eine schwache JNK Aktivität wurde in den Lysaten mit den entsprechenden Vektorkontrollen transfizierten Zellen sowie in nicht transfizierten Zellen festgestellt (Spur 1 und 7). In Lysaten, die mit der konstitutiv aktiven Mutante von MKK7 transfiziert wurden, ist eine verstärkte Jun Phosphorylierung detektierbar (Spur 3 und 5). Die Transfektion mit der inaktiven Mutante von MKK7, führte dagegen nicht zu einer Erhöhung der Jun Phosphorylierung (Spur 2 und 4).

Durch die Fusion mit GFP wurde die Aktivität von MKK7 nicht beeinflusst.

3.1.3 Etablierung des induzierbaren Ekdysen Expressionssystems

Für die Untersuchungen sollte GFP-MKK7 unter regulierbaren Bedingungen exprimiert werden. Dazu wurde das Ekdysen-induzierbare Expressionssystem etabliert.

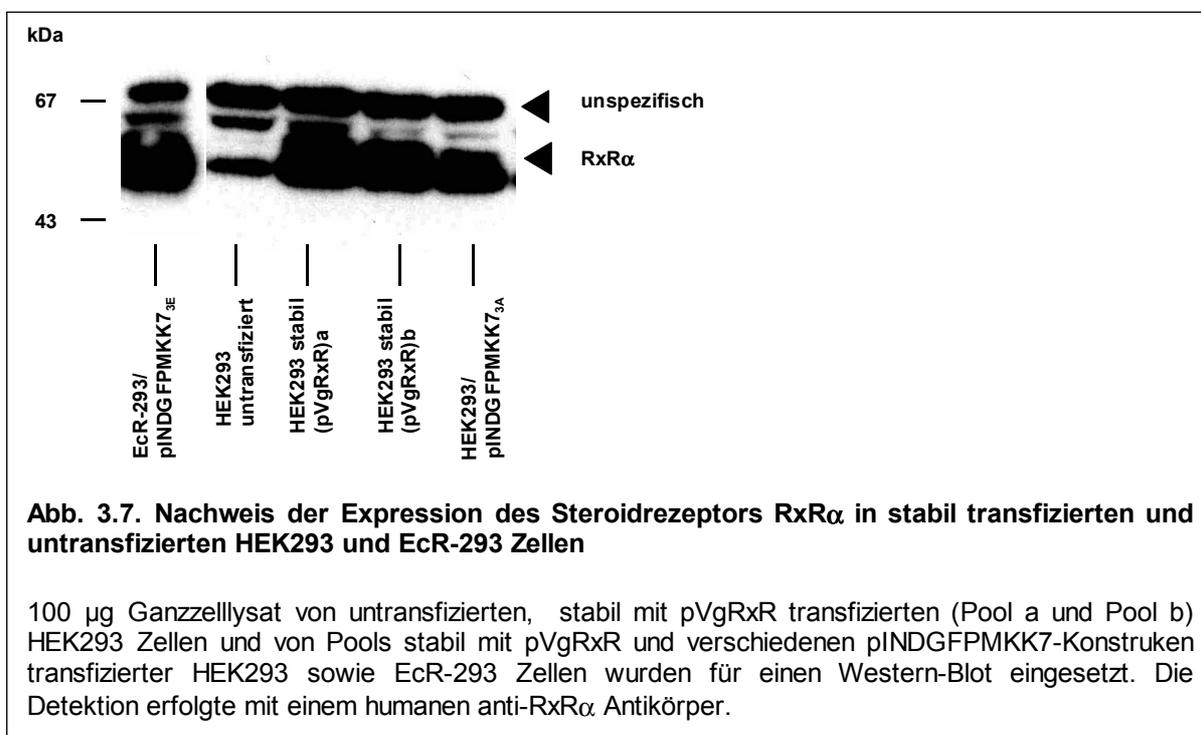


3.1.3.1 Nachweis des humanen Retinoid X Rezeptors $RxR\alpha$ in HEK293 und EcR-293 Zellen

Der Rezeptor $RxR\alpha$ bildet eine der beiden Untereinheiten des Ecdyson-Hormon-Rezeptors. Die Expression des Rezeptors ist für eine Expression von Proteinen mit dem induzierbaren Ecdyson-Expressionssystem unerlässlich. Die cDNA dieses modifizierten Ecdyson-Rezeptors (VgEcR) befindet sich auf dem Vektor pVgRxR zusammen mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne eines Virushüllenproteins (VP16).

Im Gegensatz zu dem Ecdyson-Rezeptor wird der $RxR\alpha$ -Rezeptor in vielen Geweben exprimiert. Entsprechend konnte mit dem anti- $RxR\alpha$ -Antikörper die Expression des humanen Retinoid X-Rezeptors in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden, die entweder selbst stabil mit pVgRxR transfiziert wurden oder von Invitrogen bezogen wurden.

Die Expression des Rezeptors konnte in allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Es wurden unterschiedliche Expressionsstärken festgestellt. Die Expression bei den stabil mit pVgRxR transfizierten Zellen (HEK293, bzw. EcR-293) war stärker als bei untransfizierten Zellen.



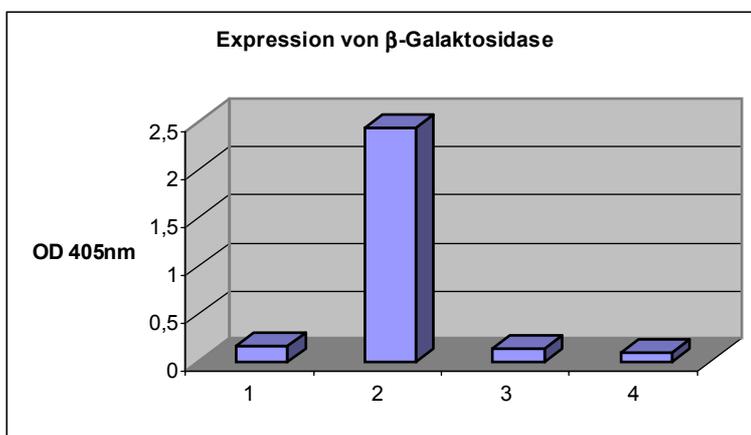
Die spezifischen Banden, die von dem Antikörper erkannt wurden, zeigen ein Protein der erwarteten Größe von ca. 50 kDa. Außerdem wurden unspezifische Banden

detektiert, die in allen Proben eine vergleichbare Stärke haben. Die spezifischen Banden waren wesentlich stärker als die unspezifischen, das zeigte, dass eine deutliche Überexpression vorlag.

Ein Antikörper gegen den Ekdysonrezeptor war nicht vorhanden. Deshalb wurden die Zelllinien zusätzlich funktionell untersucht.

3.1.3.2 Ekdyson regulierbare Expression von β -Galaktosidase unter transienten Transfektionsbedingungen mit EcR-293 Zellen

Die weiteren Analysen des Ekdyson Expressionssystems erfolgten mit einem Reporter gen. Dazu wurden EcR-293 Zellen transient mit dem Expressionsplasmid für β -Galaktosidase transfiziert. EcR-293 Zellen sind stabil mit dem pVgRxR Plasmid transfizierte HEK293 Zellen (Invitrogen). 6 Stunden nach Transfektion erfolgte die Induktion der Proteinexpression von β -Galaktosidase durch Zugabe von 5 μ M Muristeron. 24 Stunden nach Transfektion wurde mit einem Teil der Zellen eine X-Gal Färbung durchgeführt. Von den restlichen Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion Lysate für die photometrische Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität hergestellt.



1: pINDLacZ, transient, - Muristeron 2: pINDLacZ, transient, + Muristeron
3: EcR-293, - Muristeron 4: EcR-293, + Muristeron

Abb. 3.8: β -Galaktosidase-Aktivität nach Induktion mit Muristeron unter transienten Transfektionsbedingungen

EcR-293 Zellen wurden transient mit 2,5 μ g des Plasmids pINDlacZ unter Verwendung des Dospere Reagenz transfiziert. 6 Stunden nach Transfektion erfolgte die Induktion der Expression durch 5 μ M Muristeron. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert.

Die photometrische Bestimmung der Aktivität von β -Galaktosidase erfolgte mit dem Substrat OPNG. Das Balkendiagramm zeigt die Extinktionen bei OD 405 nm als Maß für die Aktivität der β -Galaktosidase in je 60 μ l Zellextrakt über 135 min.

Bei den nicht induzierten Zellen wurde keine β -Galaktosidase Aktivität festgestellt. Dies wurde durch die X-Gal Färbung, einer anderen Nachweismethode für die erfolgte Transfektion mit dem Expressionsplasmid für β -Galaktosidase, bestätigt. Bei den transfizierten und mit Muristeron behandelten Zellen wurden ca. 20 % der Zellen blau gefärbt. Bei den transfizierten Zellen, die nicht mit Muristeron behandelt wurden, und den weiteren Kontrollen konnten keine blau gefärbten Zellen gefunden werden.

Die verwendeten EcR-293 Zellen haben den Vektor pVgRxR und sind nach Induktion mit Muristeron unter transienten Transfektionsbedingungen zur Proteinexpression fähig. Das Ekdyson Expressionssystem zeigt unter transienten Transfektionsbedingungen eine ausreichende Proteinexpression.

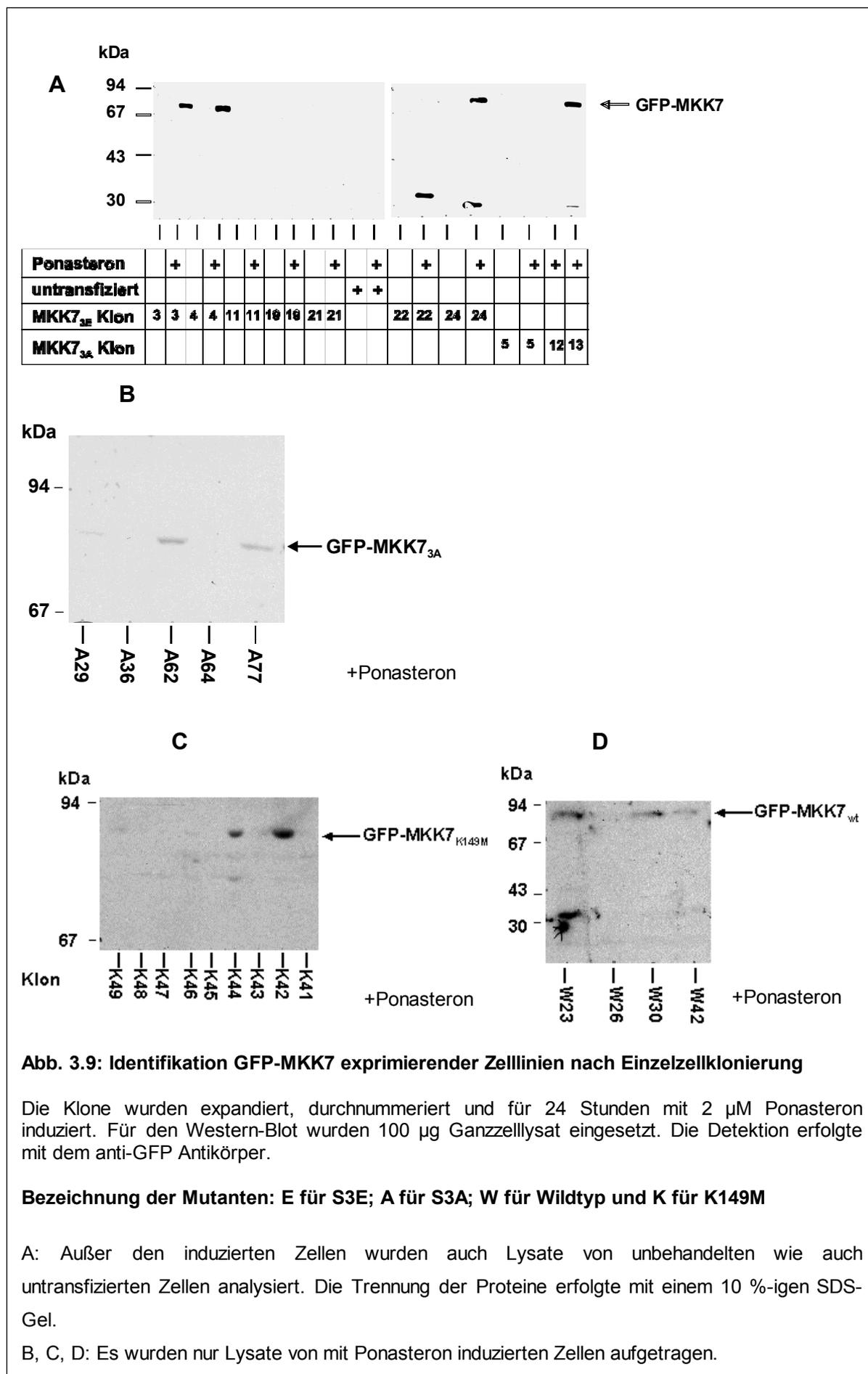
3.2 Etablierung stabil transfizierter Zelllinien nach Einzelzellklonierung

Nach Etablierung von Zelllinien, die einen funktionellen heterodimeren Ekdyson Rezeptor exprimieren, wurden diese Zellen mit den pIND Plasmiden, die die verschiedenen MKK7 cDNAs enthalten, transfiziert und anschließend für 3 bis 4 Wochen mit den Antibiotika Zeozin [400 μ g/ml] und G-418 [400 μ g/ml] selektiert. Danach wurden die selektierten Zellen mit dem Verfahren „limited dilution“ einzelzellkloniert.

Die auf diese Art erhaltenen Zellklone wurden nach Induktion mit Ponasteron in 96 Mikrotiterplatten durch Fluoreszenzmikroskopie auf Grünfluoreszenz untersucht, und positiv erscheinende Klone wurden nach Expansion im Western-Blot auf die Expression der GFP-MKK7 Fusionsproteine analysiert. Dazu wurden aus Zellen in T-25 Kulturflaschen, die für 24 Stunden mit 2 μ M Ponasteron induziert wurden, Ganzzelllysate hergestellt und diese mittels Western-Blot mit dem anti-GFP Antikörper untersucht.

Beispielhaft für dieses Vorgehen sind nachfolgend einige Versuchsergebnisse gezeigt.

Untersuchung der MKK7 exprimierender Zellklone durch Western-Blot



Durch die Western-Blot Analysen konnte in den Klonen E4, E3 und E24 das Fusionsprotein GFP-MKK7_{3E} nachgewiesen werden. Bei dem Klon E22 wurde mit dem anti-GFP Antikörper nur ein Protein von ca. 30-40 kDa detektiert, welches möglicherweise einem Spaltprodukt von GFP-MKK7 entspricht. Bei E24 und A13 konnte außer dem Fusionsprotein auch freies GFP detektiert werden, bei E24 wesentlich mehr als bei dem Klon A13. Weiter wurden als positive Klone A62 und A77 identifiziert. Die Banden waren recht schwach, genau wie bei W23, W30 und W42. Bei Lysaten des Klons W23 wurde GFP durch eine deutliche Bande angezeigt. Als positive Klone für GFP-MKK7_{K149M} wurden K42 und K44 nachgewiesen.

Es wurden von allen MKK7 Mutanten und dem Wildtyp positive Einzelzellklone identifiziert. Allerdings konnte in der ersten Einzelzellklonierung kein positiver Klon von GFP-MKK7_{K149M} gefunden werden. Deshalb wurde eine 2. Einzelzellklonierung von GFP-MKK7_{K149M} durchgeführt.

Nach der zweiten Klonierung wurden insgesamt 68 Klone getestet. Am Ende konnte bei 9 Klonen im Western-Blot die Expression von GFP-MKK7 nachgewiesen werden (s. Abb. 3.8, C).

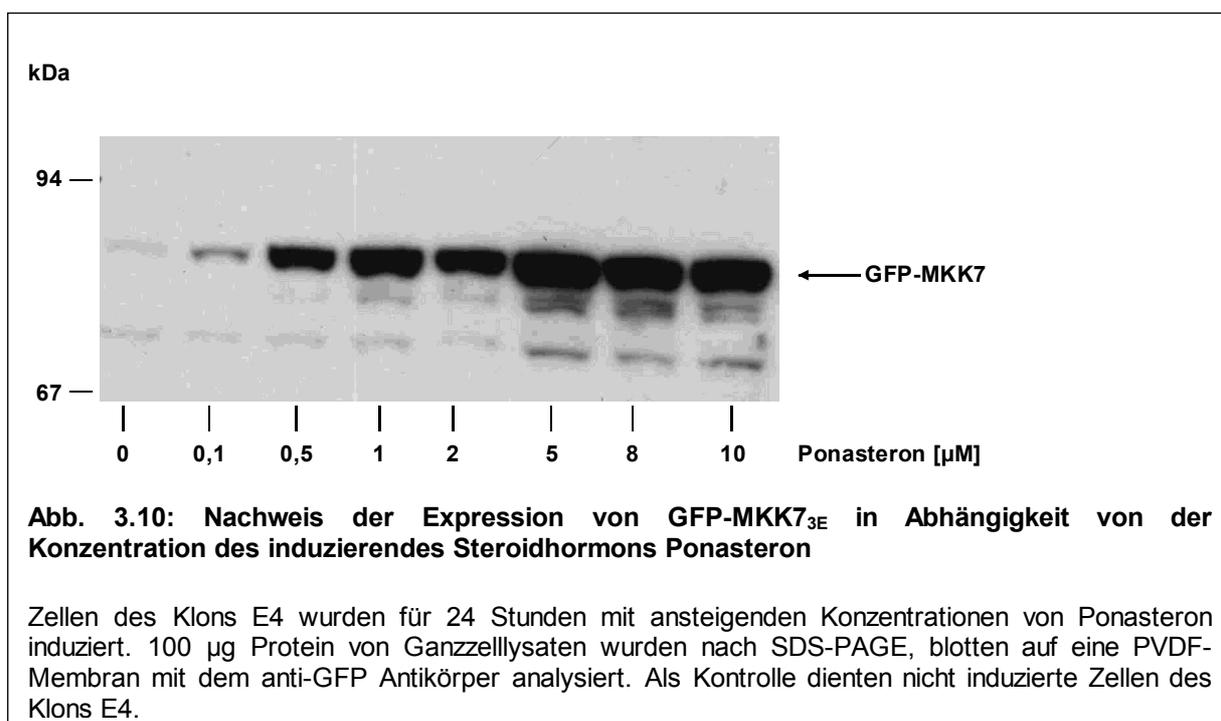
wt bzw. Mutante	Abk.	Anzahl Klone	Fluoreszenz positiv	Western positiv
MKK7 _{wt}	W	103	25 (stark) 65 (schwach)	9
MKK7 _{3E}	E	25	12	7
MKK7 _{3A} (EcR-293)	A	13	2	2
MKK7 _{3A} (HEK293/pVgRx)		79	22	6
MKK7 _{K149M}	K	137	20 (schwach)	-
2. Klonierung MKK7 _{K149M}	K	68	19	9

Tabelle 3: Statistik zur ersten Einzelzellklonierung

Anzahl der untersuchten Klone, sowie die Ergebnisse der Fluoreszenz- und Western-Blot Analysen

3.2.1 Zeit- und Dosis abhängige induzierbare Expression von GFP-MKK7_{3E}

Zellen des stabil transfizierten Klons E4 wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Ponasteron induziert. Nach Herstellung von Ganzzelllysaten erfolgte ein Western-Blot mit dem anti-GFP Antikörper.

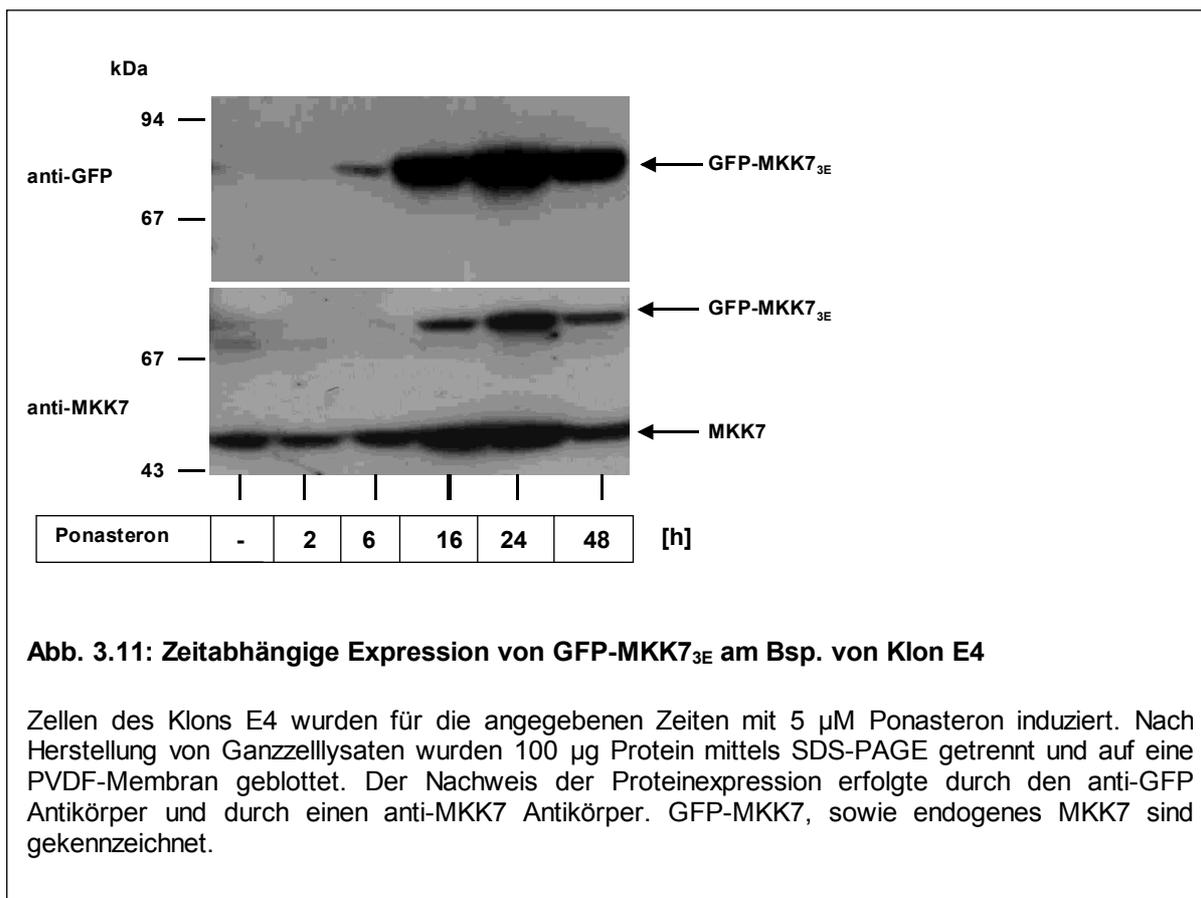


Die Induktion der Proteinexpression ist mit dem anti-GFP Antikörper bereits bei einer Konzentration von 0,1 µM Ponasteron nachweisbar. Bei Erhöhung der Konzentration auf mehr als 5 µM Ponasteron ist keine weitere Erhöhung der Proteinexpression feststellbar. Die Induktion mit Ponasteron folgt danach einer Dosiswirkungskurve, in nicht induzierten Zellen ist nur eine sehr schwache Bande auf der Höhe von GFP-MKK7 nachweisbar, somit ist die basale Aktivität des Ekdyson-responsiven Promotors sehr niedrig. Für alle folgenden Experimente wurde eine Konzentration von 2 – 5 µM Ponasteron oder Muristeron verwendet. Dabei wurde zunächst die Zeitabhängigkeit der GFP-MKK7 Expression von der Dauer der Induktion mit Drosophila Steroiden untersucht.

Durch Western-Blot Analyse wurde der Beginn der Proteinexpression des Fusionsproteins und der zeitliche Verlauf der Expression untersucht. Mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, eines Kaninchen anti-MKK7 Antikörpers, wurde neben dem induzierten Fusionsprotein auch endogenes MKK7 detektiert. Dadurch konnte die

Expressionsstärke des induzierten GFP-MKK7_{3E} im Verhältnis zu endogenem MKK7 beurteilt werden.

Mit dem anti-GFP Antikörper konnte bereits 6 h nach Induktion das Fusionsprotein GFP-MKK7_{3E} nachgewiesen werden. Mit dem anti-MKK7 Antikörper wurde erst nach 16 stündiger Induktion eine Bande der entsprechenden Größe detektiert (s. Abb. 3.11).



Während der Versuche mit dem Klon E4 zeigte sich durch Fluoreszenzanalysen, dass nicht alle Zellen des Klons E4 GFP-MKK7_{3E} exprimierten. Da für die Aussagekraft der bisherigen funktionellen Untersuchungen und auch für die geplante Untersuchungen der Genexpression aber eine möglichst homogene Expression von GFP-MKK7_{3E} in allen Zellen notwendig war, wurden die Zellen des Klons E4 daher für 3 Wochen wieder mit Selektionsmedium gehalten (Zeozin 400 μ g/ml und G-418 400 μ g/ml) und dann erneut einzellkloniert. Bei der Mikroskopanalyse wurden

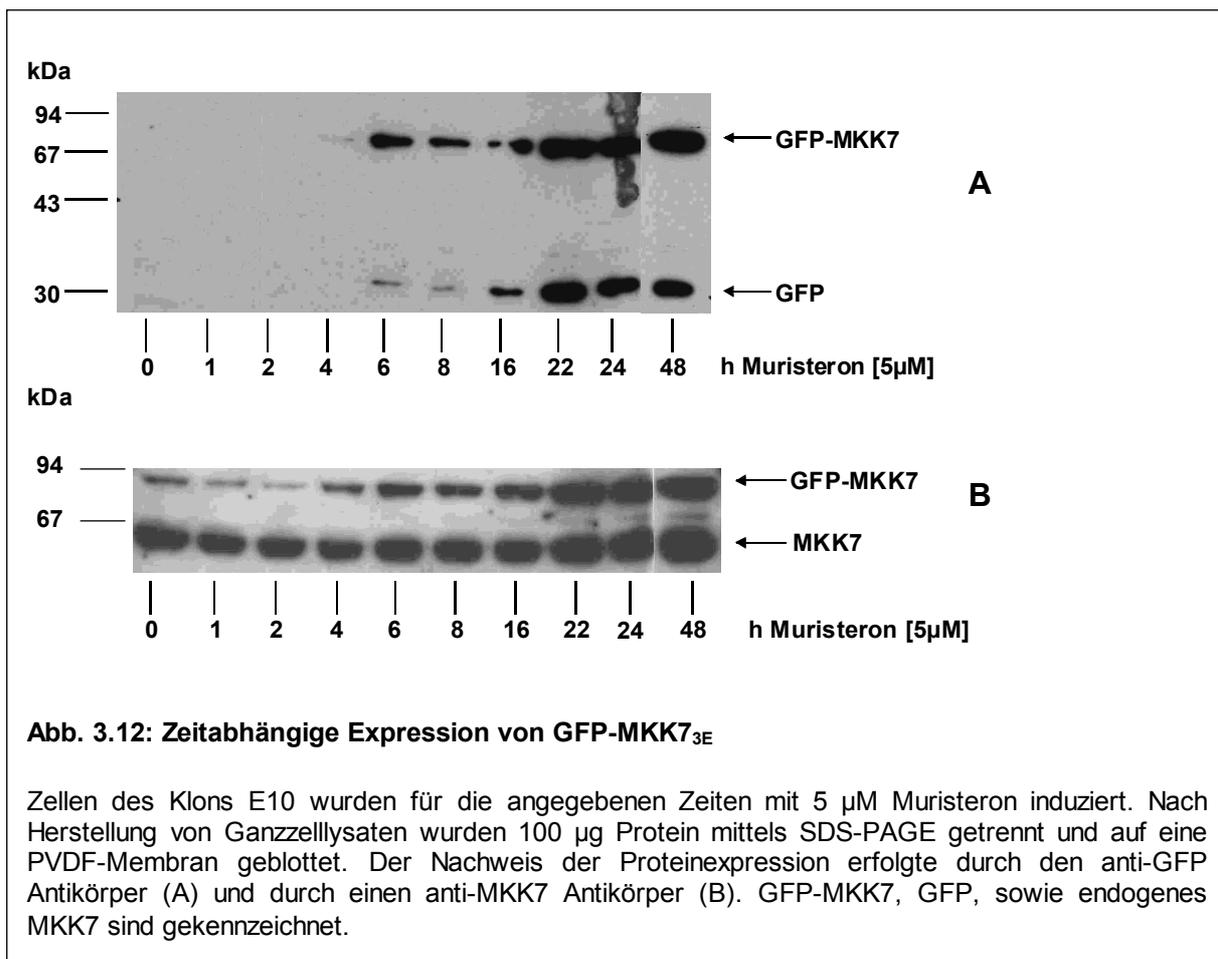
Klone ausgewählt, bei denen alle Zellen die Grünfluoreszenz zeigten. Die Ergebnisse wurden mit Western-Blots überprüft.

Es wurden 5 Klone gefunden bei denen alle Zellen grün fluoreszierten. Die weiteren Untersuchungen zu MKK7_{3E} wurden dann mit den Klonen E6 und E10 durchgeführt.

Zellen des aus E4 durch erneute Einzelzellklonierung generierten Klons E10 wurden für 0 bis 48 Stunden mit Muristeron induziert, und die Proteinexpression mit den gleichen Antikörpern untersucht.

Der Nachweis der Proteinexpression ist sowohl mit dem anti-GFP (s. Abb. 3.12, A) als auch mit dem anti-MKK7 Antikörper (s. Abb. 3.12, B) bereits nach 4 Stunden möglich. Bei dem analogen Versuch mit dem Klon E4 wurde die Expression des Fusionsproteins erst nach 6 h mit dem anti-GFP und sogar erst nach 16 h mit dem anti-MKK7 Antikörper nachgewiesen (s. Abb. 3.11). Bis ca. 22 h nach Induktion erfolgte ein Ansteigen der Proteinexpression, danach blieb die Expression auf gleichem Niveau. Zwischen 22 und 48 Stunden nach Induktion wurde auch mehr GFP detektiert. Dabei kann es sich um abgespaltenes GFP von dem Fusionsprotein handeln. Hierdurch ließe sich auch der Anstieg an endogenem MKK7 erklären, der auf der Abb. 3.12(B) ab den 22 h Stundenwerten erkennbar ist. Die Expressionsstärke des endogenen MKK7 wird wahrscheinlich um das vom GFP abgespaltene Protein erhöht.

Mit dem anti-MKK7 Antikörper detektiert man auch bei den nicht-induzierten und auch bei den 1 und 2 Stundenwerten eine Bande der für GFP-MKK7 erwarteten Größe von ca. 80 kDa. Bei dieser schwachen Bande handelt es sich entweder um eine unspezifische Bande, da sie nicht konsistent zu beobachten war, oder eine sehr geringe basale Proteinexpression von GFP-MKK7.



Für FACS Sortierungen, die zunächst eine Induktion des fluoreszierenden GFP-MKK7 Proteins benötigten, wurde untersucht, innerhalb welchen Zeitraums die Expression von GFP-MKK7 nach Entfernen von Ponasteron wieder abnimmt.

Nach Entfernen von Ponasteron konnte nach 3 Tagen im Western-Blot das Fusionsprotein GFP-MKK7 nur noch sehr schwach nachgewiesen werden (s. Abb. 3.13). 24 Stunden nach Entzug von Ponasteron ist die Expression des Fusionsproteins GFP-MKK7, die nach Induktion vergleichbar mit der von endogenem MKK7 war, bereits schwächer als die des endogenen MKK7. Weiter fällt auf, dass die Expression von endogenem MKK7 nicht konstant ist, sondern ebenfalls leicht abnimmt. Dies liegt möglicherweise an der Spaltung von GFP-MKK7, in GFP und

einem MKK7 Anteil, der zur Verstärkung der Bande von endogenem MKK7 beiträgt (s. auch Abb. 3.12(A)).

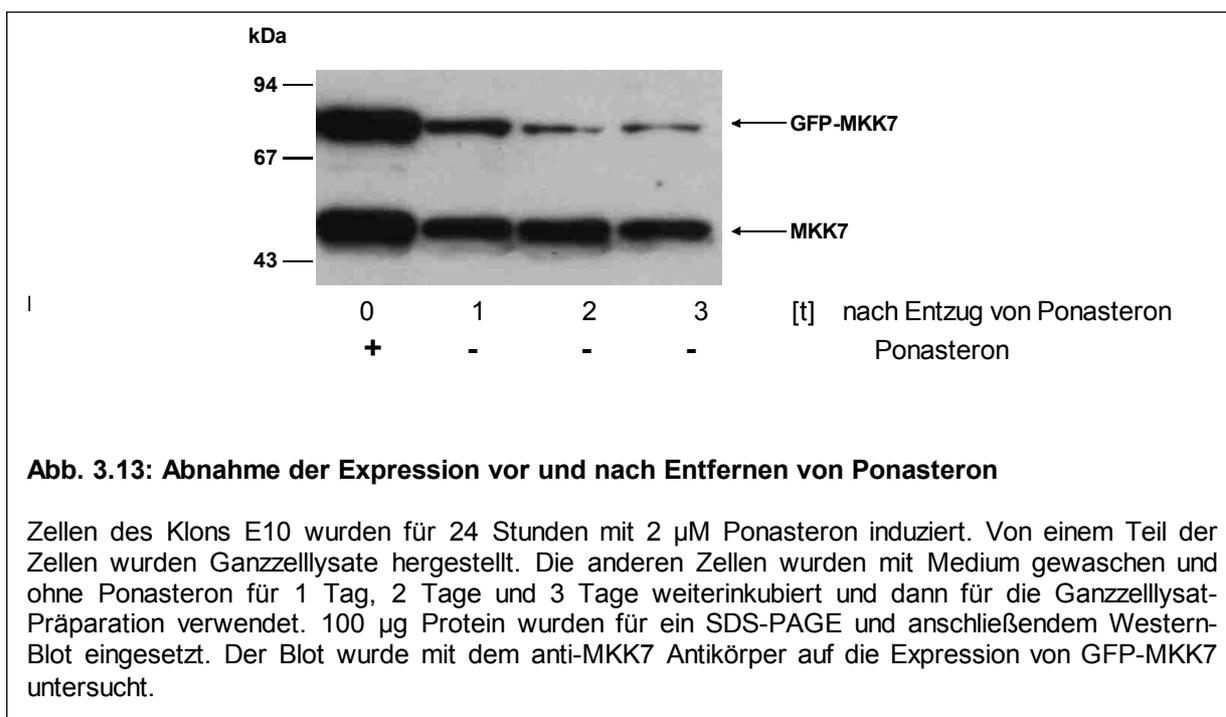


Abb. 3.13: Abnahme der Expression vor und nach Entfernen von Ponasteron

Zellen des Klons E10 wurden für 24 Stunden mit 2 μ M Ponasteron induziert. Von einem Teil der Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt. Die anderen Zellen wurden mit Medium gewaschen und ohne Ponasteron für 1 Tag, 2 Tage und 3 Tage weiterinkubiert und dann für die Ganzzelllysats-Präparation verwendet. 100 μ g Protein wurden für ein SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot eingesetzt. Der Blot wurde mit dem anti-MKK7 Antikörper auf die Expression von GFP-MKK7 untersucht.

3.2.2 Charakterisierung der basalen GFP-MKK7_{3E} Proteininduktion in dem Klon E10 auf mRNA- und Proteinebene

Mit verschiedenen Methoden wurde analysiert, ob ohne Zugabe eines Induktors (Ponasteron oder Muristeron) in nicht induzierten Zellen eine basale Expression des Fusionsproteins GFP-MKK7_{3E} nachgewiesen werden kann. Dieses war für die nachfolgend geplante Proteomuntersuchungen hinsichtlich der Interpretation der erwarteten Unterschiede besonders wichtig.

3.2.2.1 Nachweis von GFP-MKK7_{3E} auf mRNA Ebene

Es wurde aus mit Ponasteron induzierten und nicht induzierten Zellen des stabil transfizierten Klons E10 Gesamt-RNA isoliert und revers transkribiert. Ausgehend von der cDNA wurde anschließend mit spezifischen Primern das Produkt GFP-MKK7_{3E} in einer PCR amplifiziert.

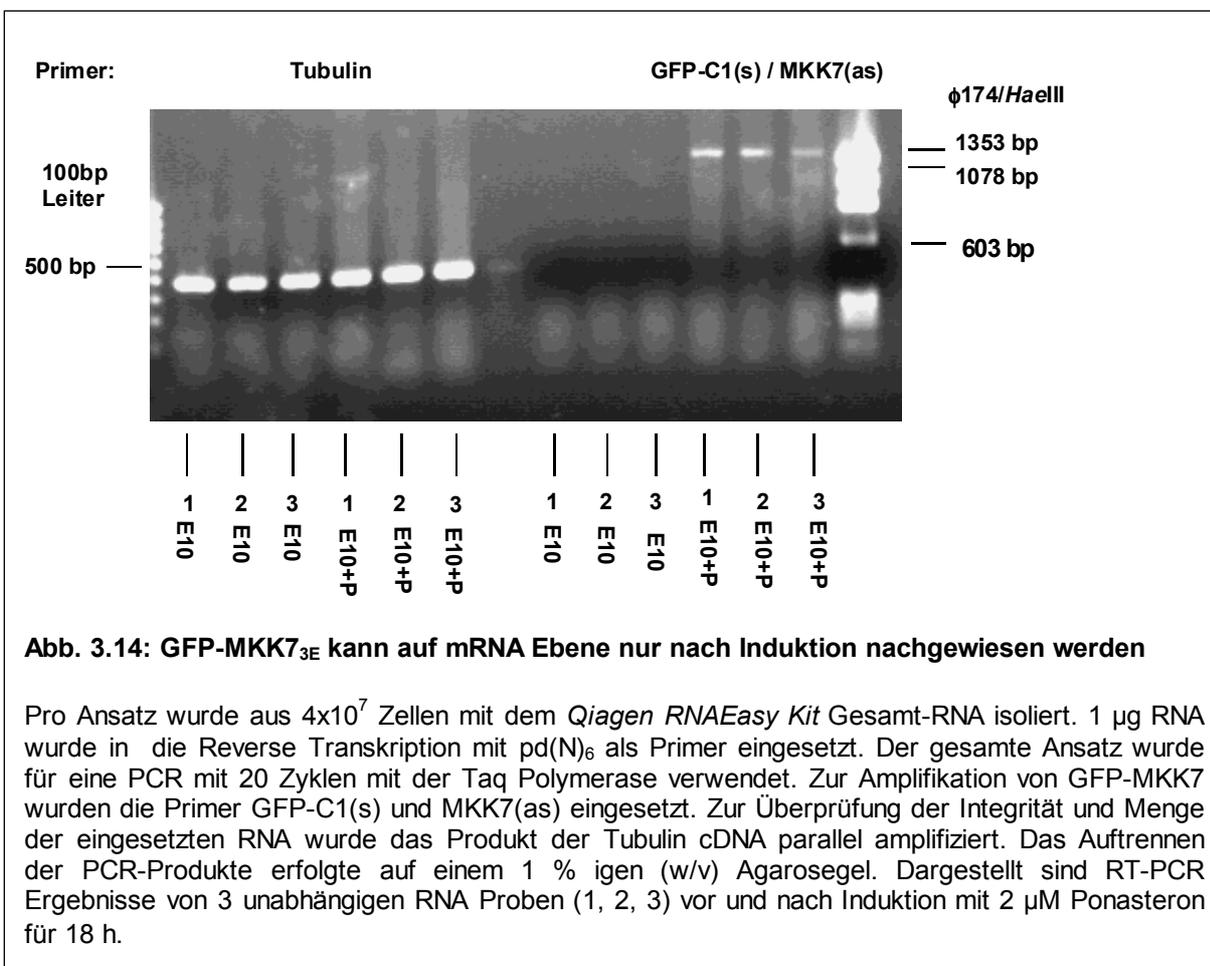


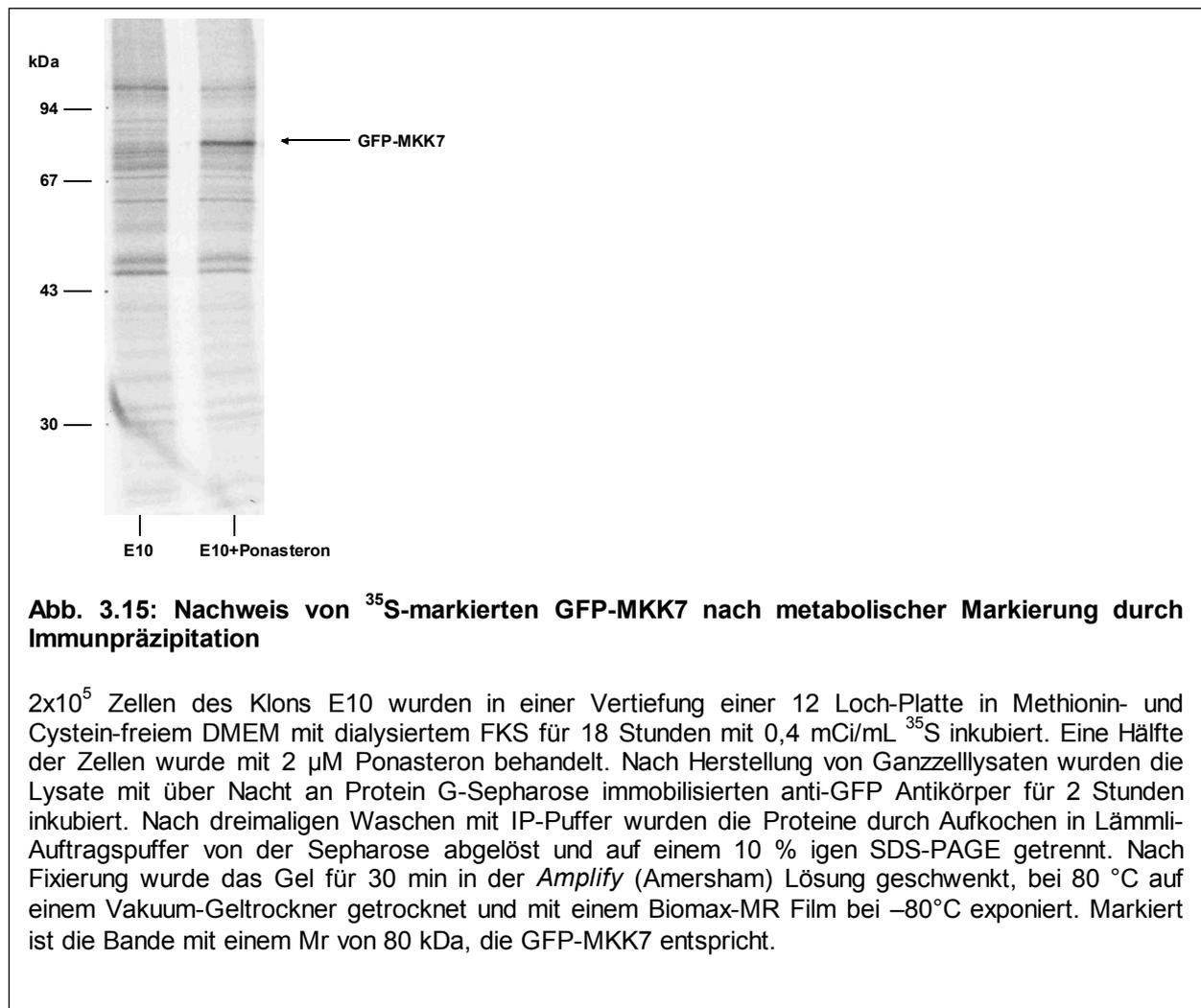
Abb. 3.14: GFP-MKK7_{3E} kann auf mRNA Ebene nur nach Induktion nachgewiesen werden

Pro Ansatz wurde aus 4×10^7 Zellen mit dem *Qiagen RNeasy Kit* Gesamt-RNA isoliert. 1 μ g RNA wurde in die Reverse Transkription mit pd(N)₆ als Primer eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde für eine PCR mit 20 Zyklen mit der Taq Polymerase verwendet. Zur Amplifikation von GFP-MKK7 wurden die Primer GFP-C1(s) und MKK7(as) eingesetzt. Zur Überprüfung der Integrität und Menge der eingesetzten RNA wurde das Produkt der Tubulin cDNA parallel amplifiziert. Das Auftrennen der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1 % igen (w/v) Agarosegel. Dargestellt sind RT-PCR Ergebnisse von 3 unabhängigen RNA Proben (1, 2, 3) vor und nach Induktion mit 2 μ M Ponasteron für 18 h.

Mit den Primern GFP-C1(s) und MKK7(as) konnte mit der RT-PCR nur aus der RNA von mit Ponasteron induzierten Zellen ein Produkt der erwarteten Größe von 1440 bp amplifiziert werden. In den nicht induzierten Zellen erfolgte bei Verwendung dieser Primer keine Amplifikation. Bei Verwendung der Primer für Tubulin wurde bei allen Ansätzen ein Fragment der erwarteten Größe von Tubulin (485 bp) in gleicher Menge amplifiziert. Tubulin wurde als endogener Standard verwendet und überprüft die Integrität und Konzentration der Ausgangs RNAs sowie die PCR Reaktionen. Als Ergebnis kann festgestellt werden, dass in der RNA aus nicht induzierten Zellen des Klons E10 keine basale Expression der RNA für GFP-MKK7 nachgewiesen werden konnte.

3.2.2.2 Nachweis auf Proteinebene

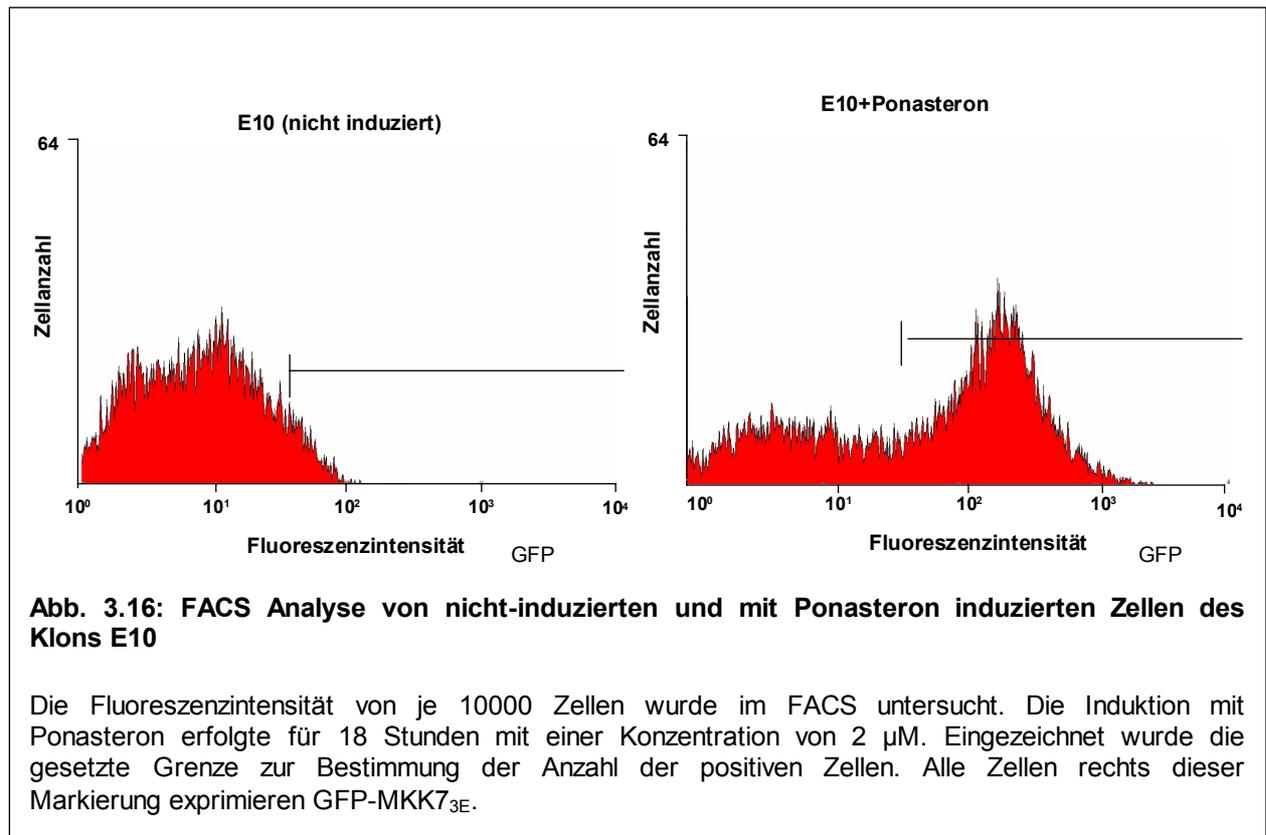
Nach *in-vivo* labeling mit ³⁵S von induzierten und nicht-induzierten Zellen des Klons E10 sollte nach Immunpräzipitation mit dem anti-GFP Antikörper die Überprüfung der basalen Expression von GFP-MKK7_{3E} auf Proteinebene erfolgen.



Nach *in-vivo* Markierung und Immunpräzipitation mit dem anti-GFP Antikörper konnten relativ viele schwache Proteinbanden auf der Autoradiographie in beiden Proben detektiert werden. Eine Bande der erwarteten Größe von GFP-MKK7 von ca.80 kDa ist dagegen nur auf dem Gel der induzierten Probe nachweisbar. Mit dieser Methode konnte wie schon in der RT-PCR in den nicht mit Ponasteron induzierten Zellen des Klons E10 keine Expression von GFP-MKK7 nachgewiesen werden. Analog zu der RT-PCR bestätigt sich mit diesem Ergebnis, dass keine basale Proteinexpression stattfindet.

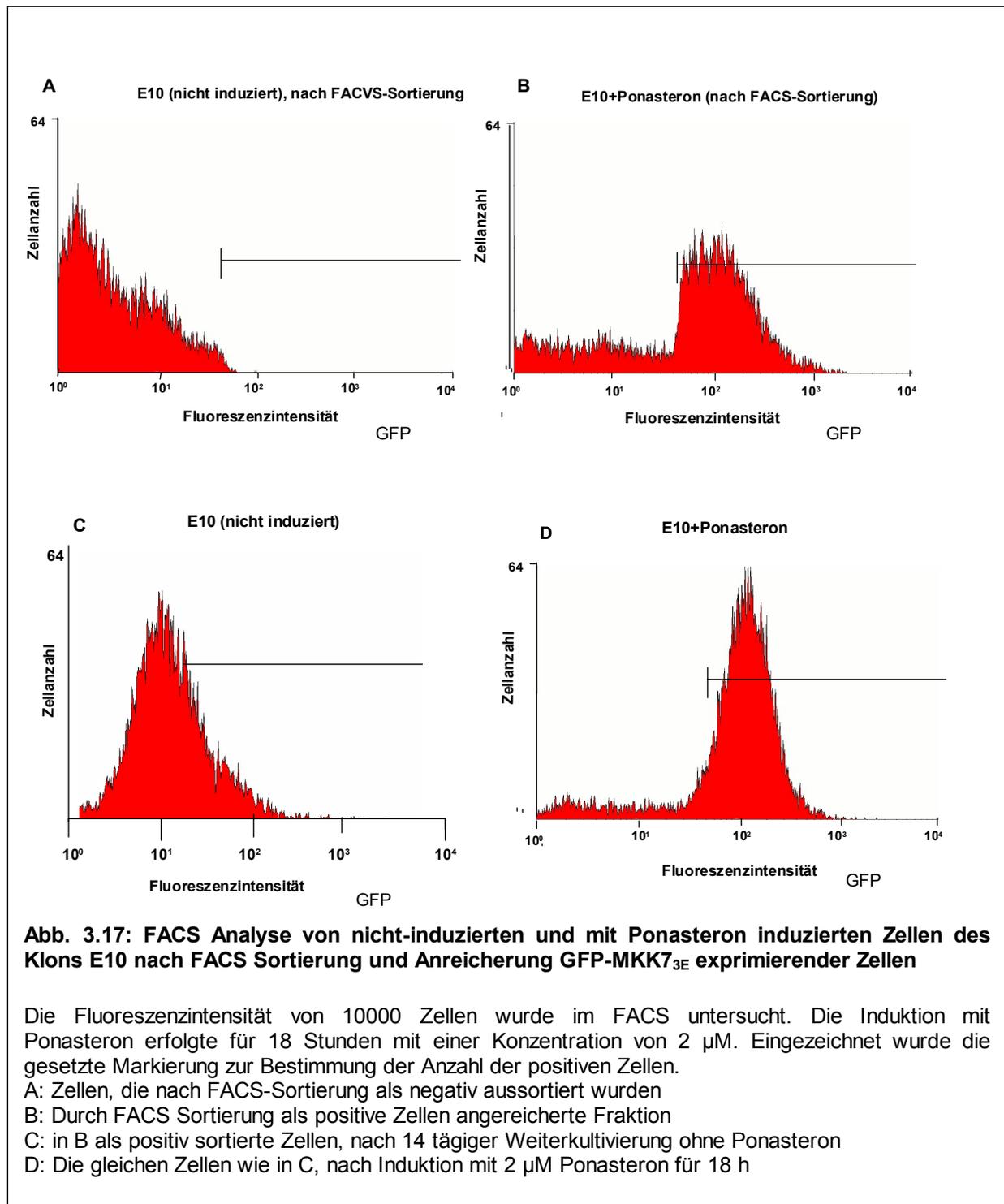
3.2.2.3 Überprüfung der Expression von GFP-MKK7_{3E} auf Einzelzellniveau im Klon E10

Zellen des Klons E10 wurden für 18 Stunden mit 2 μ M Ponasteron induziert, bzw. nicht induziert. Um Einzelzellen zu erhalten, wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und mit Hilfe einer FACS Analyse auf Grünfluoreszenz überprüft.



In der Abb. 3.16 erkennt man eine sehr deutliche durch GFP verursachte Rechtsverschiebung, d.h. Zunahme der Fluoreszenzintensität bei den mit Ponasteron induzierten Zellen. Es wurde eine Markierung gesetzt, die festlegt, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zellen als positiv gewertet werden. Bei den mit Ponasteron induzierten Zellen lieferte diese Analyse 63 % positive Zellen. Bei den nicht induzierten Zellen wurden noch 3,3 % der Zellen als positiv gewertet.

Da offensichtlich in diesem Klon zwar 2/3 der Zellen GFP positiv waren, aber nicht die gesamte Population, wurden die Zellen nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} mit Hilfe eines FACS Sortierers angereichert. Die Effizienz wurde anschließend im FACS überprüft und die als positiv sortierten Zellen ohne Ponasteron weiterkultiviert und nach 14 Tagen erneut analysiert.



Die Sortierung mit FACS war schwierig, da die Zellen auf Einzelzellebene sortiert werden müssen, aber dazu neigten, Aggregate zu bilden. So wurden von den zunächst als negativ sortierten Zellen bei der anschließenden FACS Analyse noch 17 % der Zellen als positiv eingestuft (A). Von den als positiv sortierten Zellen, wurden 87 % als positiv und noch 13 % der Zellen als negativ gewertet (B).

Die positiv sortierten Zellen wurden wieder ohne Ponasteron in Kultur genommen, wodurch keine GFP-MKK7_{3E} Expression mehr nachgewiesen wurde (C). Nach 2 Wochen erfolgte eine erneute Induktion der Zellen. 90 % der Zellen wurden jetzt als positiv gewertet (D). Die gesetzte Markierung war bei allen Analysen gleich.

Die positiven Zellen wurden expandiert und in mehreren Aliquots weggefroren. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen durch FACS Analyse untersucht. Bei Nachlassen der Fluoreszenzintensität, welche nur sehr langsam über viele Wochen und auch nicht in sehr großem Ausmaß erfolgte, wurde ein Aliquot der positiv sortierten Zellen aufgetaut und für die weiteren Versuche verwendet. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass für die Proteomuntersuchung eine weitgehend homogene Zellpopulation eingesetzt wurde.

3.3 Auswirkung der regulierbaren Expression von GFP-MKK7 auf die Signaltransduktion

3.3.1 Funktionelle Analyse ausgewählter Klone am Bsp. von Klon E4

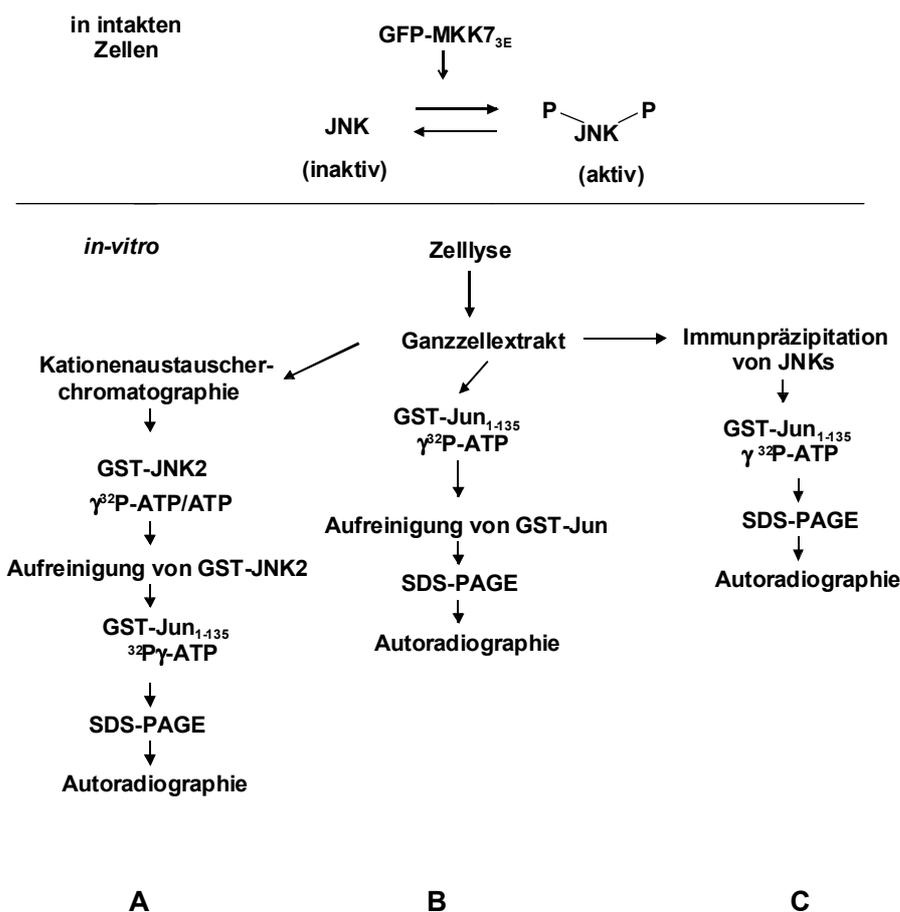
Da das Ziel der Arbeit die artefizielle Aktivierung des JNK Signalweges in intakten Zellen war, wurde die Funktion dieser Proteinkinasekaskade nach erfolgreicher Etablierung von induzierbaren GFP-MKK7 Zelllinien mit Hilfe von unterschiedlichen Meßsystemen für Proteinkinasen untersucht.

Protein aus Lysaten des stabil mit GFP-MKK7_{3E} transfizierten Einzelzellklons E4 wurden dabei in verschiedenen *in-vitro* Kinase Versuchen verwendet. Als Substrat wurde rekombinantes GST-Jun₁₋₁₃₅ in Anwesenheit von radioaktiv markiertem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP eingesetzt, dass spezifisch nur von JNKs phosphoryliert wird. Die Aktivität von zellulären JNKs dient dabei als Maß für die Aktivität von MKK7, da diese Kinase JNKs phosphoryliert und aktiviert.

In einem Versuch erfolgte zuerst die Auftrennung der Proteine von nicht-induzierten und induzierten Zellen mit einer Kationenaustauschersäule. Aliquote der Elutionsfraktionen wurden dann in einem gekoppelten *in-vitro* Kinase Versuch eingesetzt. Als erstes wurde ein Substrat von MKK7, rekombinantes GST-JNK2 zusammen mit $\gamma^{32}\text{P-ATP}$, angeboten, dieses dann über den GST Anteil aus dem Reaktionsgemisch entfernt und eine weitere Reaktion mit GST-Jun₁₋₁₃₅ und $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ ausgeführt. Mit diesem Ansatz erfolgte eine direkte Bestimmung der MKK7 Aktivität *in-vitro* (Abb. 3.17) (schematischer Ablauf: s. S. 93).

In einem weiteren Versuch wurden Ganzzelllysate von nicht-induzierten und induzierten Zellen des Klons E4 verwendet (Abb. 3.18).

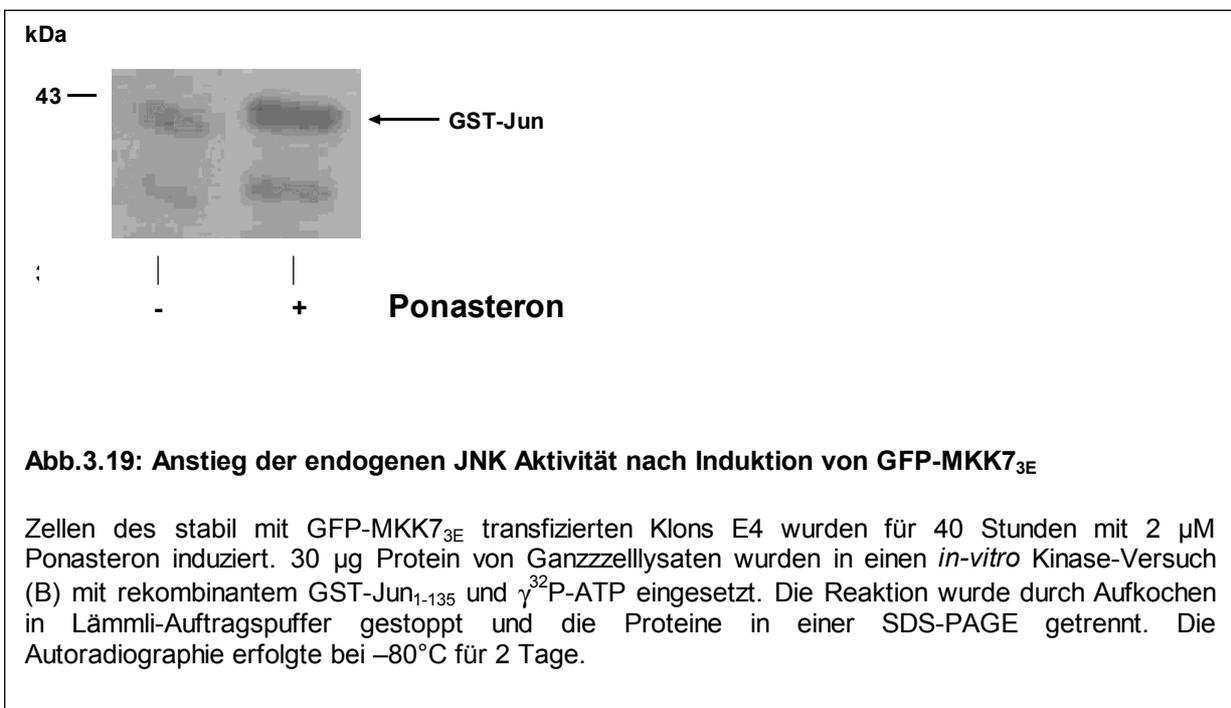
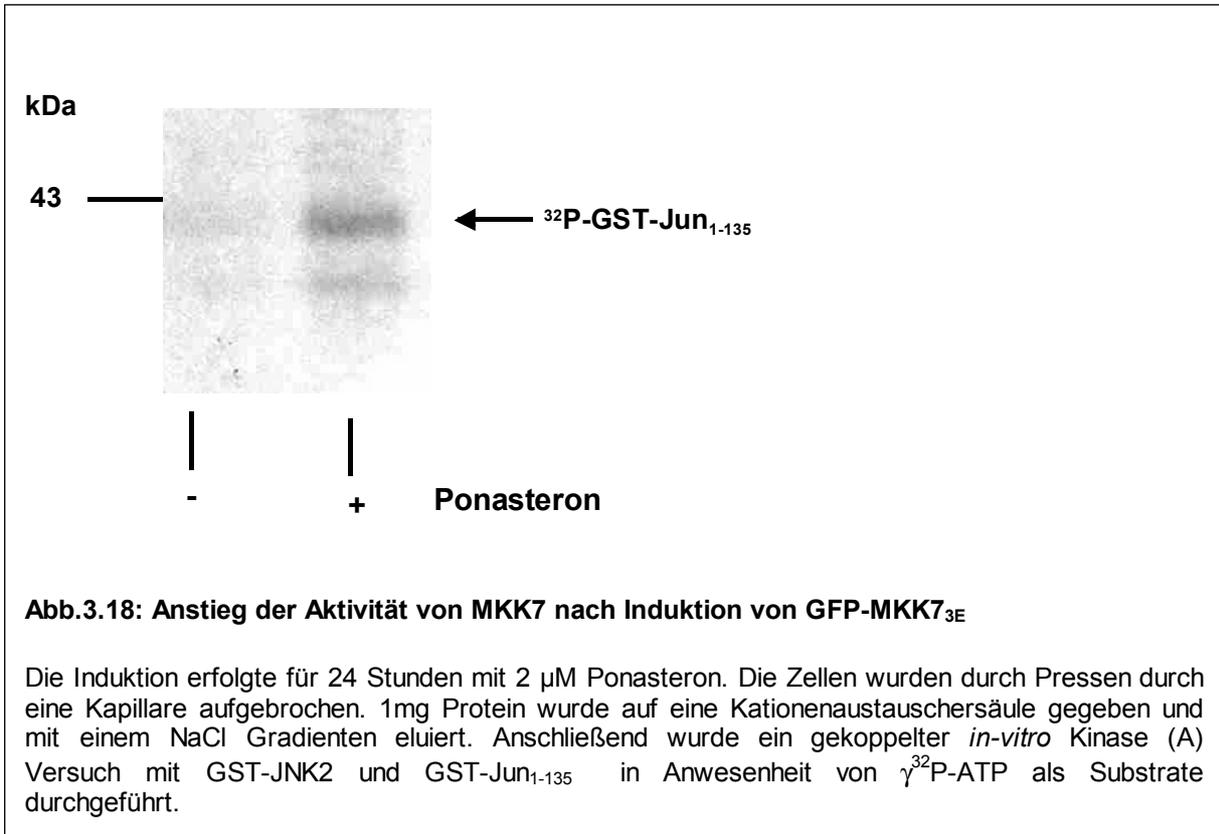
Schematische Darstellung der verschiedenen *in-vitro* Kinase Versuche:



A: direkte Bestimmung der MKK7-Aktivität

B: Bestimmung der endogenen JNK-Aktivität

C: Bestimmung der Aktivität von präzipitierten JNKs

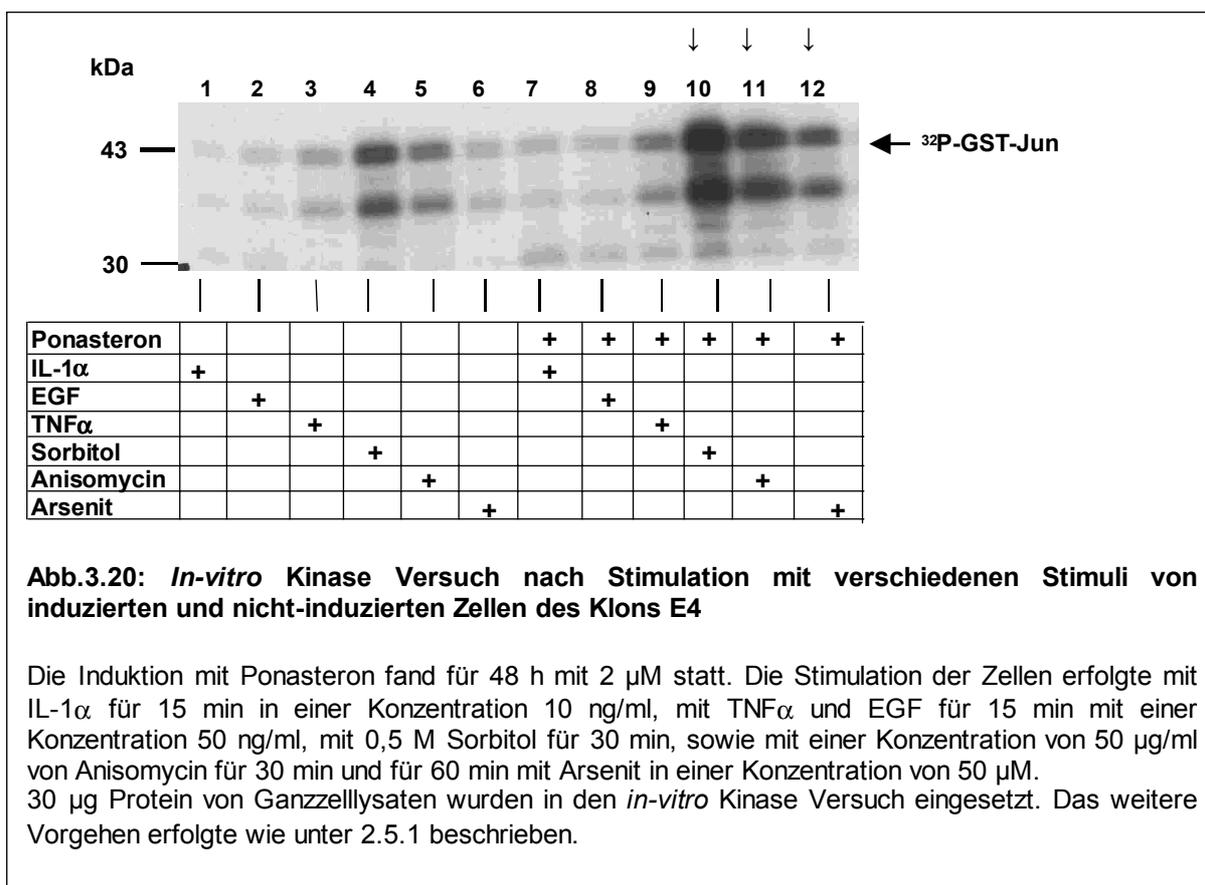


In beiden Versuchen wurde eine leicht stärkere Phosphorylierung von GST-Jun₁₋₁₃₅ nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} als Maß für die Aktivierung endogener JNKs und von GFP-MKK7_{3E} beobachtet.

3.3.1.1 Einfluß verschiedener Stimuli auf den JNK Signalweg am Bsp. von Klon E4

Der positive Einfluß von GFP-MKK7_{3E} bestätigte sich auch in Experimenten, in denen die Zellen des Klons E4 mit verschiedenen JNK aktivierenden Stimuli behandelt wurden.

Die Veränderungen des JNK Signalweges nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} und der Einfluß verschiedener Stimuli wurden dazu in dem oben beschriebenen *in-vitro* Kinase Versuch (A) untersucht. Dazu wurden Zellen des Klons E4 für 48 Stunden mit 2 µM Ponasteron induziert und dann mit Zytokinen (IL-1 α , TNF α), Wachstumsfaktor (EGF), osmotischem Streß (Sorbitol), sowie Zellgiften (Anisomycin, Arsenit) stimuliert. Als Vergleich dienten nicht-induzierte Zellen des Klons E4.

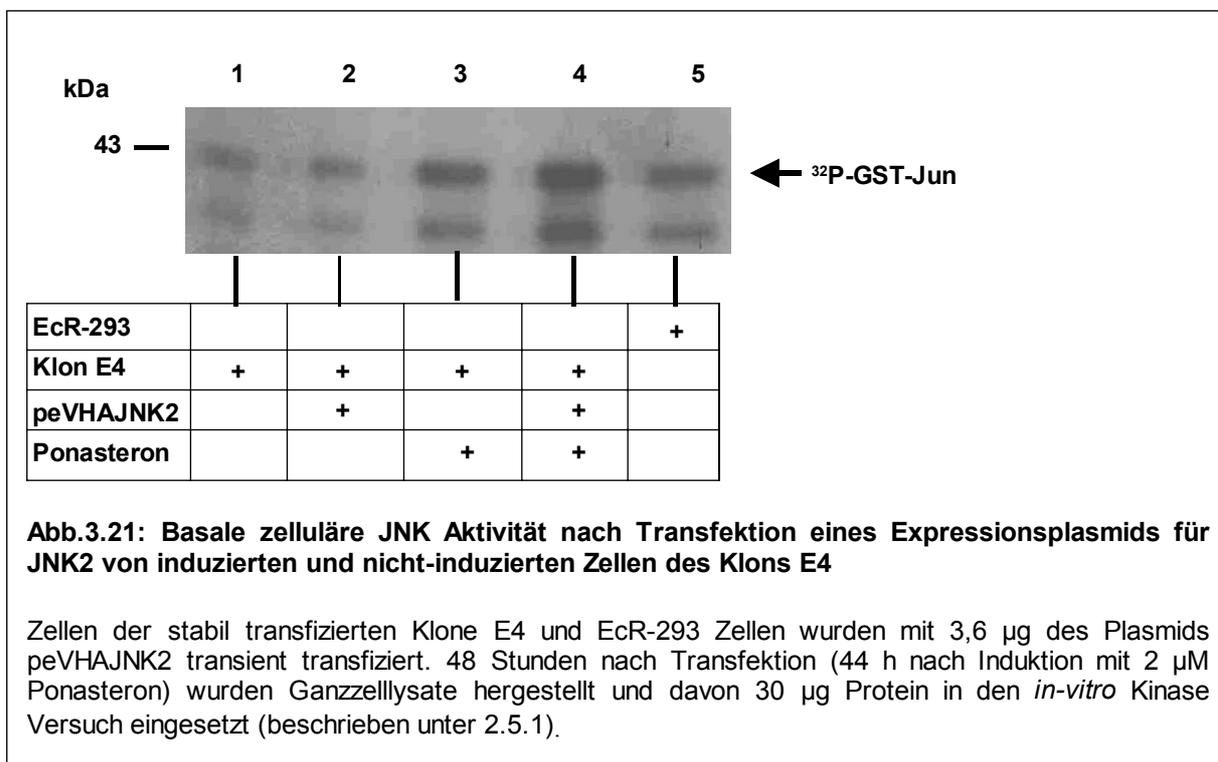


In den mit einem Pfeil gekennzeichneten Spuren erkennt man eine Erhöhung der stimulus-induzierten JNK Aktivität nach Induktion von GFP-MKK7_{3E}.

Als stärkste JNK-Aktivatoren wirkten Sorbitol und Anisomycin, durch IL-1 α und EGF erfolgte nur eine geringe Aktivierung des Signalweges. Durch Induktion von MKK7_{3E} wurde die Aktivierung des JNK Signalweges, messbar als *in-vitro* Phosphorylierung von GST-Jun, verstärkt. Der Einfluß der Expression der konstitutiv aktiven Mutante von MKK7 auf den JNK Signalweg in Anwesenheit starker Stimuli ist zwar eher gering, aber kompatibel mit einer Erhöhung der totalen MKK7 Aktivität in den Zellen durch Expression von aktiver MKK7_{3E}.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluß von koexprimiertem MKK7 Substrat JNK2 auf die basale zelluläre JNK Aktivität vor und nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} untersucht. Dazu wurden Zellen des Klons E4 mit einem JNK2 Expressionsplasmid transfiziert. 4 Stunden nach Transfektion erfolgte die Induktion der GFP-MKK7 Mutante durch Zugabe von 2 μ M Ponasteron. 48 Stunden nach Transfektion wurden 30 μ g Protein der Ganzzelllysate in einen *in-vitro* Kinase Versuch eingesetzt.

Wie schon in dem anderen Versuch (Abb. 3.19) wurde durch Induktion von GFP-MKK7_{3E} eine leicht stärkere Aktivierung des JNK Signalweges festgestellt (s. Spur 3). Die Koexpression eines Substrats von MKK7 führte zu einer weiteren Aktivierung des Signalweges und zu einer stärkeren Phosphorylierung von GST-Jun (s. Spur 4). Dennoch erhöht die Expression von JNK2 nicht die JNK Aktivität auf ein Maß, wie sie für starke extrazelluläre JNK Aktivatoren (z.B. Sorbitol, s. Abb. 3.20) beobachtet wird.



3.3.2 Aktivierung von JNK Isoformen durch MKK7_{3E} am Bsp. von Klon E10

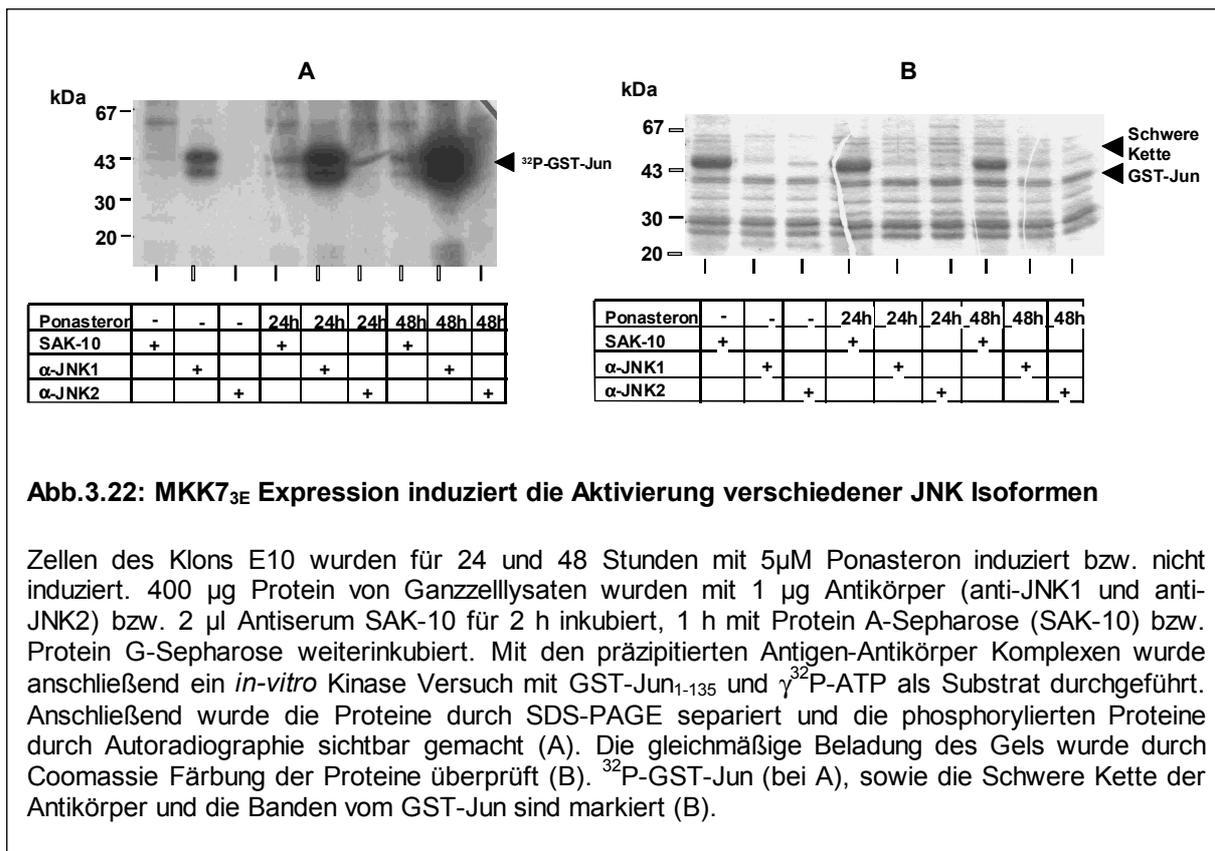
Um zu untersuchen, ob die induzierbare Expression von GFP-MKK7_{3E} unterschiedliche endogene JNK Isoformen aktiviert, wurden JNK Proteine durch verschiedene anti-JNK Antikörper aus Zellextrakten immunpräzipitiert.

Daher kamen isoformspezifische Antikörper (SAK-9, SAK-10) zum Einsatz. Bei dem verwendeten SAK-10 Antikörper handelt es sich um ein Antiserum aus Kaninchen, das gegen JNK3 α 1 gerichtet ist. Die beiden anderen verwendeten Antikörper sind gegen JNK1 und JNK2 (Santa Cruz) gerichtet. Nach der Immunpräzipitation erfolgte die Bestimmung der JNK Aktivität *in-vitro* mit rekombinatem GST-Jun₁₋₁₃₅ und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (s. Seite 87, B). Diese Versuche wurden mit dem Klon E10, einem durch Subklonierung von E4 generierten Zellklon, durchgeführt.

Durch den anti-JNK2 Antikörper werden JNKs präzipitiert, die entweder durch MKK7 nicht aktiviert werden oder in den eingesetzten Zellen nicht vorkommen, da keine Aktivität im Kinase Versuch detektiert werden konnte. Mit dem Antiserum SAK-10 konnte eine schwach aktivierte JNK-Isoform präzipitiert werden, die GST-Jun *in-vitro* phosphoryliert. Die Phosphorylierung war in Lysaten aus Zellen, die für 48 Stunden induziert waren, noch etwas deutlicher.

Die Präzipitationen der JNK1-Isoform führt zu einer starken Phosphorylierung von rekombinatem GST-Jun, wobei die Phosphorylierung nach 48 h stärker als nach 24 h Induktion ist. Die Phosphorylierung aus Lysaten von nicht induzierten Zellen des Klons E10 zeigte einen hohen Basalwert, dieser war stärker als die Phosphorylierung, die nach Präzipitation mit dem SAK-10 Antikörper festgestellt wurde.

Anhand der mit CBB gefärbten Banden läßt sich zeigen, dass in allen Proben eine gleichmäßige Verteilung von GST-Jun vorlag. Auch die schwere Kette der Antikörper bei 55 kDa ist in allen Spuren ähnlich. Die auf der Autoradiographie detektierten Unterschiede in der Phosphorylierung von GST-Jun beruhen daher nicht auf Unterschieden in der Präzipitationseffizienz oder Substratbeladung der einzelnen Spuren.



Weiterhin wurden Ganzzelllysate aus mit 2 μ M Ponasteron für 24 und 48 Stunden induzierten bzw. nicht-induzierten, sowie mit Sorbitol stimulierten Zellen des Klons E10 für eine Immunpräzipitation mit dem Antiserum SAK-9, das spezifisch für lange JNK2 Isoformen (JNK2 α 2) ist, verwendet.

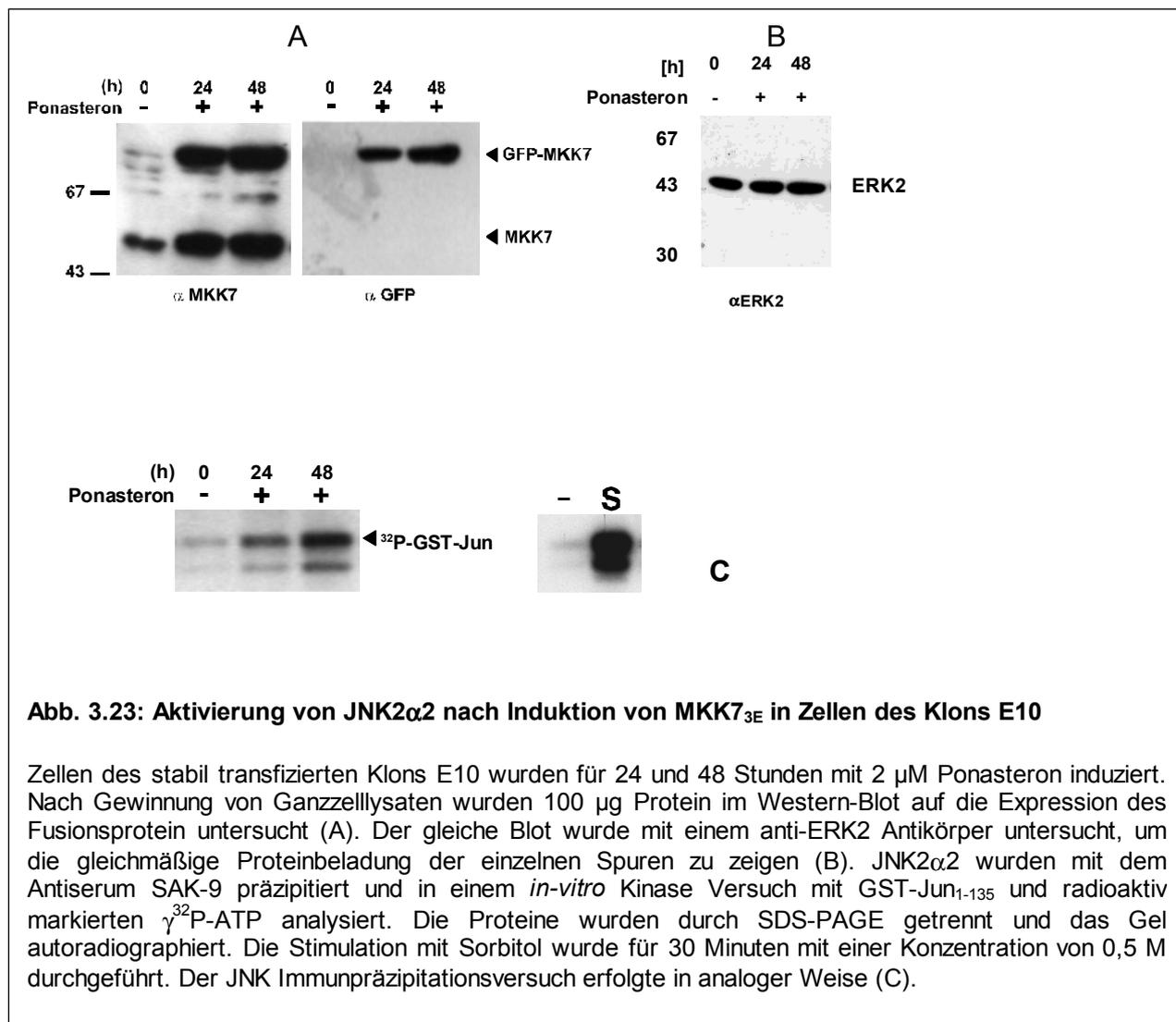
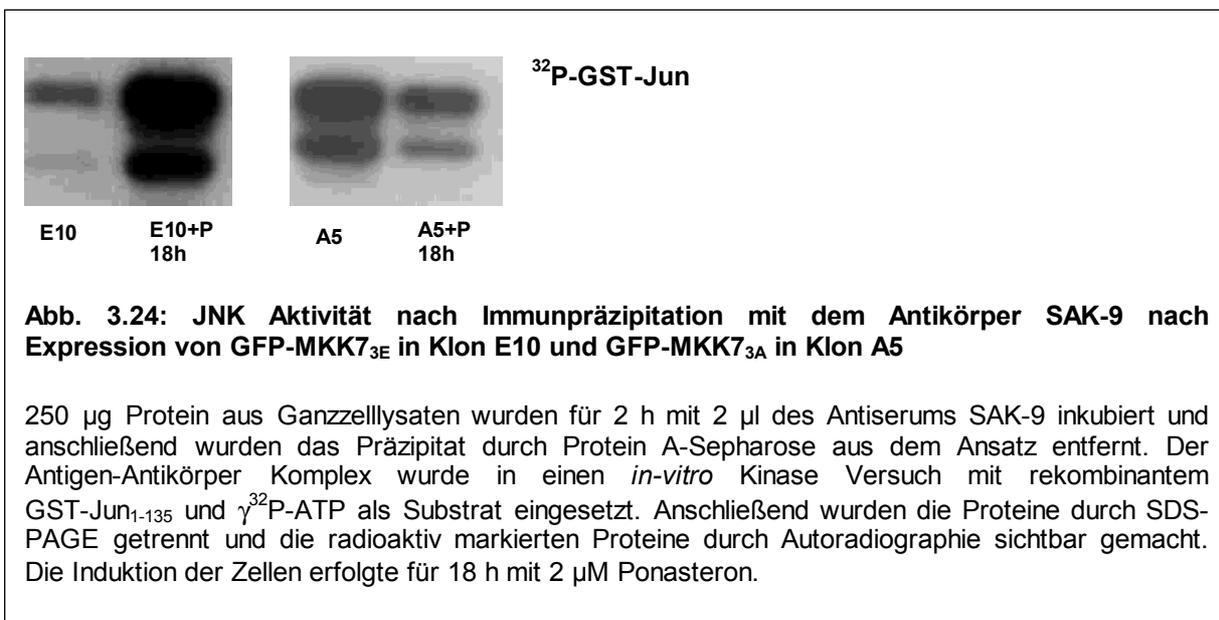


Abb. 3.23: Aktivierung von JNK2 α 2 nach Induktion von MKK7_{3E} in Zellen des Klons E10

Zellen des stabil transfizierten Klons E10 wurden für 24 und 48 Stunden mit 2 μ M Ponasteron induziert. Nach Gewinnung von Ganzzelllysaten wurden 100 μ g Protein im Western-Blot auf die Expression des Fusionsprotein untersucht (A). Der gleiche Blot wurde mit einem anti-ERK2 Antikörper untersucht, um die gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Spuren zu zeigen (B). JNK2 α 2 wurden mit dem Antiserum SAK-9 präzipitiert und in einem *in-vitro* Kinase Versuch mit GST-Jun₁₋₁₃₅ und radioaktiv markierten γ ³²P-ATP analysiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und das Gel autoradiographiert. Die Stimulation mit Sorbitol wurde für 30 Minuten mit einer Konzentration von 0,5 M durchgeführt. Der JNK Immunpräzipitationsversuch erfolgte in analoger Weise (C).

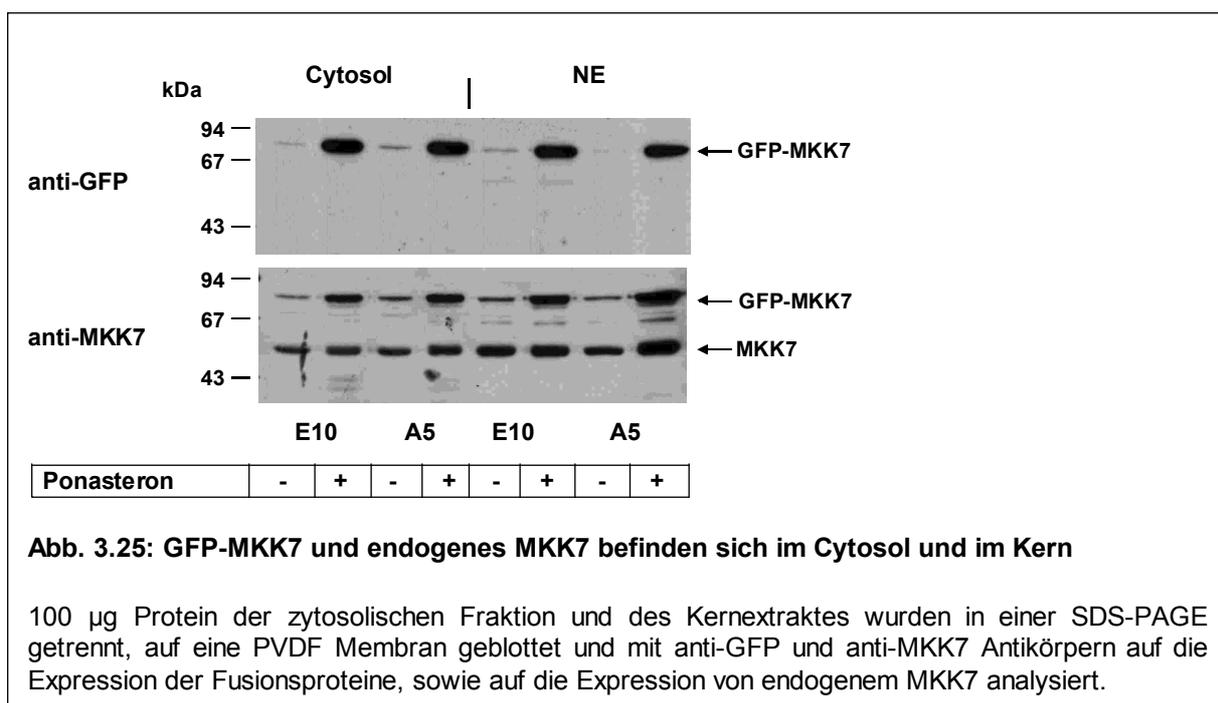
Ganzzelllysate aus mit 2 μ M Ponasteron für 18 Stunden induzierten bzw. nicht induzierten Zellen der stabil mit GFP-MKK7_{3E} bzw. GFP-MKK7_{3A} transfizierten Klone E10 und A5 wurden analog zu dem obigen Versuch für eine Immunpräzipitation mit dem Antiserum SAK-9 eingesetzt, um den Einfluß einer konstitutiv aktiven und inaktiven Mutante von MKK7 auf den JNK Signalweg zu vergleichen.

Wie auch mit den anderen JNK Antikörpern konnten mit dem Antiserum SAK-9 JNK Isoformen aus den Lysaten der verwendeten Zellen präzipitiert werden, die nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} aktiviert wurden. Die Induktion der inaktiven Mutante GFP-MKK7_{3A} führte dagegen zu einer Verringerung der basalen JNK Aktivierung. Die basale JNK Aktivität der untransfizierten Zellen des Klons E10 ist schwächer als die der untransfizierten Zellen des Klons A5 (s. Abb. 3.24).

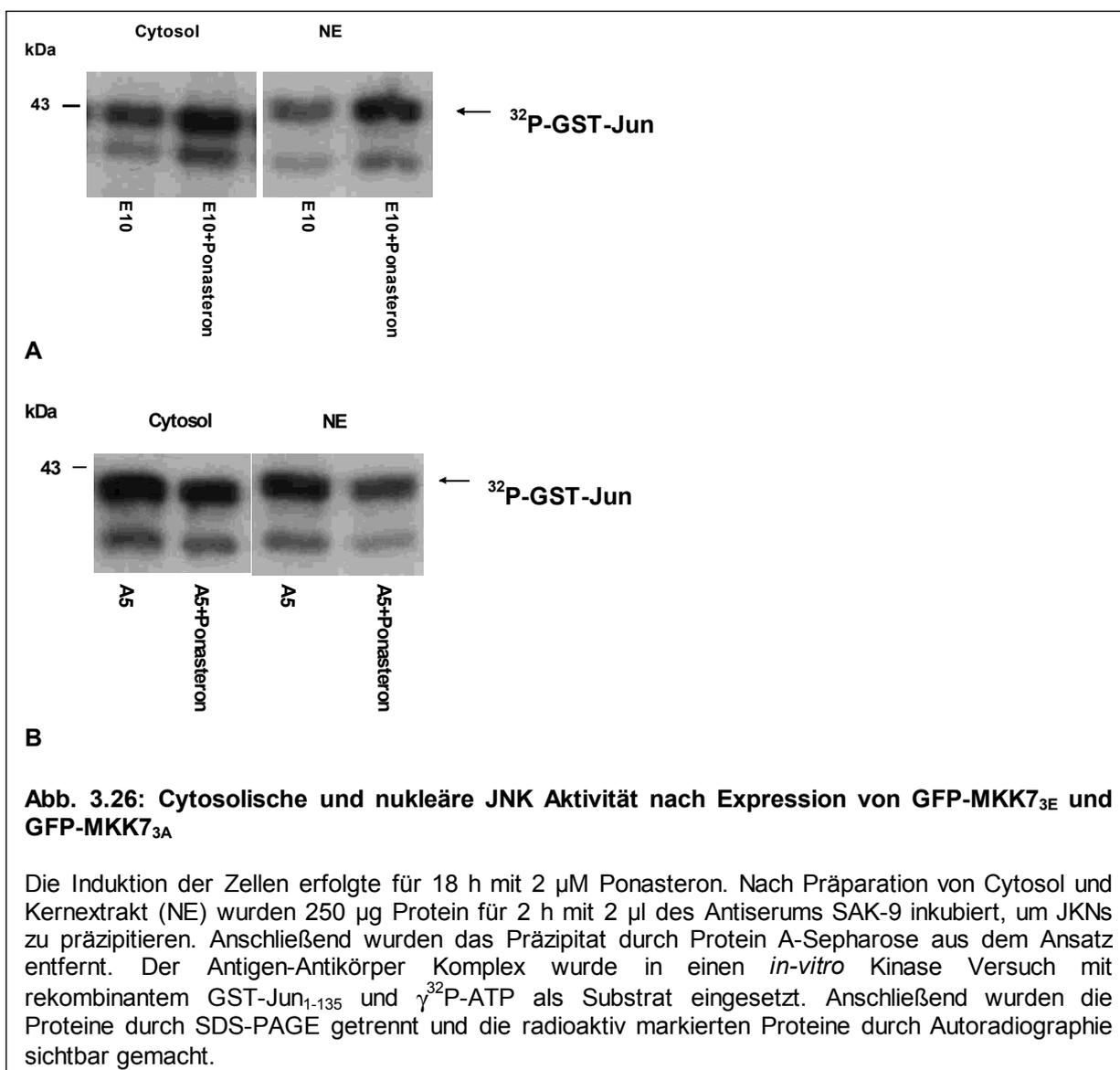


3.3.3 Aktivierung von JNKs durch MKK7_{3E} und verminderte Aktivierung durch MKK7_{3A} in unterschiedlichen Zellkompartimenten

Zur Untersuchung der Aktivierung des JNK Signalweges in Zellkompartimenten durch konstitutiv aktive und inaktive Mutanten von MKK7 wurden aus Zellen stabil transfizierter Klone nach Induktion bzw. ohne Induktion Lysate hergestellt. Dabei wurde ein cytosolischer und ein Kernextrakt (NE) präpariert. Die Phosphorylierung von rekombinantem GST-Jun₁₋₁₃₅ wurde nach Immunpräzipitation von JNK mit dem Antiserum SAK-9 in einem *in-vitro* Kinase Versuch im Cytosol bzw. im Kern untersucht.



Die Expression der induzierten MKK7 Fusionsproteine wurden auf Proteinebene mit einem Western-Blot durch Verwenden der anti-GFP und anti-MKK7 Antikörper nachgewiesen (s. Abb. 3.25). Das Fusionsprotein GFP-MKK7 als auch endogenes MKK7 konnte in der cytosolischen Fraktion wie auch in den Kernextrakten nachgewiesen werden. Wobei die Expression der Fusionsproteine in beiden untersuchten Kompartimenten vergleichbar war. Das Vorkommen von endogenem MKK7 scheint in der Kernfraktion etwas verstärkt zu sein. In Lysaten aus nicht-induzierten Zellen wurde sowohl bei E10 als auch bei A5 eine schwache Bande auf der Höhe des Fusionsproteins GFP-MKK7 detektiert. Dabei könnte es sich um eine unspezifische Bande handeln, da eine basale Expression in nicht induzierten Zellen im Gegensatz zu den Ergebnissen aus RT-PCR, FACS und IP nach metabolischer Markierung stehen würde (s. 3.2.3).



Nach Immunpräzipitation von JNKs durch SAK-9 aus Lysaten von induzierten Zellen des Klons E10 erfolgte eine Phosphorylierung des rekombinanten Substrats. Diese war stärker als die Phosphorylierung von Lysaten aus nicht-induzierten Zellen. Das war sowohl in der cytosolischen Fraktion als auch in dem Kernextrakt der Fall. Nach Induktion der inaktiven Mutante MKK7_{3A} wurde die Phosphorylierung von GST-Jun₁₋₁₃₅ schwächer im Vergleich zu dem Basalwert der nicht induzierten Zellen. Beim Vergleich der Basalwerte der beiden Mutanten fällt auf, dass die Phosphorylierung bei A5 sowohl in der cytosolischen Fraktion als auch im Kernextrakt stärker als bei E10 ist. Dieses bestätigt das mit Ganzzellextrakten gewonnene Ergebnis (s. Abb. 3.23). Es gibt keine kompartmentsspezifische Verteilung von GFP-MKK7 Fusionsproteinen oder davon erzeugter JNK Aktivierung.

3.3.4 Direkte Messung der MKK7 Aktivität *in-vitro* nach Induktion von GFP-MKK7

MKK7 bindet als basisches Protein an Kationenaustauschermatrix und kann so von JNKs und anderen MAPK Kinasen (MKK4) abgetrennt werden (Finch *et al.*, 1997; Moriguchi *et al.*, 1997). Dieser Fakt kann ausgenutzt werden, um MKK7 aus Zellextrakten anzureichern.

Schematische Darstellung der Durchführung: s. S. 87, A

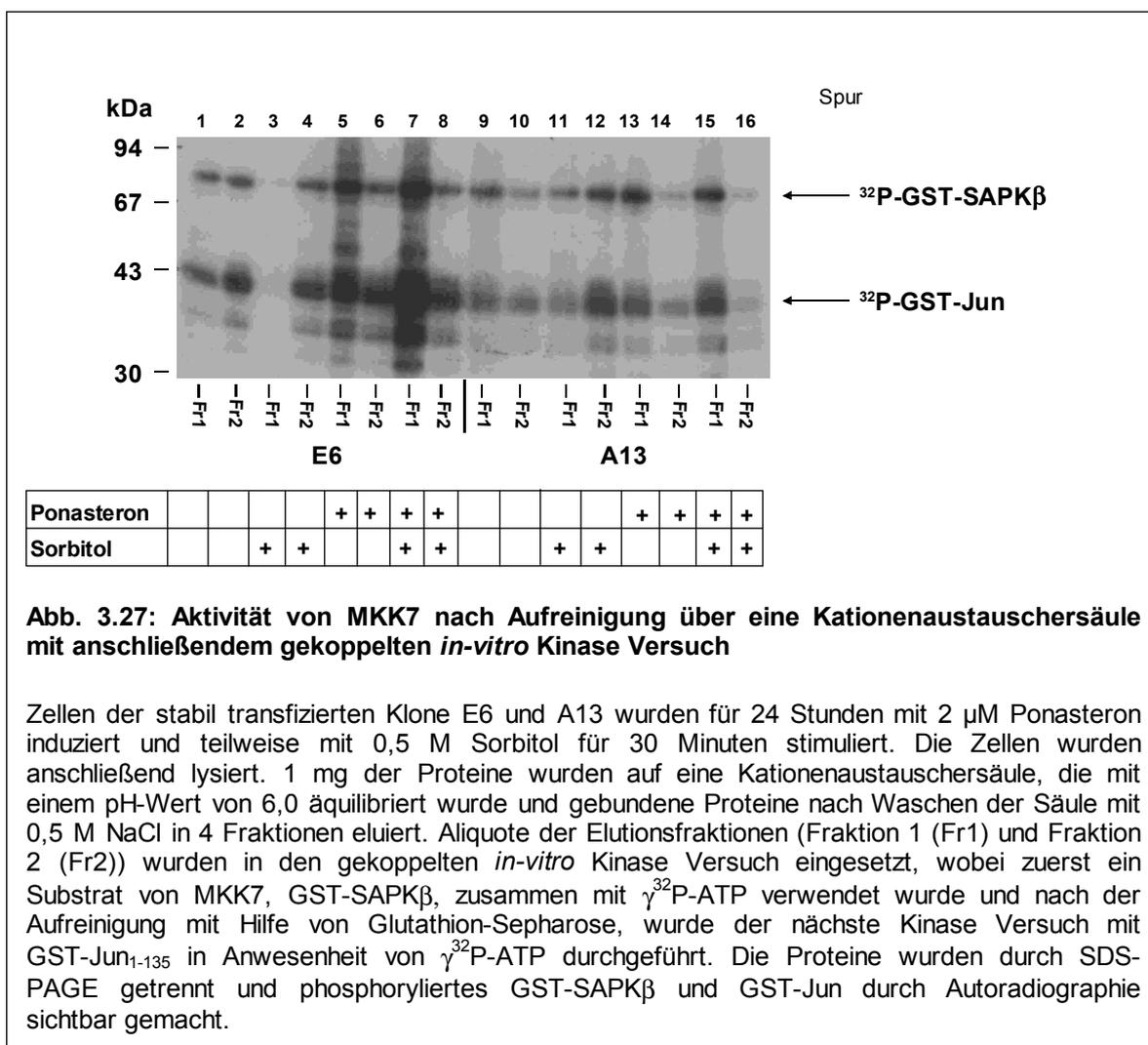
Zellen der stabil transfizierten Klone E6 und A13 wurden für 24 Stunden mit 2 μ M Ponasteron induziert bzw. mit Sorbitol stimuliert. Mit Hilfe einer Kationenaustauschersäule wurden Proteine aus Lysaten dieser Zellen fraktioniert.

Aliquote der Elutionsfraktionen wurden in einem gekoppelten *in-vitro* Kinase Versuch untersucht, indem zuerst als Substrat von MKK7 rekombinantes GST-SAPK β und γ^{32} P-ATP angeboten wurde. Über den GST Anteil wurde GST-SAPK β aus dem Ansatz entfernt und seine Aktivierung in einem weiterem Kinase Versuch mit rekombinatem GST-Jun₁₋₁₃₅ und γ^{32} P-ATP als Substrat gemessen. Mit dieser Meßmethode kann *in-vitro* die MKK7-JNK-Jun Kinasekaskade imitiert werden.

Auf der Autoradiographie erkennt man zelluläres, partiell aufgereinigtes durch MKK7 phosphoryliertes GST-SAPK β , welches nach Phosphorylierung und Aktivierung GST-

Jun₁₋₁₃₅ verstärkt phosphoryliert. Durch Induktion der aktiven Mutante MKK7_{3E} kommt es zu einer stärkeren Phosphorylierung und Aktivierung von GST-SAPK β (Vergleich Spur 1,2 mit Spur 5,6), die durch Stimulation mit Sorbitol noch weiter erhöht wird (Vergleich Spur 3,4 mit 7,8).

Nach Induktion der inaktiven Mutante MKK7_{3A} zeigte sich eine leicht stärkere Phosphorylierung von GST-SAPK β , im Vergleich zu den nicht-induzierten Proben des Klons A13 (Vergleich Spur 9,10 mit 13,14). Die Stimulation mit Sorbitol führte in den induzierten Proben nicht zu einer verstärkten Phosphorylierung von GST-SAPK β (s. Spur 15,16). Dieses ist vereinbar mit einem dominant negativen Effekt von GFP-MKK7_{3A}.



3.3.5 Untersuchungen des JNK Signalweges nach Induktion von MKK7 Wildtyp und konstitutiv inaktiven Mutanten von MKK7

Analoge Untersuchungen zu denen der Klone E4 und E10 wurden auch mit stabilen Klonen von GFP-MKK7_{wt}, GFP-MKK7_{3A} und GFP-MKK7_{K149M} durchgeführt.

Die Klone A13 und K42 wurden wie E4 subkloniert.

Es wurden 7 GFP-MKK7_{3A} Klone von insgesamt 25 Klonen und 8 GFP-MKK7_{K149M} Klone von 52 Klonen durch Mikroskopanalysen identifiziert. Dabei war die Grünfluoreszenz der GFP-MKK7_{K149M} Klone sehr viel schwächer als bei den GFP-MKK7_{3E} und GFP-MKK7_{3A} Klonen. Die folgenden Ergebnisse wurden mit den zweifach klonierten Zellen der Klone A5, A15, K23 und K56 erzielt.

Untersuchung des JNK Signalweges in einem stabil mit GFP-MKK7_{wt} transfizierten Klon in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli

Als stärkste JNK-Aktivatoren wirkten Sorbitol und Anisomycin (s. Abb. 3.28, Spur 5 und 6), durch IL-1 α , TNF α und EGF erfolgte nur eine sehr geringe Aktivierung des Signalweges. Durch Induktion von MKK7_{wt} wurde die Aktivierung des JNK Signalweges, messbar als *in-vitro* Phosphorylierung von GST-Jun, etwas stärker. Dies gilt aber nicht für die durch Anisomycin erfolgte JNK Aktivierung (vgl. Spur 6 und Spur13). Der Einfluß der Expression der MKK7_{wt} auf den JNK Signalweg in Anwesenheit starker Stimuli ist eher gering.

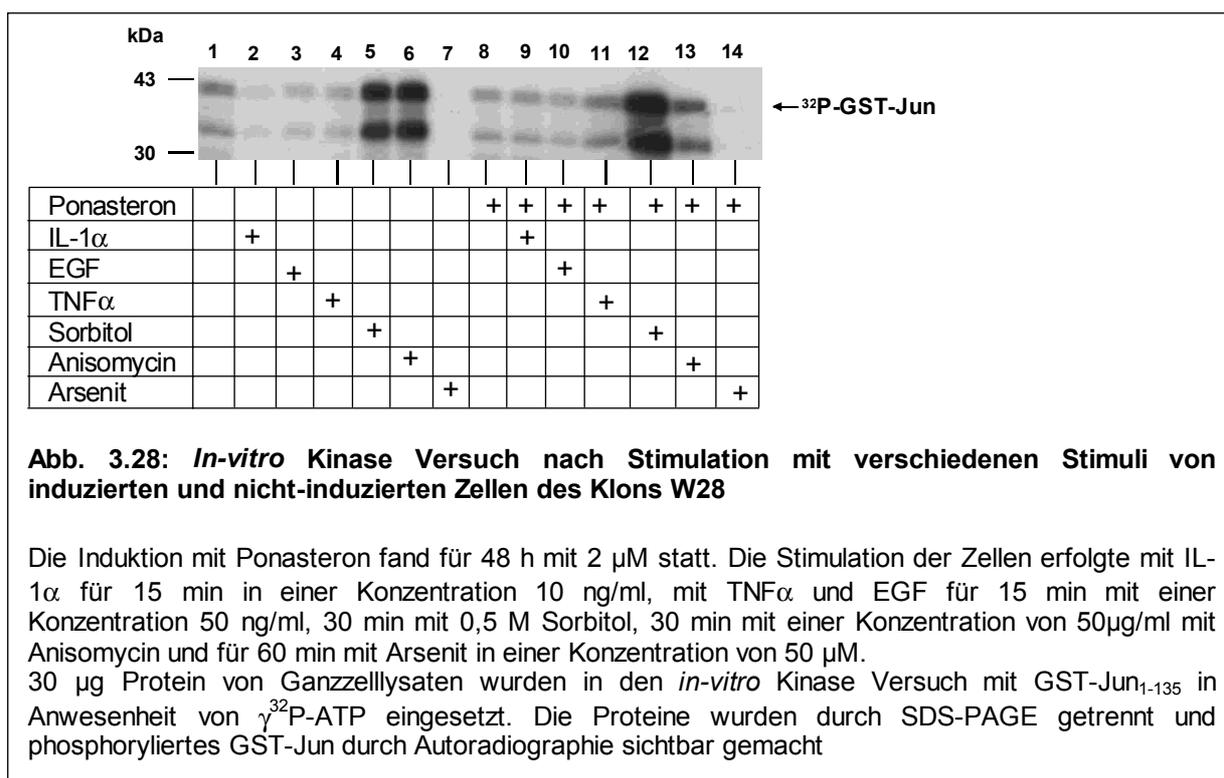


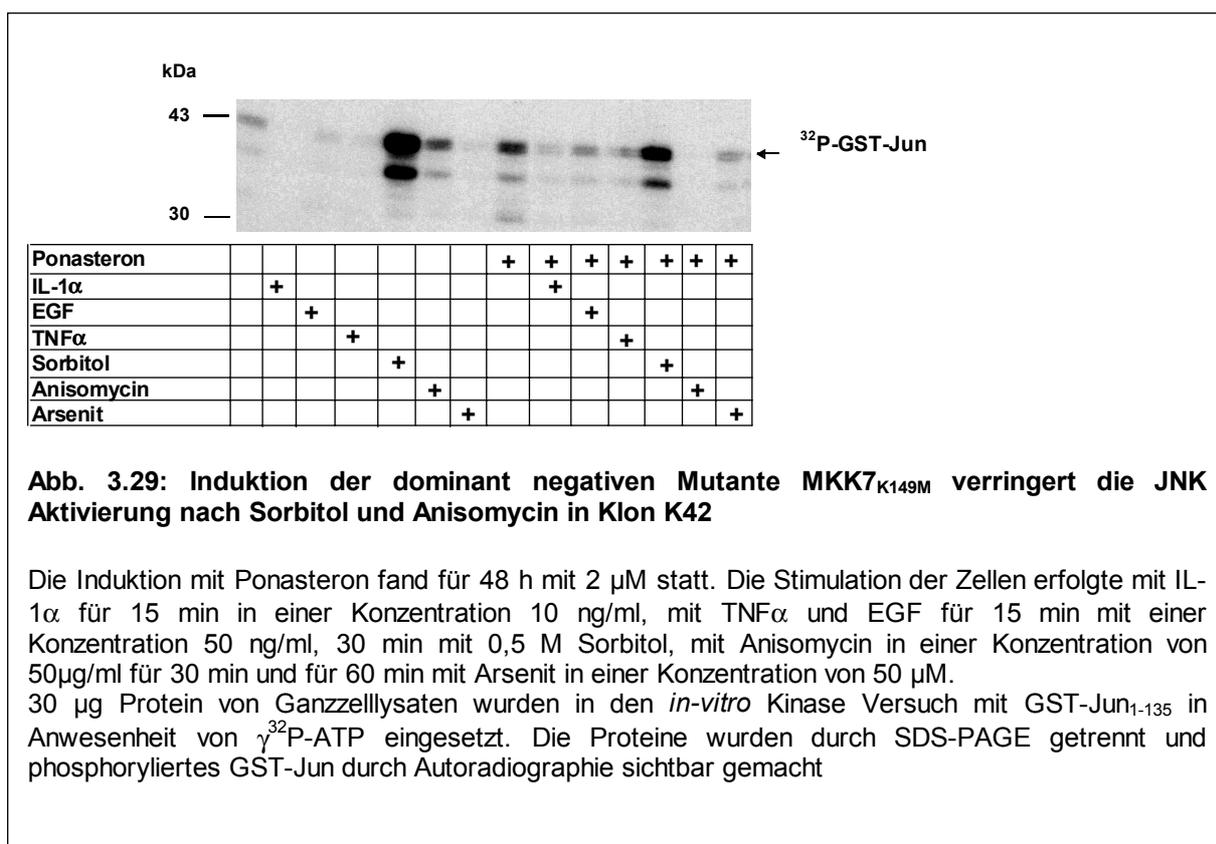
Abb. 3.28: *In-vitro* Kinase Versuch nach Stimulation mit verschiedenen Stimuli von induzierten und nicht-induzierten Zellen des Klons W28

Die Induktion mit Ponasteron fand für 48 h mit 2 μ M statt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit IL-1 α für 15 min in einer Konzentration 10 ng/ml, mit TNF α und EGF für 15 min mit einer Konzentration 50 ng/ml, 30 min mit 0,5 M Sorbitol, 30 min mit einer Konzentration von 50 μ g/ml mit Anisomycin und für 60 min mit Arsenit in einer Konzentration von 50 μ M. 30 μ g Protein von Ganzzelllysaten wurden in den *in-vitro* Kinase Versuch mit GST-Jun₁₋₁₃₅ in Anwesenheit von γ ³²P-ATP eingesetzt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und phosphoryliertes GST-Jun durch Autoradiographie sichtbar gemacht

Der Einfluß der JNK Aktivierung nach Induktion von einer MKK7 Mutante mit einer Mutation in der ATP-Bindungsdomäne wurde in induzierten und mit verschiedenen Stimuli behandelten Zellen des Klons K42, welcher eine gute Induzierbarkeit von GFP-MKK7_{K149M} (s. Abb. 3.8, C) besitzt, untersucht.

Nach Induktion von GFP-MKK7_{K149M} findet man eine leichte Verstärkung der basalen JNK Aktivität. Die stärkste Aktivierung endogener JNKs erfolgte durch Stimulation von nicht induzierten Zellen durch Sorbitol. Die Induktion der inaktiven Mutante MKK7_{K149M} führte zu einer verringerten Sorbitol stimulierten Aktivierung von JNKs und dadurch zu einer schwächeren Phosphorylierung von rekombinantem GST-Jun₁₋₁₃₅ (vgl. Spur 5 mit Spur 12).

Durch IL-1 α , EGF, TNF α und Arsenit erfolgte eine schwache Aktivierung von JNKs, die durch die Induktion der inaktiven Mutante nicht verringert wurde.

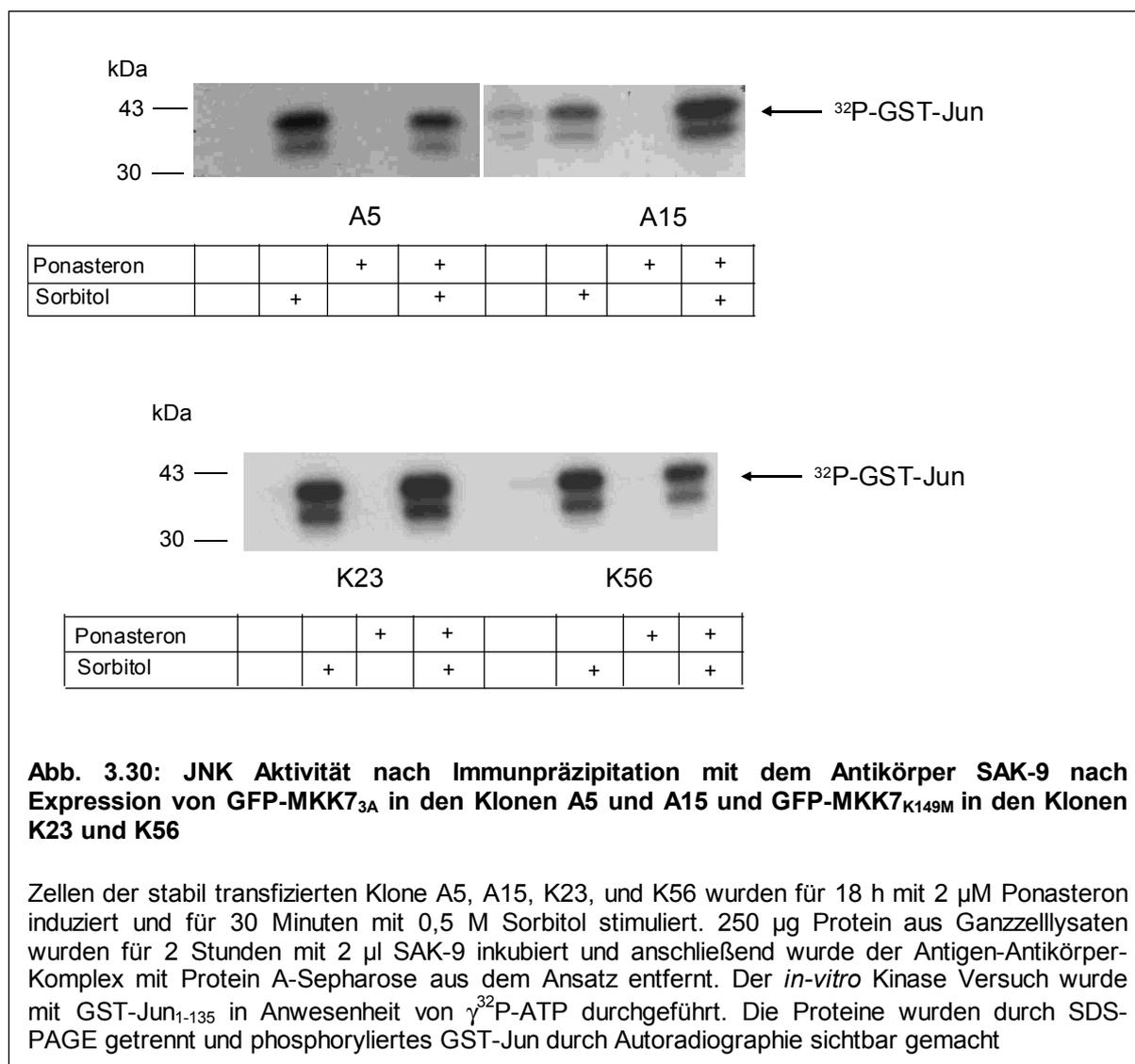


Der Einfluß von Sorbitol auf den JNK Signalweg nach Induktion von den dominant negativen Mutanten MKK7_{3A} und MKK7_{K149M} wurde nach Immunpräzipitation mit dem Antiserum SAK-9 in einem *in-vitro* Kinase Versuch in jeweils zwei Klonen untersucht.

Nach Induktion der inaktiven Mutante MKK7_{3A} und Sorbitol-Stimulation zeigte sich eine leicht schwächere Aktivierung von JNKs bei den Untersuchungen mit dem Klon A5. Allerdings lieferte der analoge Versuch mit dem Klon A15 ein anderes Ergebnis. Durch Stimulation mit Sorbitol wurde nach Induktion der inaktiven Mutante eine erhöhte JNK Aktivität festgestellt.

Durch Induktion der inaktiven Mutante MKK7_{K149M} im Klon K56 konnte die durch Sorbitol stimulierte JNK Aktivierung verringert werden. Der analoge Versuch mit dem Klon K23 lieferte ein anderes Ergebnis. Die JNK Aktivierung nach Sorbitol Stimulation blieb vergleichbar mit dem Wert der nicht induzierten Zellen. Allerdings konnte man auch keine Verstärkung der JNK Aktivierung durch Sorbitol Stimulation wie bei den Versuchen mit den Klonen E6 und E10 feststellen (s. Abb. 3.23 und 3.27).

Bei den Klonen K42 und K56 konnte ein dominant negativer Effekt auf die JNK-Aktivierung festgestellt werden, bei dem Klon K23 dagegen nicht.



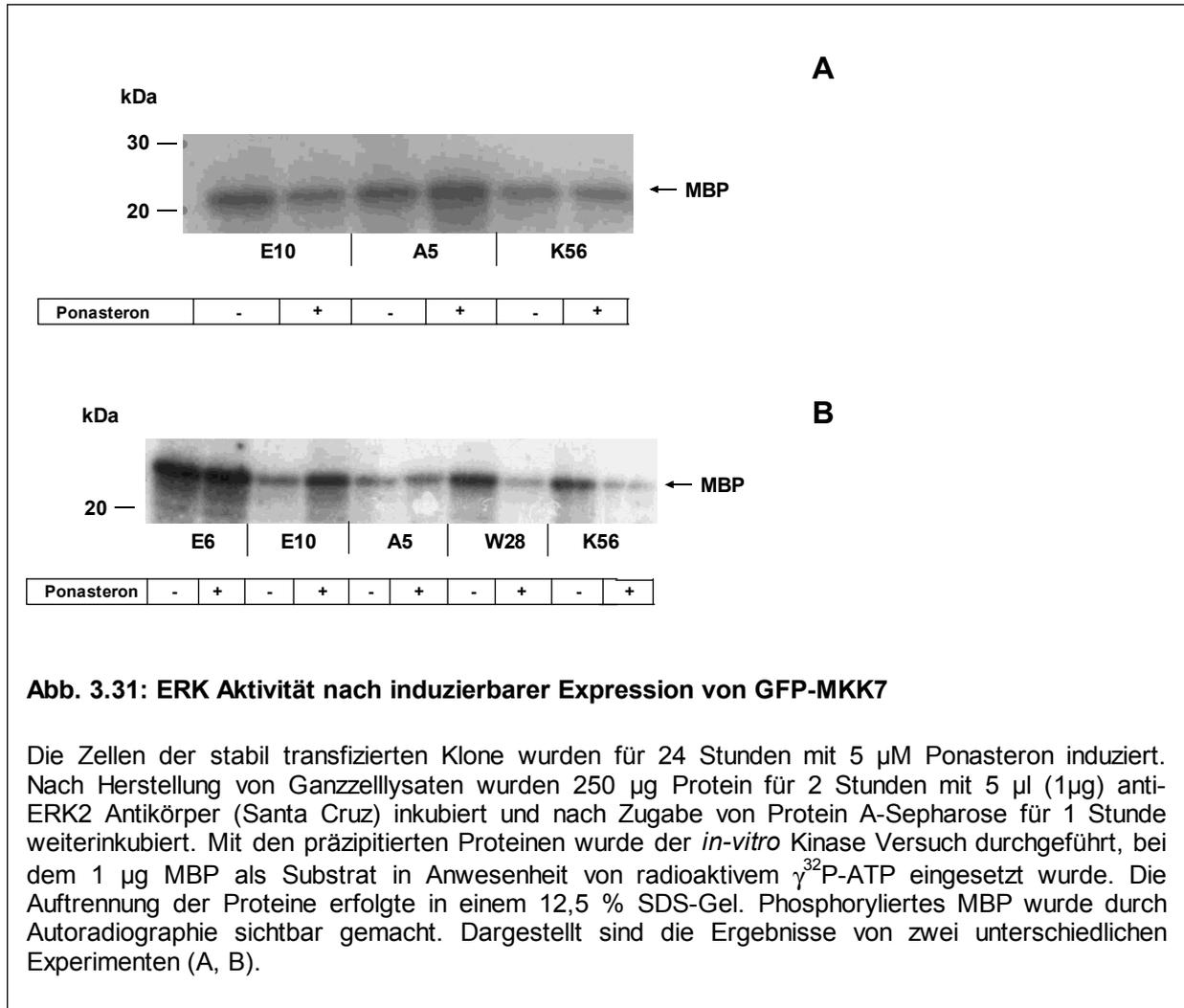
Die Ergebnisse zeigen klonale Unterschied in der inhibitorischen Wirkung von inaktiven Mutanten von MKK7.

3.3.6 Einfluß der induzierbaren Expression von GFP-MKK7 auf andere MAPK Kinasen

MKK7 fungiert als spezifischer Aktivator von JNKs (Holland *et al.*, 1997, Tournier *et al.*, 1997, Lu *et al.*, 1997, Moriguchi *et al.*, 1997). Eine Aktivierung der anderen MAPK Signalwege, ERK und p38 Signalweg, sollte daher durch Expression von GFP-MKK7 nicht stattfinden. Durch *in-vitro* Kinase Versuche nach Immunpräzipitation von ERK2 bzw. p38 mit spezifischen Antikörpern wurde untersucht, ob durch Induktion von MKK7 (Wildtyp oder Mutanten) in den stabil transfizierten Klonen diese Signalwege beeinflusst werden.

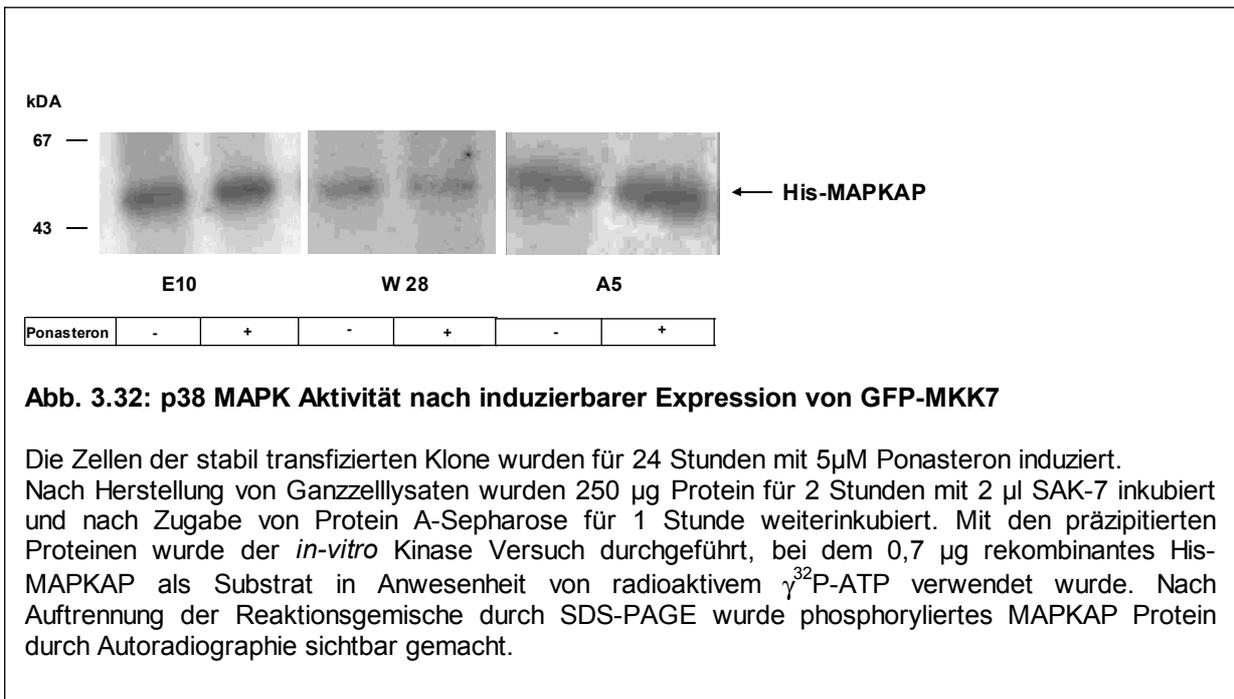
Für die *in-vitro* Kinase Versuche wurde für die Untersuchung des ERK2 Signalweges „myelin basic protein“ (MBP) als Substrat verwendet.

In den Versuchen zeigen sich leichte Unterschiede in der Phosphorylierung von MBP, die aber nicht auf die Induktion von MKK7 zurückzuführen sind. In A zeigte sich nach Induktion von MKK7_{3A} eine leichte Verstärkung der MBP-Phosphorylierung, in B konnte zwischen induzierten und nicht induzierten Proben kein Unterschied festgestellt werden. Eine starke basale Aktivierung des ERK Signalweges zeigte sich in den Proben des Klons E6, ein Einfluß durch Induktion von MKK7_{3E} war nicht zu bemerken. Die leichte Abnahme der ERK2 Aktivität in W28 und K56 ist nicht signifikant. Offensichtlich bestehen Unterschiede in der basalen ERK2 Aktivität zwischen den Klonen.



Die Untersuchungen des p38 MAPK Signalweges wurden nach Immunpräzipitation mit einem p38 spezifischen Antiserum (SAK-7) und *in-vitro* Kinase Versuche mit rekombinantem His-MAPKAP Proteinkinase als p38 Substrat durchgeführt.

Durch Induktion von MKK7_{3E}, MKK7_{wt} oder MKK7_{3A} wurde keine Beeinflussung des p38 MAPK Signalweges festgestellt (s. Abb. 3.32). Die Phosphorylierung des spezifischen p38 MAPK Substrates, MAPKAP, änderte sich nach Induktion von MKK7 nicht.

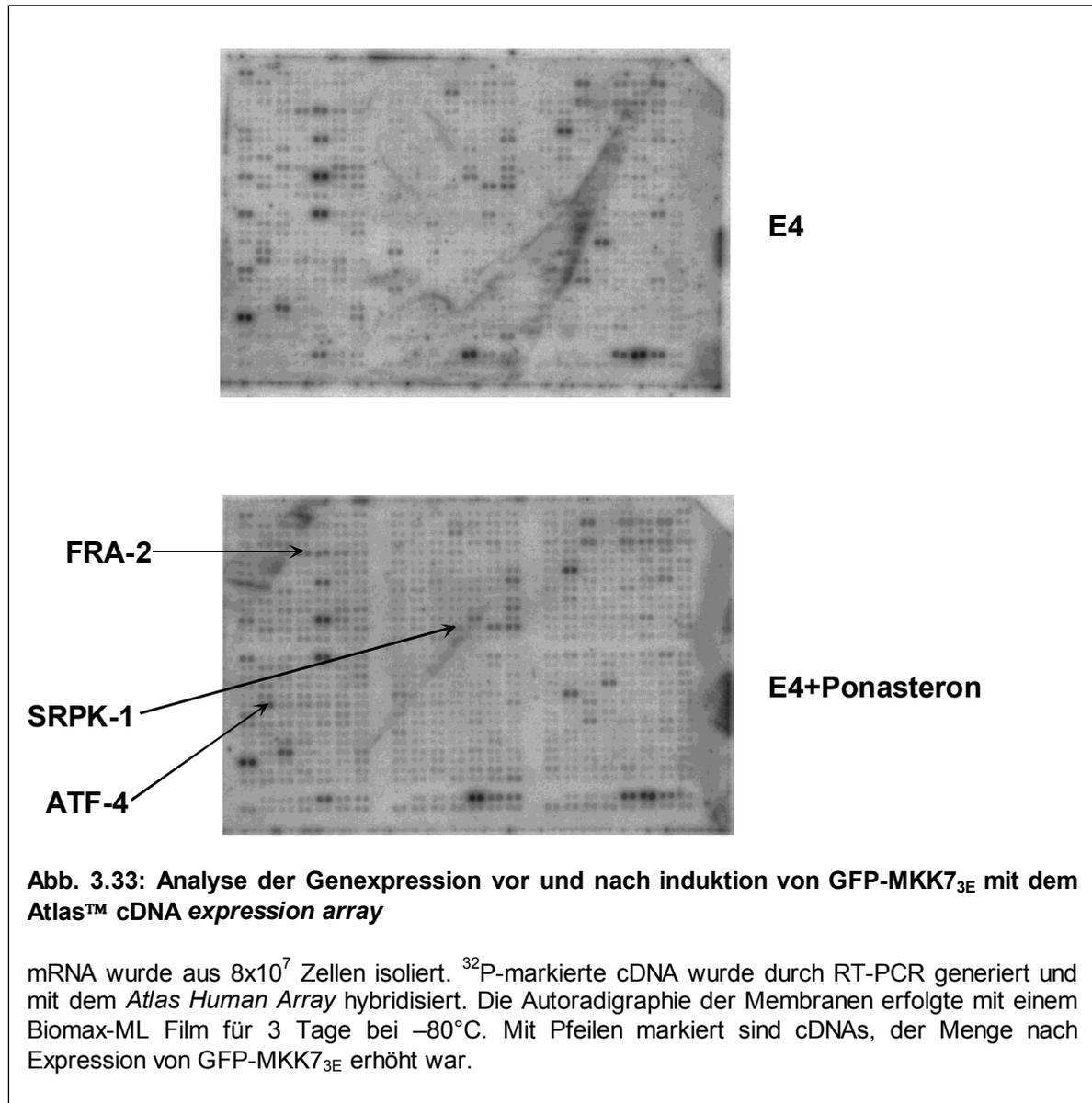


3.4 Funktionelle Auswirkung der Induktion von GFP-MKK7_{3E} auf die Genexpression in den Klonen E4 und E10

3.4.1 Vergleich der mRNA Expression vor und nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} mittels Untersuchungen mit dem Atlas™ cDNA expression array (Clontech)

Mit Hilfe eines cDNA „arrays“ sollten Unterschiede in der Expression von mRNA in Abhängigkeit von MKK7_{3E} untersucht werden. Die Nylonmembran mit 588 immobilisierten cDNAs wurden nach Anleitung des Herstellers mit der mRNA von nicht-induzierten und für 24 Stunden mit 2 µM Ponasteron induzierten Zellen des stabil mit GFP-MKK7_{3E} transfizierten Klons E4 hybridisiert.

Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Autoradiographien mit Hilfe des Programms *Molecular Analyst*, in dem um jede cDNA (2 Spots für eine cDNA) ein Kästchen identischer Größe gelegt wurde und die Intensität der Filmschwärzung quantifiziert wurde. Anhand des Vergleichs der cDNA Hybridisierungen für sogenannte „house keeping genes“ konnte eine relativ gleichmäßige Versuchsdurchführung angenommen werden.



Wenige Unterschiede um mindestens Faktor 2 wurde zwischen induzierter und nicht induzierter Probe festgestellt. Dieses betraf von den 588 cDNAs nur die folgenden 4 Gene:

Zunahme nach Induktion von GFP-MKK7_{3E}

- FRA-2
- Serin Kinase (SRPK-1)
- ATF-4 (cAMP abhängiger Transkriptionsfaktor)

Abnahme nach Induktion von GFP-MKK7_{3E}

- Thymosin Beta-10

Diese Ergebnisse wurden mittels RT-PCR und Northern-Blots mit dem erneut einzelzellklonierten Klon E10, dem Subklon von E4, überprüft.

Mit der erneuten RT-PCR Analyse konnten keine Unterschiede in der Expression von SRPK-1, FRA-2 und ATF-4 zwischen nicht induzierten und mit Ponasteron induzierten Zellen festgestellt werden. Weitere RT-PCR Versuche, die mit verschiedenen Zykluszahlen durchgeführt wurden, bestätigten diese Ergebnisse. Die Expression von FRA-2 und ATF-4 ist in nicht induzierten und in induzierten Zellen des Klons E10 vergleichbar. Die Expression von SRPK-1 scheint in den induzierten Zellen sogar etwas geringer zu sein als in den Kontrollzellen. Die Analyse des cDNA arrays zeigte dagegen eine Erhöhung von SRPK-1 nach Induktion von GFP-MKK7_{3E}. Die Ergebnisse des *cDNA arrays* konnten daher mit dieser Methode nicht reproduziert werden.

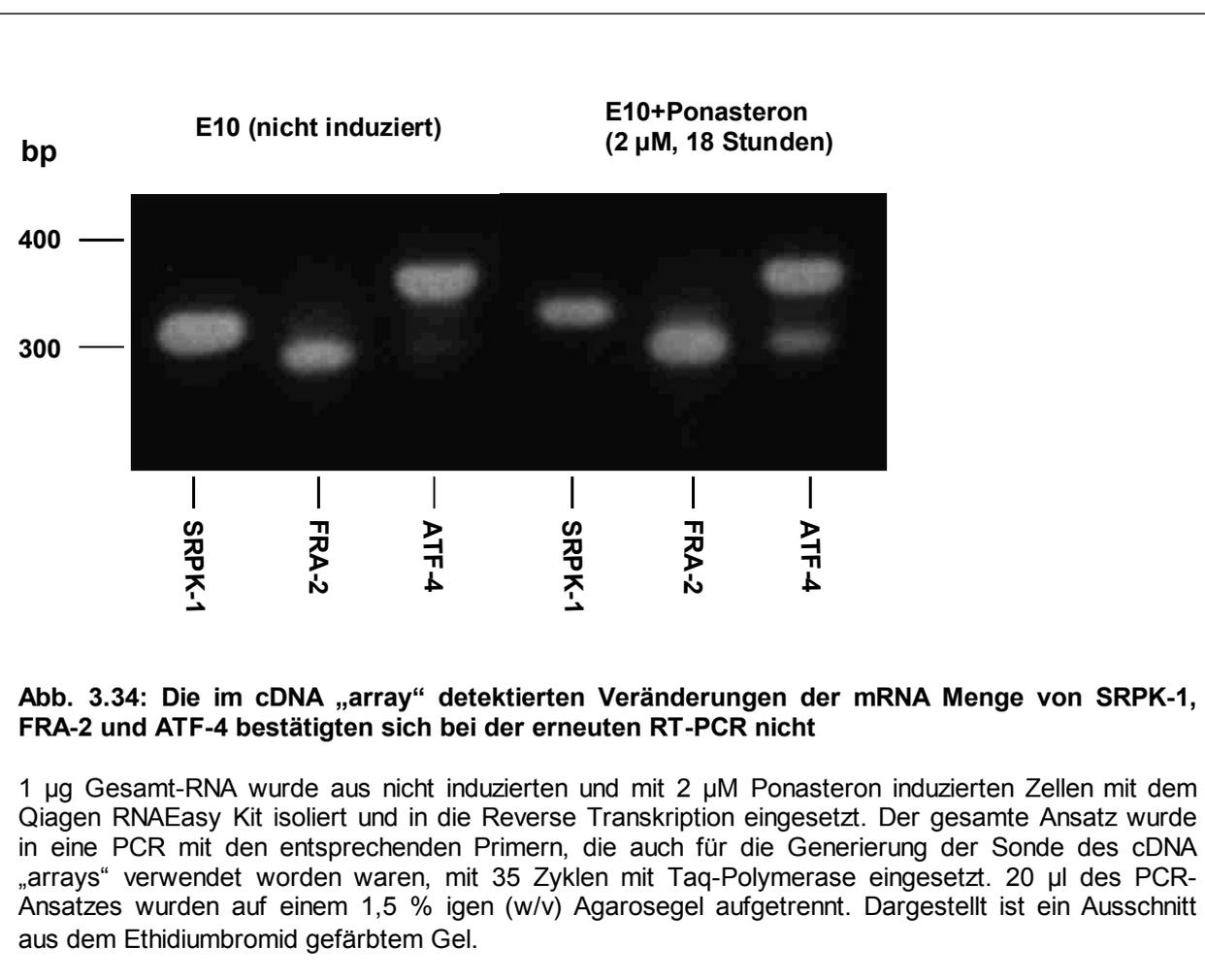


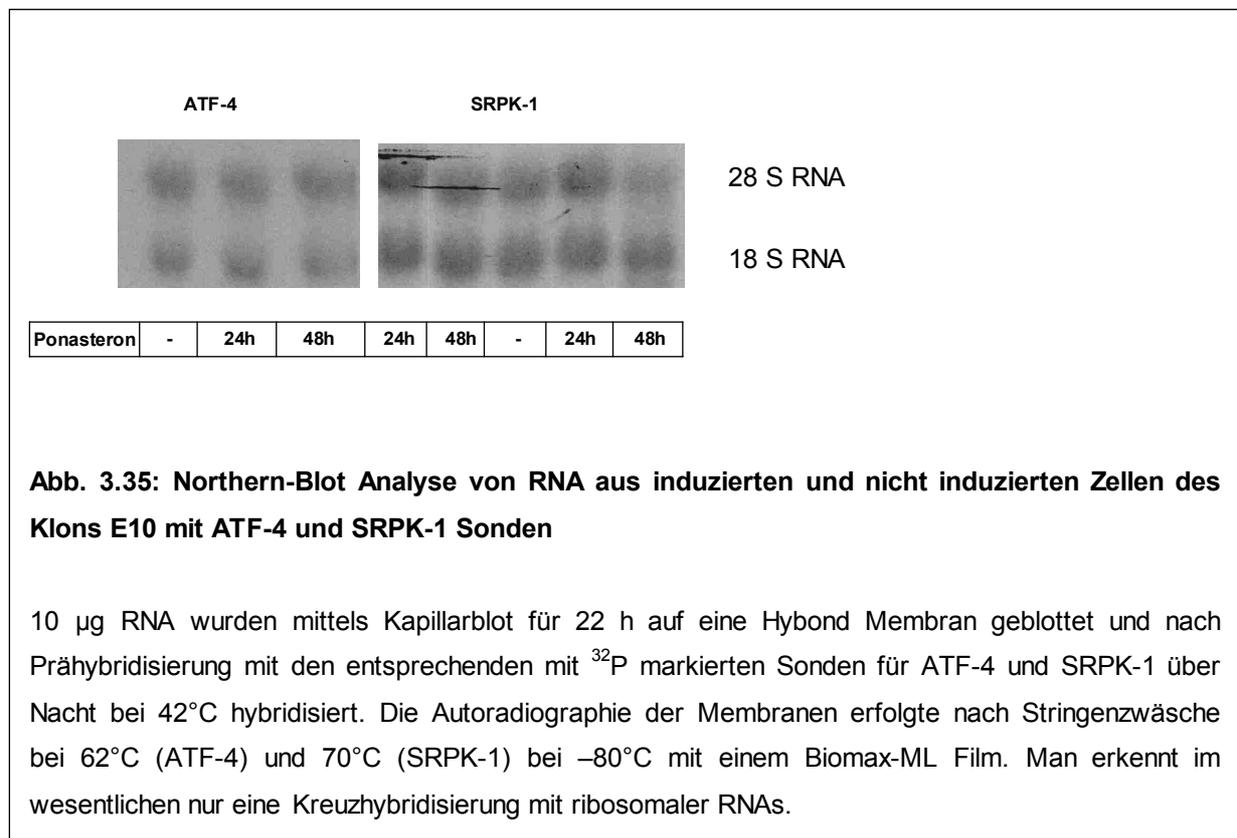
Abb. 3.34: Die im cDNA „array“ detektierten Veränderungen der mRNA Menge von SRPK-1, FRA-2 und ATF-4 bestätigten sich bei der erneuten RT-PCR nicht

1 µg Gesamt-RNA wurde aus nicht induzierten und mit 2 µM Ponasteron induzierten Zellen mit dem Qiagen RNeasy Kit isoliert und in die Reverse Transkription eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde in eine PCR mit den entsprechenden Primern, die auch für die Generierung der Sonde des cDNA „arrays“ verwendet worden waren, mit 35 Zyklen mit Taq-Polymerase eingesetzt. 20 µl des PCR-Ansatzes wurden auf einem 1,5 % igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Ethidiumbromid gefärbtem Gel.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse des *cDNA arrays* durch Northern-Blot Analysen überprüft. Die Sonden wurden mit den gleichen Primern, die auch zur Herstellung der immobilisierten cDNAs für den „array“ und die RT-PCR verwendet wurden, aus humanen KB-Zellen mit RT-PCR amplifiziert und über einem Agarosegel aufgereinigt.

Man findet keine Unterschiede in der Hybridisierung der Sonde für ATF-4 als auch für SRPK-1 mit der RNA aus nicht induzierten oder mit Ponasteron für 24 oder 48 Stunden induzierten Zellen. Auf beiden Hybridisierungen sind nur unspezifische Banden, bzw. Kreuzhybridisierungen mit der 18 und 28 S RNA zu erkennen.

Auch die Untersuchungen mit der FRA-2 Sonde konnte das Ergebnis des *cDNA Arrays* nicht bestätigen. Die starken Kreuzhybridisierungen, die trotz hoher Temperaturen bei der Stringenzwäsche zu beobachten waren, stellen letztlich auch das Ergebnis des initialen cDNA „arrays“ in Frage, da die gleichen Primer verwendet wurden. Weitere Untersuchungen bzgl. Thymosin Beta-10 wurden daher nicht mehr durchgeführt, da hier der bei dem cDNA „array“ festgestellte Unterschied sogar noch kleiner war als bei FRA-2, ATF-4 und SRPK-1.



3.4.2 Vergleich der Proteinexpressionsmuster vor und nach Induktion der Expression von GFP-MKK7_{3E} mit Hilfe von zwei-dimensionaler Elektrophorese unter Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten

Die zwei-dimensionale (2D) Polyacrylamid Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975) ermöglicht die Auftrennung von komplexen Proteingemischen und so die gleichzeitige Analyse von zahlreichen Genprodukten. In der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem pI-Wert durch isoelektrische Fokussierung (IEF) mit immobilisierten pH-Gradienten und in der zweiten Dimension nach der molekularen Masse der Proteine durch SDS-PAGE.

Für die Proteomuntersuchungen wurde der stabile Klon E10 nach FACS Sortierung (vgl. 3.2.3.3) verwendet, wobei MKK7_{3E} abhängige Veränderungen der Proteinexpression analysiert wurden.

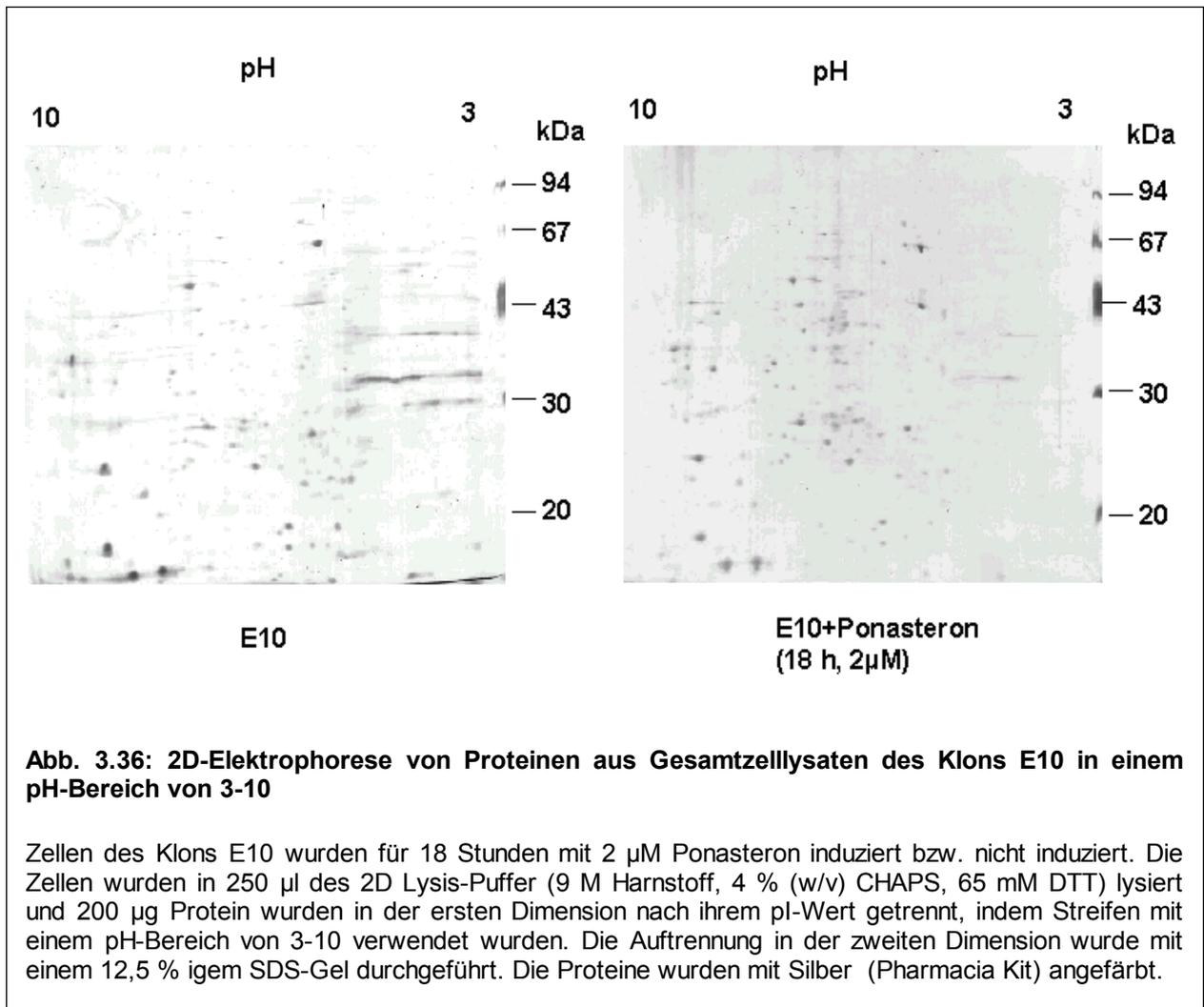
Die Zellen wurden vor und nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} in einem 2D-Lysepuffer lysiert. 200 µg Protein wurden mit Rehydrationspuffer, DTT und dem entsprechenden IPG-Puffer versetzt, auf dem IEF Streifen appliziert und in der IPG-Phor isoelektrisch fokussiert.

Nach Äquilibration im SDS-Äquilibrationpuffer erfolgte die Auftrennung in der zweiten Dimension. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels verschiedener Silberfärbungen oder durch die Fluoreszenzfarbstoffe Sypro Ruby und Tangerine. Im folgenden sind verschiedene Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt, wobei sowohl die Probenauftragsmenge durch Verwendung unterschiedlich großer Gele oder durch verschiedene pH-Gradienten variiert wurden.

3.4.2.1 2D-Elektrophorese unter Verwendung von 13 cm IPG-Streifen

Beide Gele der Abb. 3.36 zeigen eine gute Trennung der Proteine und ein vergleichbares Proteinmuster. Allerdings wurden relativ wenig Proteinspots detektiert, insgesamt ca. 200. Dies kann an der Sensitivität der angewendeten Silberfärbung liegen, oder an der geringen Proteinmenge, die eingesetzt wurde. Wenig Proteinspots befinden sich im sauren Bereich bei pH 3 - 4, relativ viele Proteine können im neutralen und leicht basischen Bereich detektiert werden. Die molekularen Massen vieler Proteinspots liegen im Bereich von ca. 25 – 80 kDa.

Unterschiede zwischen den nicht induzierten und den mit Ponasteron induzierten Lysaten des Klons E10 waren mit diesen und den weiteren analog angefertigten Gelen nicht festzustellen.



Um die Auftrennung zu verbessern, wurde der verwendete pH-Gradient in dem Bereich, indem relativ viele Proteinspots detektiert wurden, verkleinert. Dadurch wird der Trennbereich aufgespreizt. Für diese 2D-Gele wurden Streifen mit einem pH Bereich von 4-7 verwendet. Außerdem wurde in einigen Versuchen die aufgetragene Proteinmenge von 200 µg auf 500 µg erhöht.

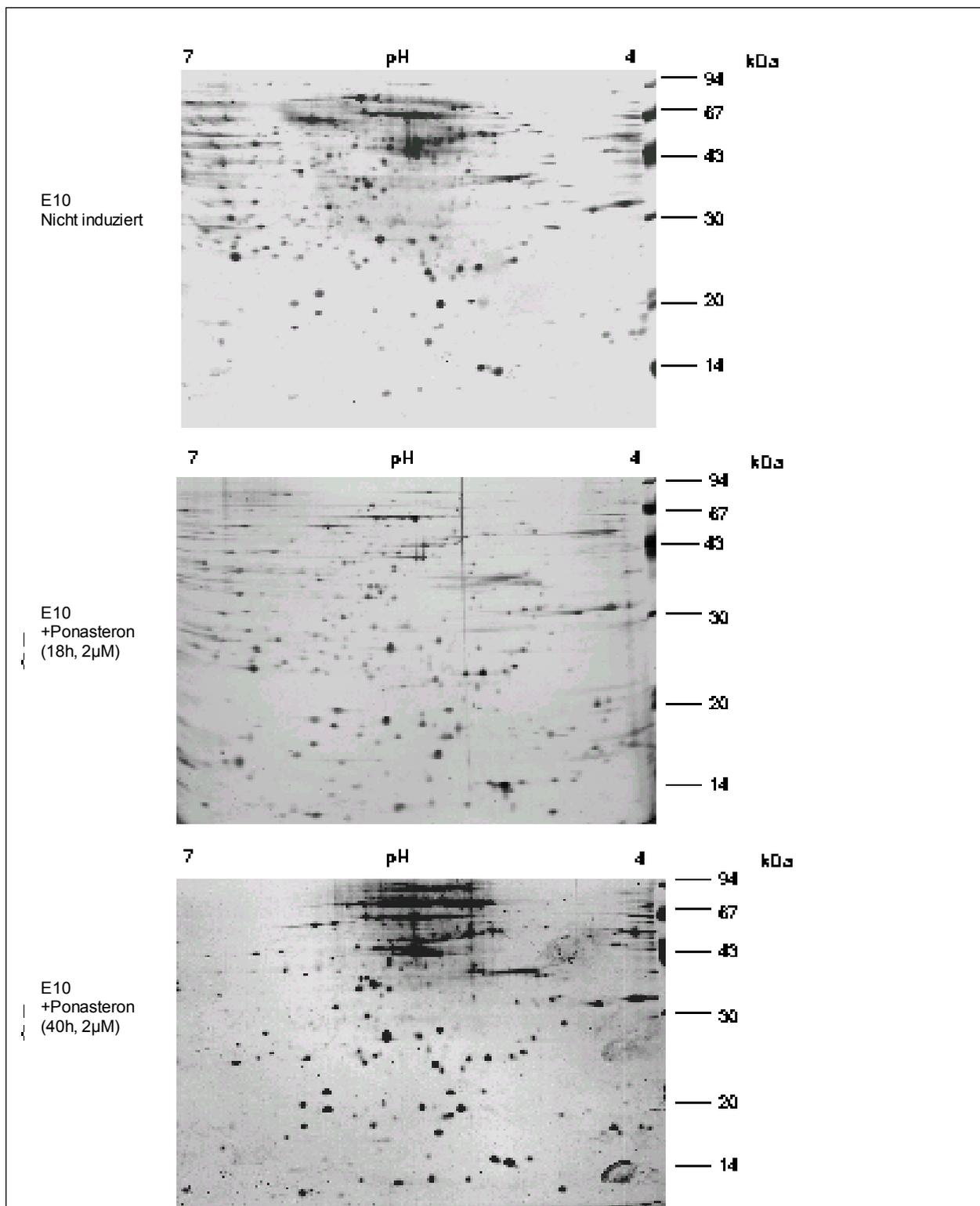


Abb. 3.37: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen des Klons E10 in einem pH Bereich 4 - 7

Zellen des Klons E10 wurden für 18 und für 40 Stunden mit 2 µM Ponasteron induziert bzw. nicht induziert. Die Zellen wurden in 250 µl des 2D Lysis-Puffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 65 mM DTT) lysiert und 200 µg Protein wurden in der ersten Dimension nach ihrem pI-Wert getrennt, indem Streifen mit einem pH-Bereich von 4-7 verwendet wurden. Die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde mit einem 12,5 % igem SDS-Gel durchgeführt. Die Proteine wurden mit Silber (Pharmacia Kit) angefärbt.

Die Gele der Abb. 3.37 zeigen in dem gesamten pH-Bereich eine gute Proteinauftrennung. Die Proteinspots sind gut fokussiert, die Anzahl der detektierten Proteinspots konnte im Vergleich zu den Versuchen der Abb. 3.36 auf ca. 300 Spots erhöht werden. Auch die Trennung nach der molekularen Masse war in dem Bereich bis ca. 60 kDa ausreichend. Auf allen Gelen sind im oberen Molekularbereich (bei 60-90 kDa) Ansammlungen von nicht aufgetrennten Proteinen zu erkennen. Um diese auch trennen zu können, müssten veränderte Acrylamid-Konzentrationen, andere reduzierende Reagentien verwendet oder die Trennstrecke in der zweiten Dimension vergrößert werden. Außerdem könnte die Auftrennung mit Streifen mit noch engerem pH-Gradienten in dem Bereich von 5 - 6 erfolgen.

Es konnten im Vergleich zu den Gelen mit dem pH-Bereich 3 - 10 (Abb. 3.36) wesentlich mehr Proteinspots in dem pH-Bereich 4 - 7 (Abb. 3.37) detektiert werden. Das Proteinmuster war bei nicht induzierten und den induzierten Proben vergleichbar. Unterschiede, die GFP-MKK7_{3E} zu sein scheinen, konnten bei Wiederholung der Gelläufe allerdings nicht reproduziert werden.

Um auch Proteine, die in geringer Konzentration vorkommen, detektieren zu können, wurden danach 500 µg Protein in 2D-Gelen in dem Bereich von pH 4 - 7 angefertigt.

Durch die Erhöhung der verwendeten Proteinmenge konnte die Anzahl der detektierten Proteinspots (Abb. 3.38) im Vergleich zu den Gelen der Abb. 3.37 vergrößert werden. Die verwendete Proteinmenge wurde um im Vergleich zu den Gelen aus Abb. 3.37 um das 2,5 fache von 200 mg auf 500 mg erhöht, die Anzahl der Proteinspots konnte aber nicht um denselben Faktor erhöht werden. Dies liegt möglicherweise an der Sensitivität der verwendeten Detektionsmethode. Das Proteinmuster ist mit dem der Gele der Abb. 3.37 vergleichbar. Reproduzierbare Unterschiede zwischen Lysaten von nicht induzierten und mit Ponasteron induzierten Zellen des Klons E10 ließen sich nicht feststellen.

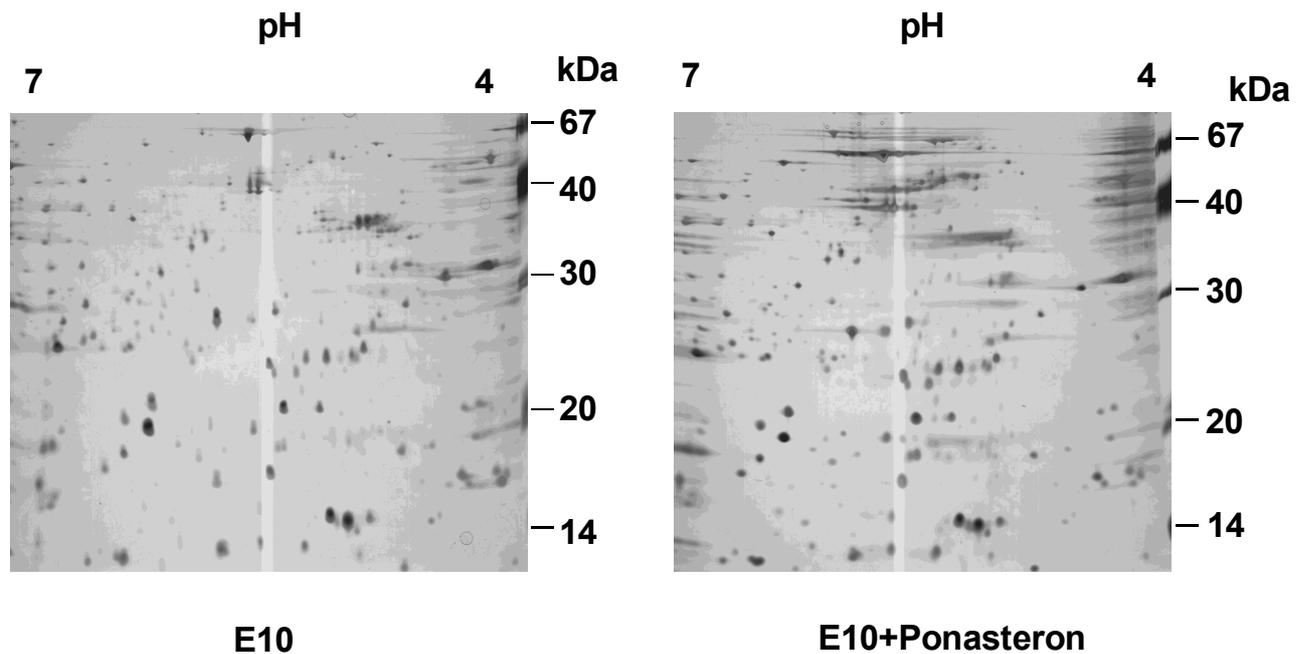


Abb. 3.38: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen des Klons E10 in einem pH Bereich 4-7 mit 0,5 mg Proteinauftragsmenge

Zellen des Klons E10 wurden für 18 Stunden mit 2 μM Ponasteron induziert bzw. nicht induziert. Die Zellen wurden in dem 2D Lysis-Puffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 65 mM DTT) lysiert und 500 μg Protein wurden in der ersten Dimension nach ihrem pI-Wert getrennt, indem Streifen mit einem pH-Bereich von 4-7 verwendet wurden. Die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde mit einem 12,5 % igem SDS-Gel durchgeführt. Die Proteine wurden mit Silber (Pharmacia Kit) angefärbt.

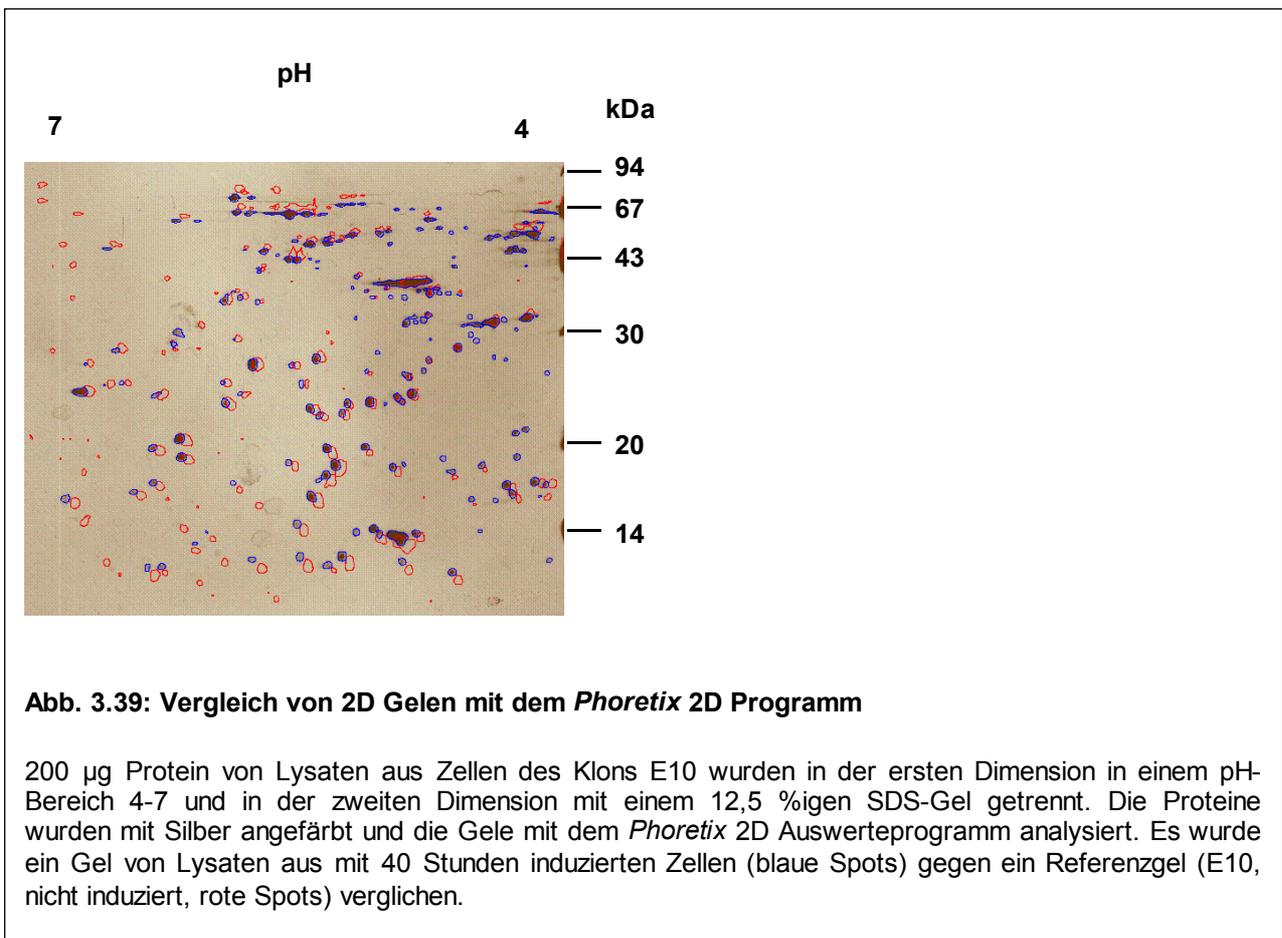
3.4.2.2 Auswertung der Gele: *Phoretix 2D Analyse-Programm*

Die Auswertung der Gele erfolgte teilweise mit Hilfe eines Programms, in dem bis zu 100 Gele verglichen werden können. Dabei wird ein Gel als Referenzgel definiert und dieses kann dann am Bildschirm mit anderen Gelen verglichen werden. Dazu wird zuerst der zu analysierende Bereich festgelegt. Dann werden die eingescannten Gele mit Hilfe eines Detektionsalgorithmus analysiert, indem die Anzahl und Intensitäten der Pixel ausgehend von der Mitte der Gele zu den Rändern bestimmt werden. Dazu wird eine Art Matrix um jeden Pixel gelegt und die Werte an den Rändern dieser Matrix mit denen der Mitte verglichen. Wenn die Intensität der Pixel in der Mitte im Vergleich zu den Pixelintensitäten an den Rändern einen bestimmten Unterschied aufweist, werden diese Pixels als Spots erkannt. Die Bestimmung

dieses Intensitätsunterschiedes wird für jeden Pixel in dem ganzen ausgewählten Bereich durchgeführt. Durch Wahl verschiedener Parameter wie, Sensitivität, Größe des Matrixbereichs um einen Pixel, Hintergrund- und Rauschfaktor, kann die Spoterkennung beeinflusst werden. Nach Durchführung der Spoterkennung wurde das Gel mit Hilfe des Programms vermessen, es können Volumen und Flächen der Spots berechnet werden und somit nicht nur neue bzw. fehlende Spots festgestellt, sondern auch Änderungen in der Spotgröße analysiert werden.

Mit Hilfe des Programms sollte die Detektion von Unterschieden im Proteinpuster, die durch Induktion von MKK7_{3E} verursacht wurden, vereinfacht werden.

Beispielhaft für eine solche Analyse ist der Vergleich zweier Gele gezeigt.



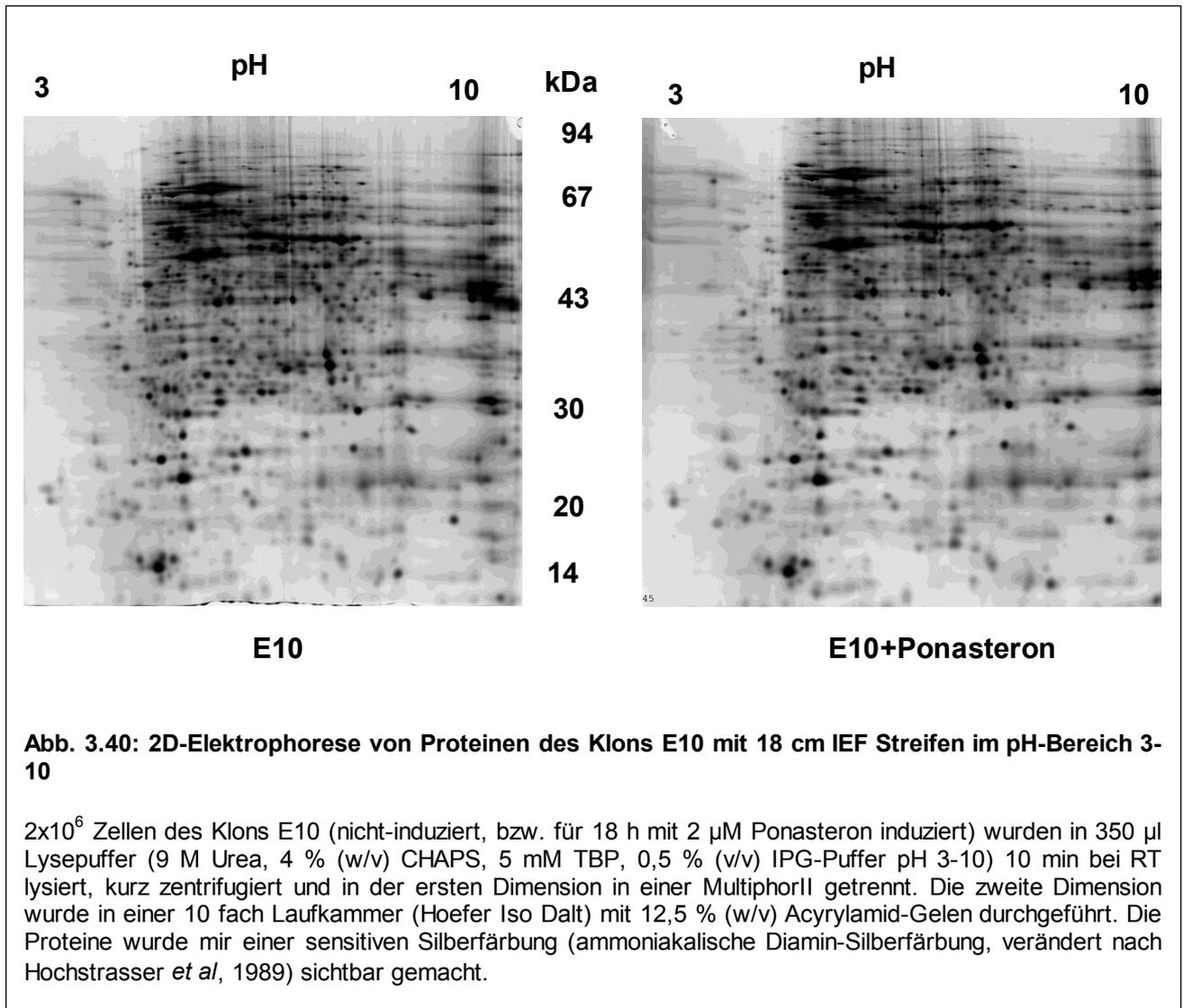
Die Detektion der Proteinspots wurde automatisch mit der Software *Phoretix 2D* durchgeführt, wobei aber immer eine manuelle Überprüfung und Korrektur notwendig war, da z.B. manchmal Färbefaktoren als Spots detektiert werden. Mit Hilfe dieses Programms wurden die 13 cm Gele verglichen, wobei zwar Unterschiede festgestellt wurden, diese aber in weiteren Experimenten nicht reproduzierbar waren.

3.4.2.3 Proteomuntersuchungen unter Verwendung von 18 cm IEF Streifen und der Hoefer Iso Dalt Kammer

Die 2D-Gele, die mit den 13 cm Streifen angefertigt wurden, zeigten keine reproduzierbaren Unterschiede in der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Induktion der konstitutiv aktiven Mutante von GFP-MKK7_{3E} (Klon E10).

In den weiteren Versuchen wurden deshalb verschiedene Parameter verändert, so wurden längere Streifen für die 1. Dimension eingesetzt und eine sensitivere Silberfärbung angewendet. Außerdem wurden weitere und kleinere Proteingradienten verwendet und dadurch der Trennbereich aufgespreizt. Um Proteinspots analysieren zu können, wurden auch Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, da die massenspektrometrische Analyse von mit Silber gefärbten Proteinspots kaum möglich ist, da Glutaraldehyd, eine Substanz, die zur Fixierung der Proteine im Gel eingesetzt wird, die MS Analyse stört (Shevchenko *et al.*, 1996).

Für die sensitive Silberfärbung wurden 2×10^6 Zellen lysiert, als reduzierendes Agens wurde Tributylphosphin (TBP) eingesetzt, um die Trennung im oberen Molekularbereich zu verbessern (Rabilloud, 1996).



Die Gele der Abb. 3.40 zeigen eine gute Trennung der Proteine im Bereich von 14 bis 90 kDa und pH 3 bis 10, wobei im sauren Bereich wesentlich weniger Proteine auftreten. Im Vergleich zu den Gelen, die mit den 13 cm Streifen angefertigt wurden, konnte die Anzahl der detektierten Proteinspots auf ca. 800 gesteigert werden. Dies liegt aber nicht nur an den längeren Streifen und den größeren Gelen, sondern auch an der äußerst sensitiven Färbemethode.

Mit dieser Methode wurden jeweils 3 Gele von induzierten, bzw. nicht-induzierten Proben bei Verwendung von Streifen mit dem pH-Gradienten 3-10 und jeweils 2 Gele in dem pH-Bereich 4-7 angefertigt. Auf den Gelen mit dem Bereich 4-7 wurde in dem

Proteinmuster der induzierten und der nicht-induzierten Proben keine Unterschiede festgestellt.

Beim Vergleich der Gele des pH-Gradienten 3-10 wurden auf 2 der 3 Gele der induzierten Proben 3 unterschiedliche Proteinspots gefunden. Auf dem dritten Gel der induzierten Probe war der Bereich schlecht getrennt und die kleinen Spots nicht erkennbar.

Ausschnitt aus den Gelen (Abb. 3.39) sowie zwei weiterer Gele, die analog angefertigt wurden, mit den Bereichen der unterschiedlichen Proteinspots nach GFP-MKK7_{3E} Expression

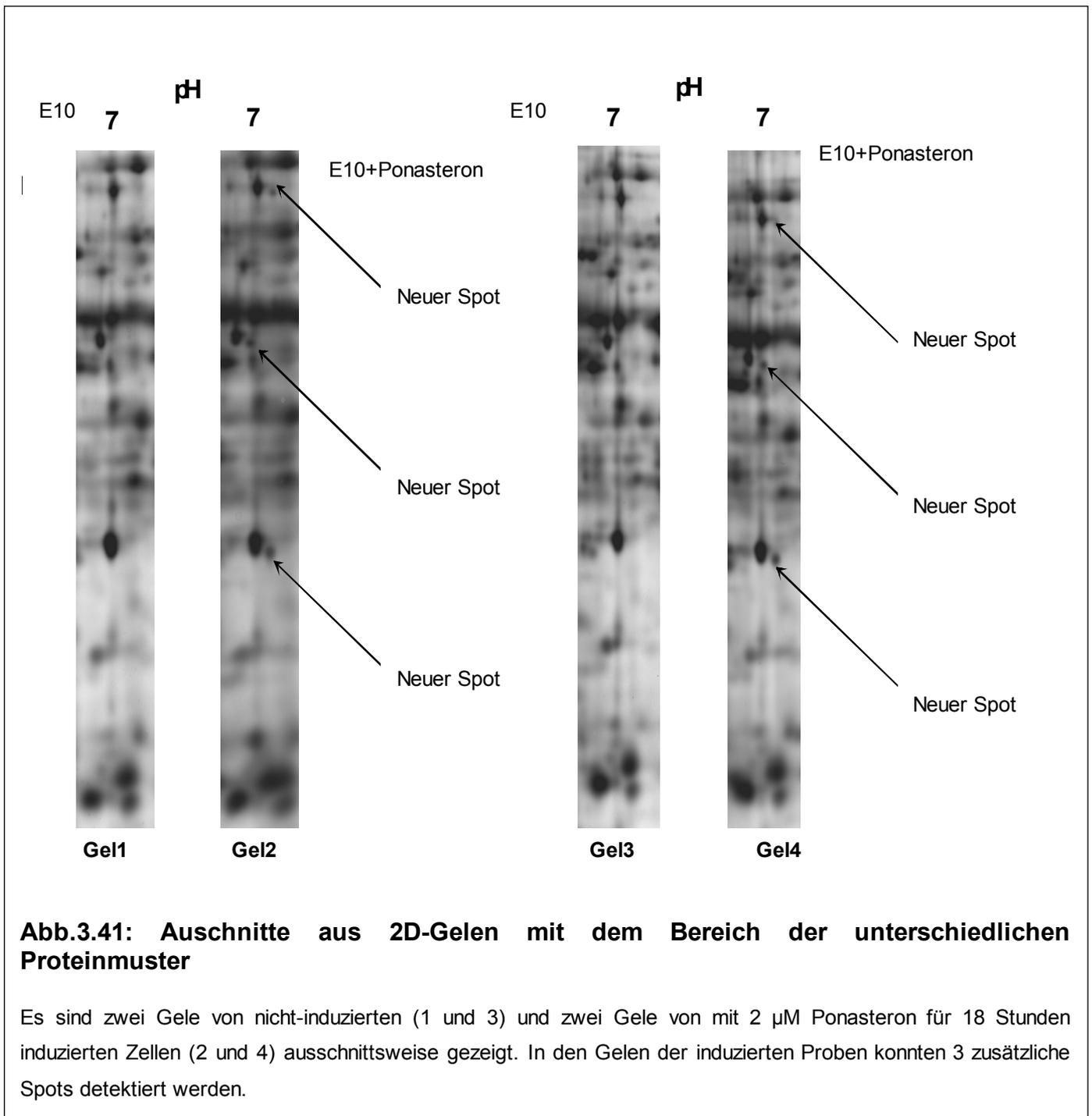


Abb.3.41: Ausschnitte aus 2D-Gelen mit dem Bereich der unterschiedlichen Proteinmuster

Es sind zwei Gele von nicht-induzierten (1 und 3) und zwei Gele von mit 2 μ M Ponasteron für 18 Stunden induzierten Zellen (2 und 4) ausschnittsweise gezeigt. In den Gelen der induzierten Proben konnten 3 zusätzliche Spots detektiert werden.

3.4.2.4 Bestimmung der Nachweisgrenze von BSA bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Sypro Ruby

Die verwendete Silberfärbung ist äußerst sensitiv, aber zeitaufwendig und erschwert die massenspektrometrische Analyse der Proteinspots. Zur Detektion der Proteinspots auf den 2D-Gelen wurde daher als weitere Methode die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen etabliert. Für die Bestimmung der Proteinnachweisgrenze von Sypro Ruby Färbung wurden zunächst verschiedene Konzentrationen von BSA verwendet, um die Sensitivität dieser Methode zu überprüfen.

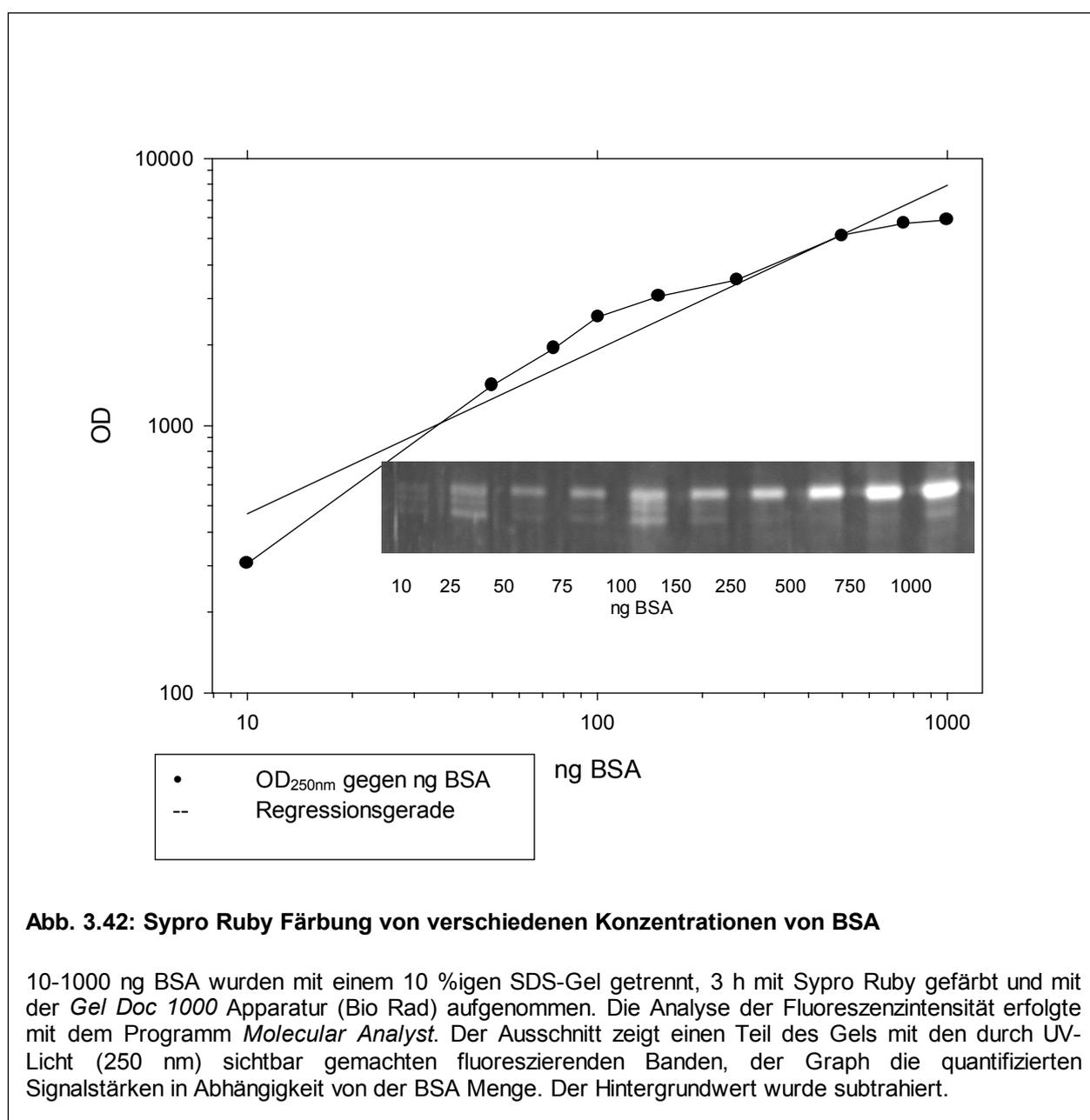


Abb. 3.42: Sypro Ruby Färbung von verschiedenen Konzentrationen von BSA

10-1000 ng BSA wurden mit einem 10 %igen SDS-Gel getrennt, 3 h mit Sypro Ruby gefärbt und mit der *Gel Doc 1000* Apparatur (Bio Rad) aufgenommen. Die Analyse der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem Programm *Molecular Analyst*. Der Ausschnitt zeigt einen Teil des Gels mit den durch UV-Licht (250 nm) sichtbar gemachten fluoreszierenden Banden, der Graph die quantifizierten Signalstärken in Abhängigkeit von der BSA Menge. Der Hintergrundwert wurde subtrahiert.

Die Nachweisgrenze der Färbung von BSA mit Sypro Ruby betrug 10 ng, die Färbung erwies sich in dem gesamten Bereich zwischen 10 und 800 ng als linear. Diese Untersuchungen zeigen, dass Sypro Ruby ähnlich sensitiv wie die Silberfärbung mit dem *Pharmacia Kit* ist und wegen der Linearität auch für die Färbung der 2D-Gele eingesetzt werden kann.

3.4.2.5 Trennung von Proteingemischen mittels 2D-Elektrophorese unter Verwendung von 18 cm Streifen und Detektion der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen

In weiteren Versuchen sollten die Unterschiede, die in Abb. 3.40 gezeigt wurden, reproduziert werden und eine andere Detektionsmethode angewendet werden mit dem Ziel, Proteine auszuschneiden und zu identifizieren. Dazu wurden mehrere 2D-Gele mit dem selben pH-Bereich von 3 bis 10 angefertigt und die Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby gefärbt. Mit diesem Farbstoff detektierte Proteinspots können mit massenspektrometrischen Methoden analysiert werden (T. Rabilloud, 2000; W. Patton, 2000). Beispielhaft für diese Versuche werden einige Ergebnisse gezeigt.

Die beiden Gele zeigen eine gute Trennung der Proteine, wobei Unterschiede im Proteinmuster festzustellen sind. In dem Gel der induzierten Probe können mehr Proteinspots detektiert werden. Im Gel der nicht-induzierten Probe gibt es zwischen pH7-8 einen Bereich, der sehr stark angefärbt wurde. Außerdem findet man dort einige Proteinspots, die sehr stark hervortreten. Auf dem Gel der induzierten Probe konnten mehr Spots detektiert werden. Das Proteinmuster ist beim Vergleich von markierten Spots aber gut vergleichbar.

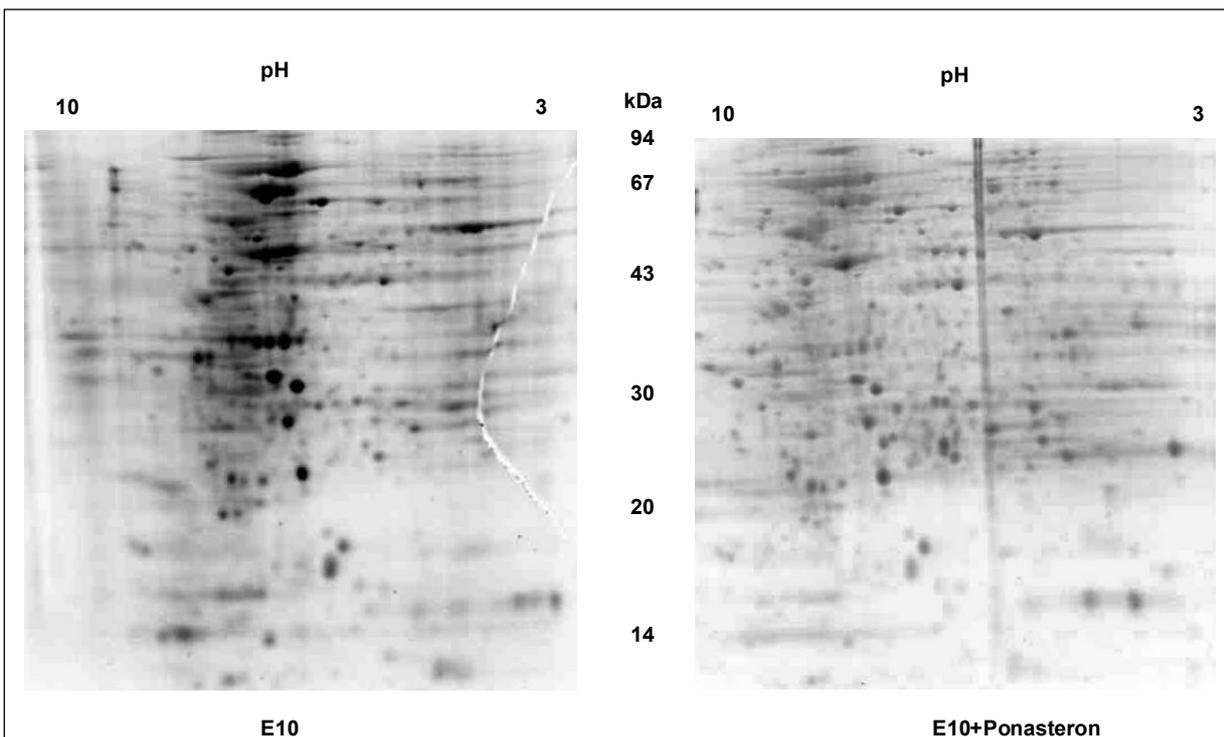


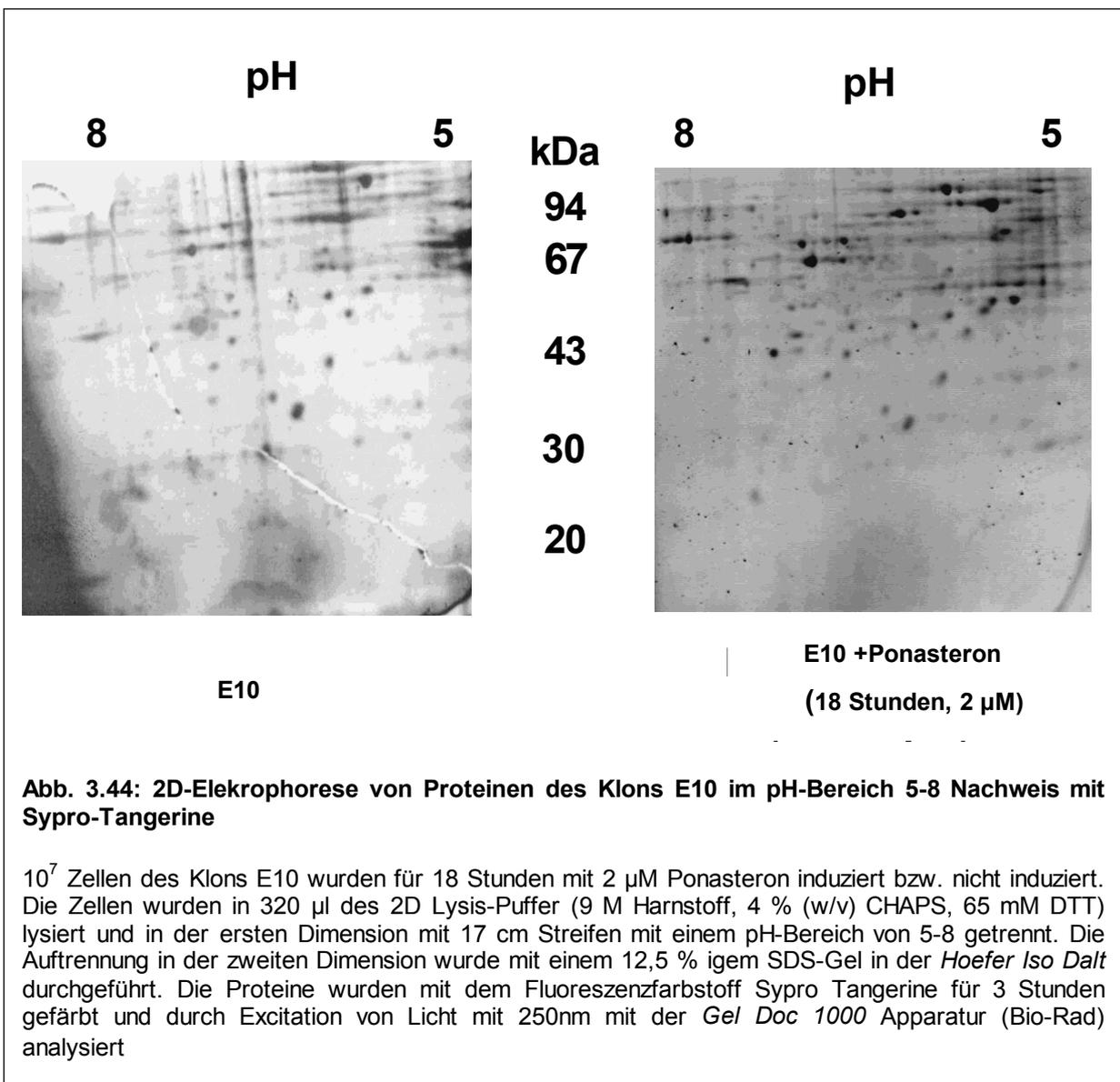
Abb. 3.43: 2D-Elektrophorese von Proteinen des Klons E10 im pH-Bereich 3-10 und Nachweis mit Sypro-Ruby

10^7 Zellen (entspricht ca. 1mg Protein) des Klons E10 wurden für 18 Stunden mit 2 μ M Ponasteron induziert bzw. nicht induziert. Die Zellen wurden in 350 μ l des 2D Lysis-Puffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 65 mM DTT) lysiert und in der ersten Dimension mit 18 cm Streifen mit einem pH-Bereich von 3-10 getrennt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde mit einem 12,5 % igem SDS-Gel in der *Hofer Iso Dalt* Kammer durchgeführt. Die Proteine wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby für 3 Stunden gefärbt und durch Excitation von Licht mit 250 nm mit der *Gel Doc 1000* Apparatur (Bio-Rad) analysiert. Die Intensität der Fluoreszenz wurde während der Aufnahme für einen Zeitraum von 2 Minuten integriert und in Graustufen umgewandelt dargestellt.

Allerdings konnten die Unterschiede der vorherigen Gelen (s. Abb. 3.40 und 3.41) nicht reproduziert werden. Die ammoniakalische Silberfärbung ist wesentlich sensitiver als die Anwendung der Fluoreszenz-Farbstoffe. Deshalb wurde versucht, den Bereich der unterschiedlichen Proteinspots – ca. pH 7- weiter aufzutrennen, indem Streifen mit kleineren pH-Bereichen verwendet wurden.

Als pH-Bereiche wurden einerseits Streifen mit einem Gradienten von pH 6 - 9, 6 - 11 (18 cm) und andererseits von 5 - 8 (17 cm) eingesetzt.

Die Trennung von Proteinen im basischen pH-Bereich (pH 6 - 9, bzw. 6 - 11) ist sehr schwierig, da oberhalb von pH 9 der Gradient leicht instabil wird und dann die Fokussierung nicht mehr stattfindet. Den Angaben des Herstellers nach verlängern sich die Fokussierungszeiten bei Verwendung der basischen Streifen auf ca. 100000 Vh. Es wurden verschiedene Fokussierungszeiten ausprobiert, aber auch die Fokussierung bei 200000 Vh war unzureichend und es konnten keine Gele mit einer ausreichenden Proteintrennung angefertigt werden.



Die Unterschiede im Proteinmuster (s. Abb. 3.40 und 3.41) konnten mit diesen Gelen (s. Abb. 3.44) nicht reproduziert werden, andere Unterschiede wurde zwischen induzierten und nicht-induzierten Proben auch nicht festgestellt.

Weiter wurden Gele in einem engeren pH-Bereich angefertigt, um die Auftrennung zu verbessern und möglicherweise andere Unterschiede zu finden. Es wurde der pH-Bereich 5,5-6,7 verwendet, da in diesem Bereich relativ viele Proteinspots erwartet werden.

Die Trennung der Proteinen wurde in dem pH-Bereich von 5,5-6,7 mit 18 cm Streifen durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby.

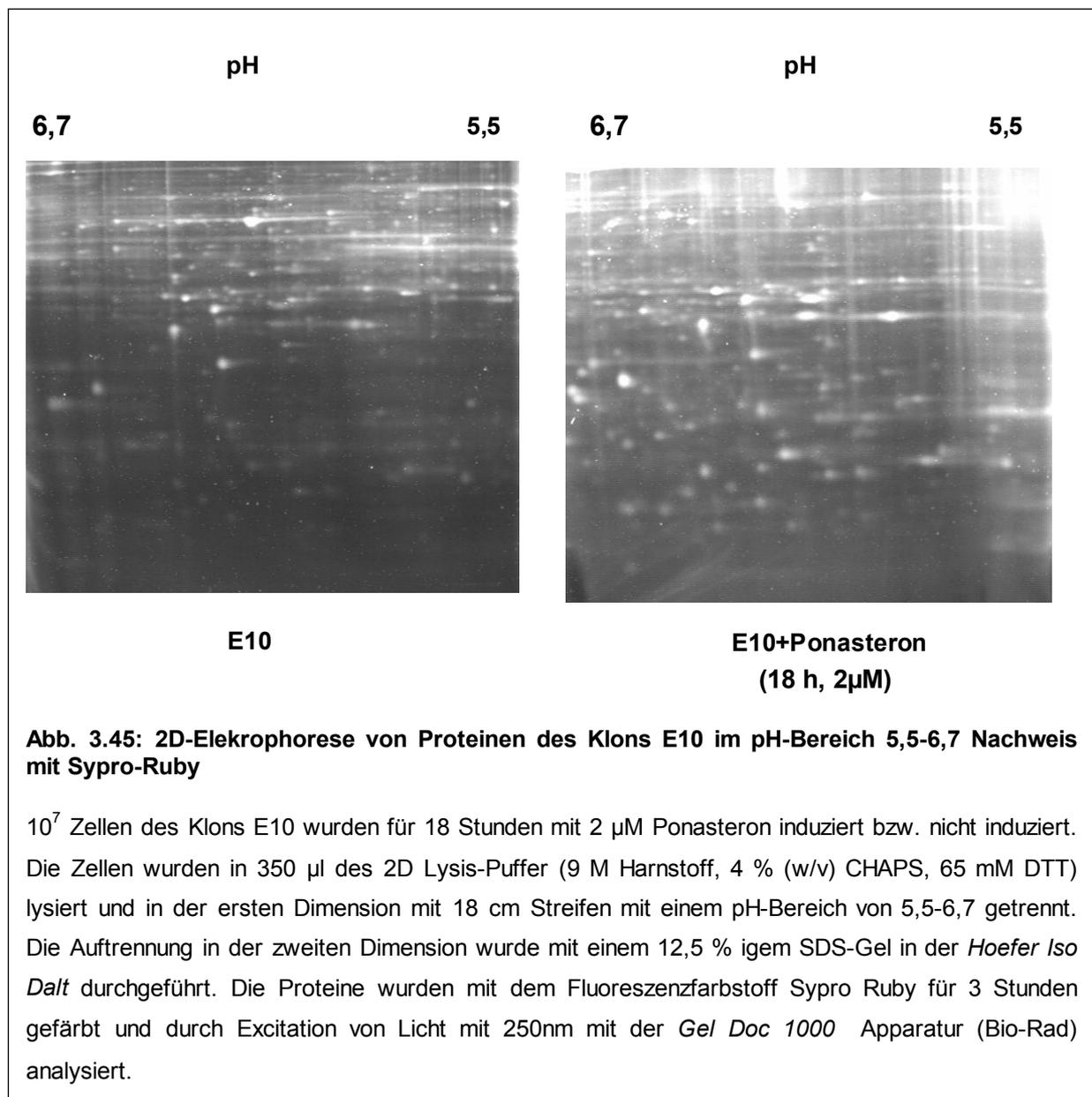


Abb. 3.45: 2D-Elektrophorese von Proteinen des Klons E10 im pH-Bereich 5,5-6,7 Nachweis mit Sypro-Ruby

10^7 Zellen des Klons E10 wurden für 18 Stunden mit 2 µM Ponasteron induziert bzw. nicht induziert. Die Zellen wurden in 350 µl des 2D Lysis-Puffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 65 mM DTT) lysiert und in der ersten Dimension mit 18 cm Streifen mit einem pH-Bereich von 5,5-6,7 getrennt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde mit einem 12,5 % igem SDS-Gel in der *Hoefler Iso Dalt* durchgeführt. Die Proteine wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby für 3 Stunden gefärbt und durch Excitation von Licht mit 250nm mit der *Gel Doc 1000* Apparatur (Bio-Rad) analysiert.

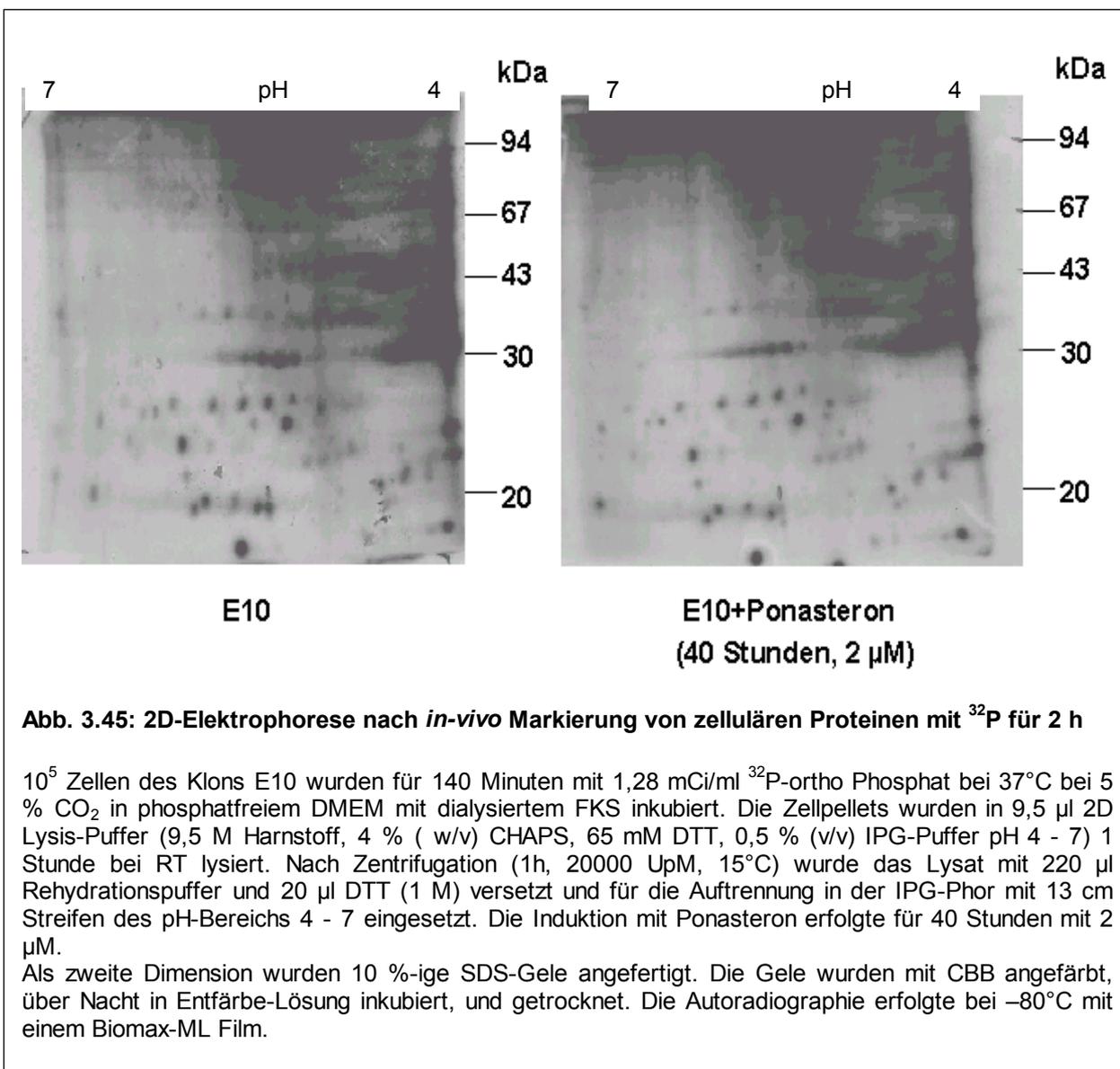
Die beiden Gelen der Abb. 3.45 von nicht-induzierten und induzierten Proben des Klons E10 zeigen ein vergleichbares Proteinmuster. Obwohl bei dem Gel der induzierten Probe im unteren Molekularbereich mehr und auch stärkere Proteinspots detektiert wurden. Aber das wiederholte Anfertigungen von Gele mit dem pH-Bereich 5,5 – 6,7 lieferte keine reproduzierbaren Unterschiede.

Die durchgeführten Proteomuntersuchungen (s. Abb 3.36 bis Abb. 3.45) zeigen, dass der Einfluß von GFP-MKK7_{3E} auf die Proteinexpression relativ gering sein muß, da im wesentlichen gleiche Proteinmuster gefunden wurden. Diese Schlussfolgerung betrifft im wesentlichen die mengenmäßig stärker exprimierten Proteine, die mit der angewendeten Nachweismethode detektierbar waren. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Silberfärbung (s. Abb. 3.40), dass möglicherweise im unteren Bereich dieser Nachweisgrenze Proteine MKK7_{3E} abhängig exprimiert werden.

3.4.3 2D-Elektrophorese nach *in-vivo* Markierung mit ³²P-ortho Phosphat oder ³⁵S-Methionin/Cystein

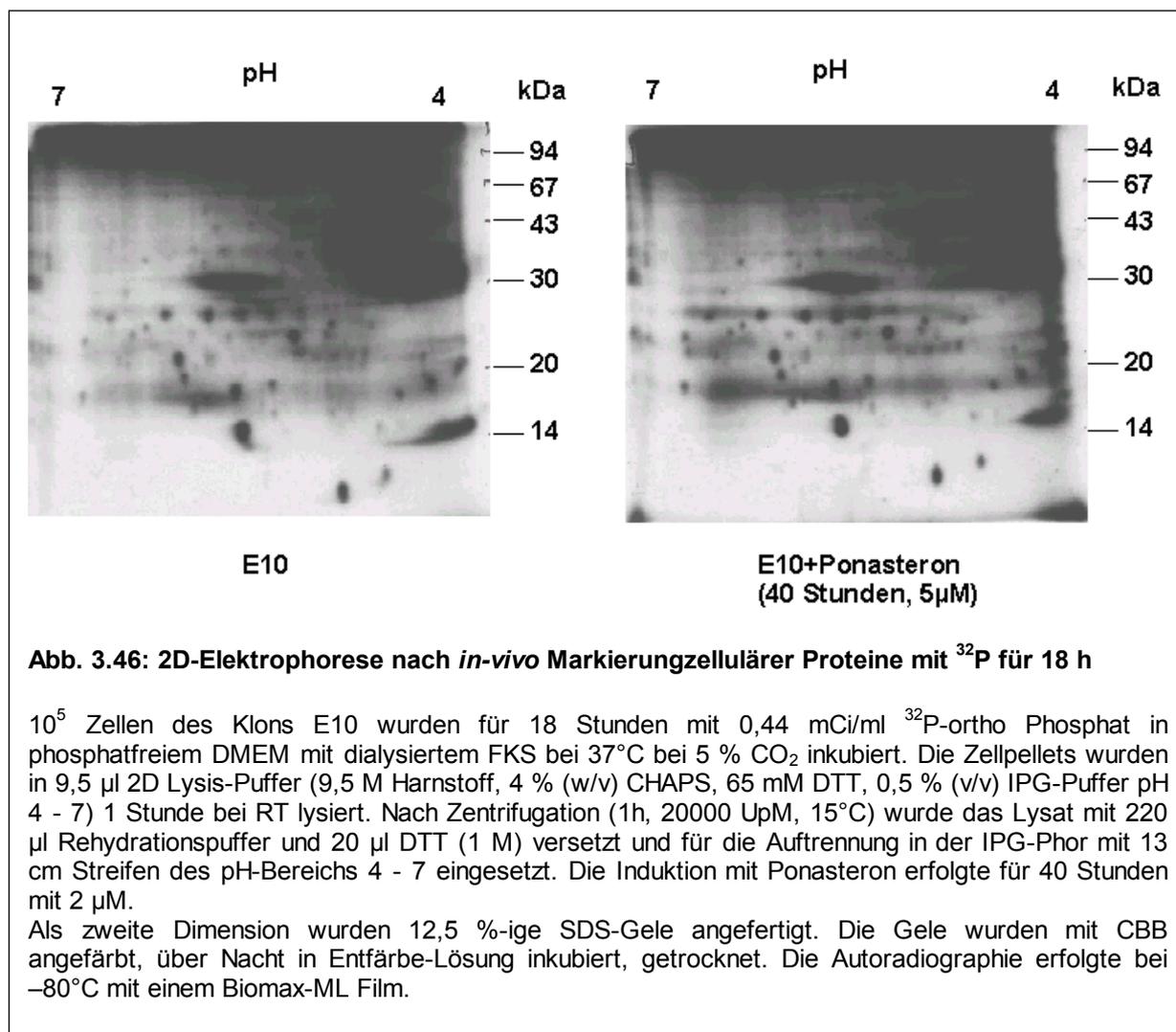
Um Unterschiede zwischen induzierten und nicht induzierten Lysaten des Klons E10 feststellen zu können, die durch MKK7_{3E} verursacht werden, wurden auch *in-vivo* Markierungsversuche von zellulären Proteinen mit ³²P und ³⁵S durchgeführt. So können einerseits MKK7_{3E} abhängige Modifikationen (Phosphorylierungen) und andererseits neu synthetisierte Proteine mit diesen sehr sensitiven Methoden detektiert werden. Die Proben wurden mit 13 und 17/18 cm Streifen mit verschiedenen pH-Gradienten in zweidimensionalen Gelen aufgetrennt.

3.4.3.1 *In-vivo* Markierung von Phosphoproteinen mit ^{32}P -ortho Phosphat



Auf beiden Gelen der Abb. 3.45 sind markierte Proteine im unteren Molekularbereich (bis ca. 40 kDa) zu erkennen. Die Trennung von größeren Molekülen ist durch die Schwärzung des Films schlecht zu beurteilen. Auf den Filmen findet man einige Proteine, die eine ähnliche molekulare Masse haben, sich aber in ihren pI Werten leicht unterscheiden. Das Muster an markierten Proteinen, die während der 120 Minuten neu synthetisiert und durch den Einbau von ^{32}P markiert wurden, ist auf beiden Gelen sehr ähnlich. Unterschiede ließen sich auf diesen Gelen und den anderen, die nach dieser Methode angefertigt wurden, nicht detektieren. Es wurden auch Lysate von Zellen, die für 18 Stunden mit Ponasteron induziert wurden, analysiert. Außerdem wurden unterschiedliche pH-Bereiche untersucht.

Die Markierung zellulärer Proteine mit ^{32}P wurde auch über einen längeren Zeitraum mit weniger Aktivität durchgeführt.



Die markierten Proteinspots sind im Vergleich zu den Gelen der Abb. 3.45 größer. Es ergibt sich aber ein ähnliches Muster an markierten Proteinen. Die Auftrennung im oberen Molekularbereich ist auf Grund der Schwärzung, die durch nicht eingebautes ^{32}P verursacht wurde, schwer zu interpretieren. Wie mit der kurzen ^{32}P Markierung ließen sich Unterschiede auf diesen Gelen und den anderen, die nach dieser Methode angefertigt wurden, nicht detektieren.

Zusammenfassend zeigt die zweidimensionale Analyse von radioaktiv markierten Phosphoproteinen keine eindeutig von MKK7_{3E} abhängigen Veränderungen, es konnte allerdings im Vergleich zu den Proteinanfärbungen mit Silber oder Sypro Ruby wesentlich weniger Spots detektiert werden. Dieses Ergebnis ließ sich auch durch Veränderung der Markierungsbedingungen (s. Abb. 3.46) nicht verbessern.

3.4.3.2 *In-vivo* Markierung von Proteinen mit ^{35}S -Methionin/Cystein

Induzierte bzw. nicht induzierte Zellen des stabil transfizierten Klons E10 wurden für 18 Stunden mit einem Gemisch von S-haltigen Aminosäuren (Methionin und Cystein), die mit ^{35}S markiert waren, inkubiert. Die neu synthetisierten, mit ^{35}S markierten Proteine wurden in 2D Elektrophoresen mit 17 cm Streifen des pH Bereichs 5 - 8 und 18 cm sowie mit Streifen des pH Bereichs 4 - 7 getrennt.

Mit ^{35}S konnten sehr viel mehr Proteine als mit ^{32}P markiert werden. Die Auftrennung ist im verwendeten pH-Bereich gelungen. Im oberen Molekularbereich können einzelne Proteinspots wegen der Schwärzung des Hintergrundes nur über einem Durchlichttisch erkannt werden. Das Proteinmuster von beiden Gelen ist weitestgehend identisch (s. Abb. 3.48).

Allerdings wurde in der Autoradiographie der nicht induzierten Probe ein Proteinspot, der in der Autoradiographie der induzierten Probe nicht vorhanden war, entdeckt. Dieser Spot wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Er befindet sich bei einem pH von ca. 4,5 und im Molekularbereich von ca. 35 kDa (s. Pfeil in der Autoradiographie).

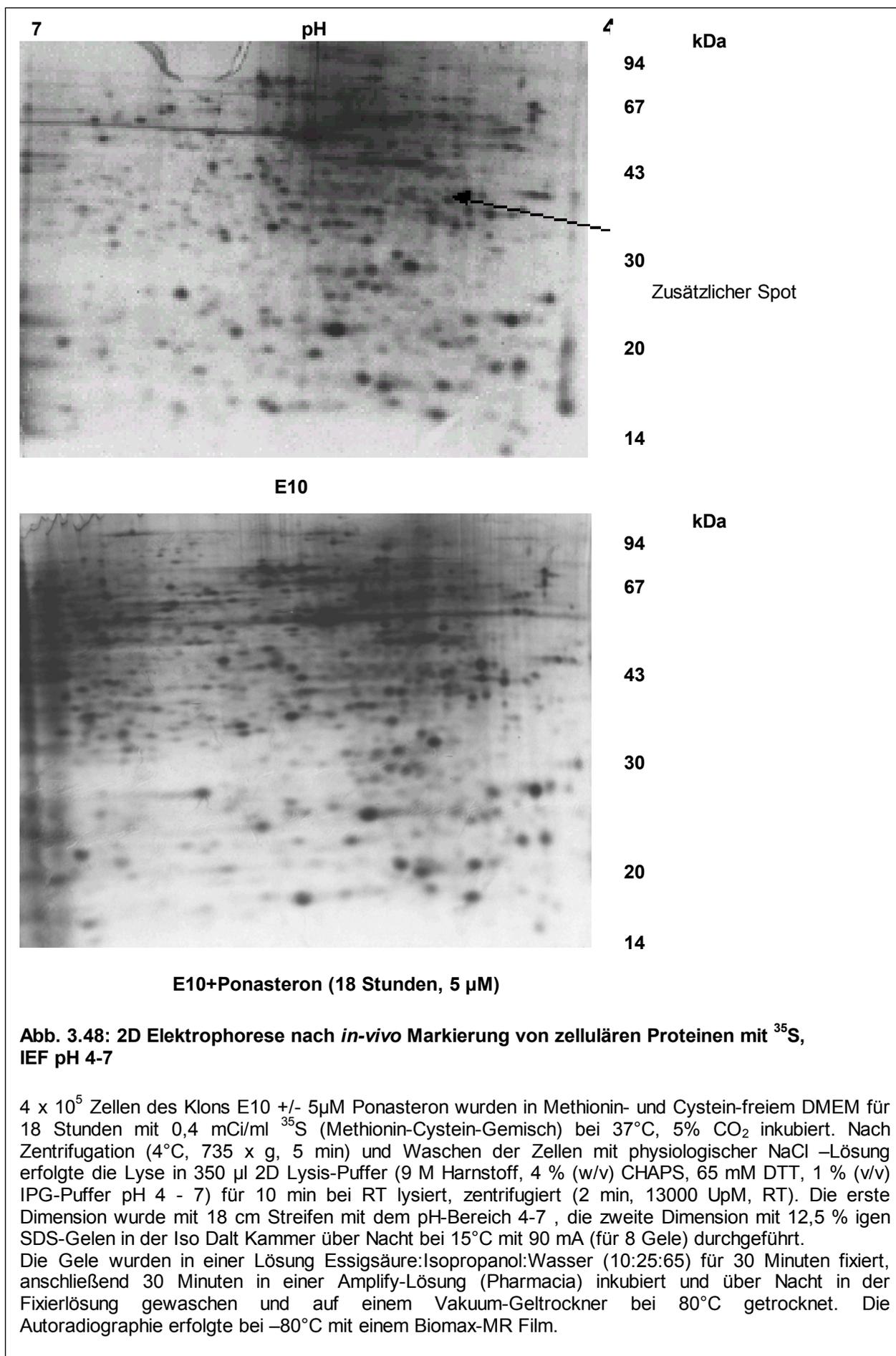
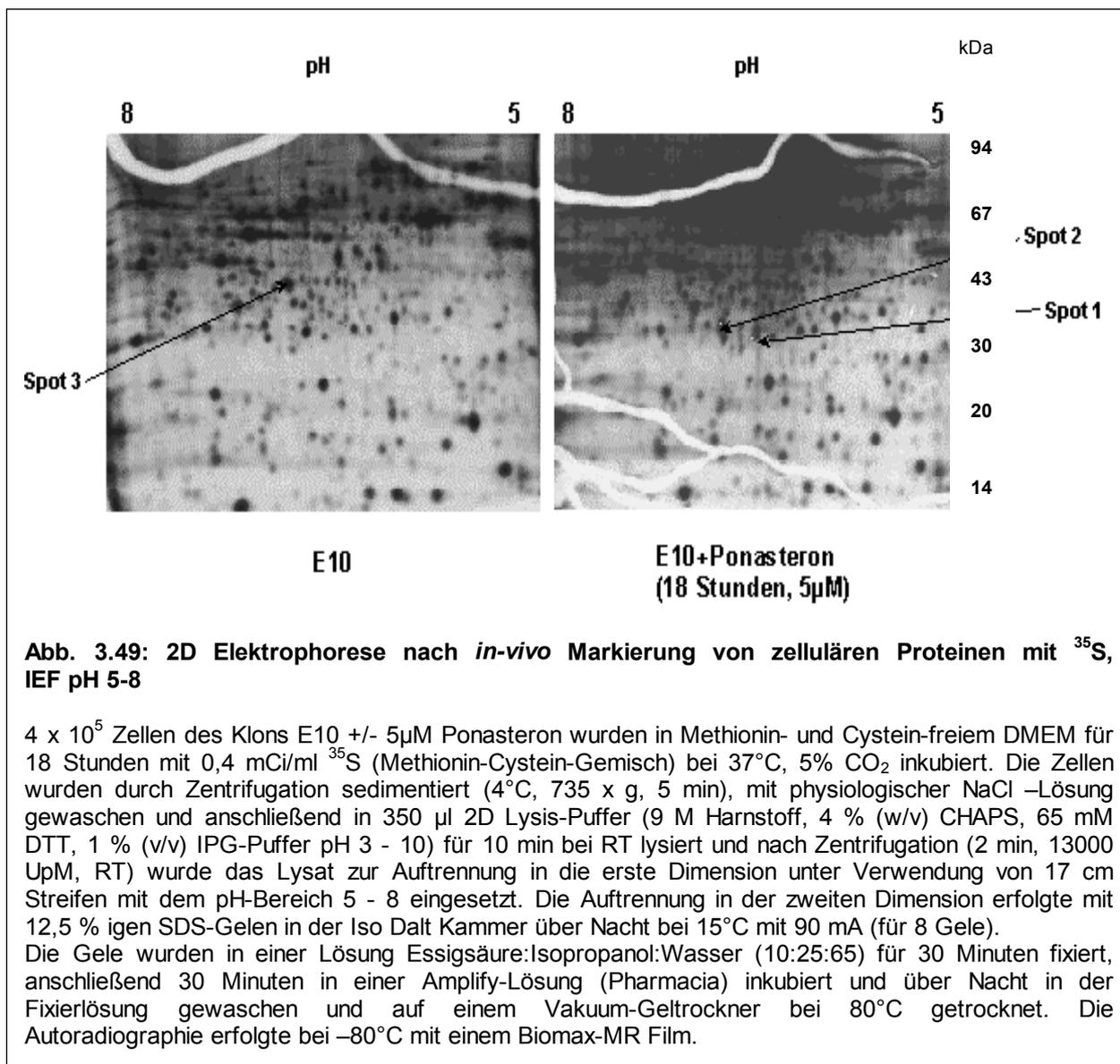


Abb. 3.48: 2D Elektrophorese nach *in-vivo* Markierung von zellulären Proteinen mit ^{35}S , IEF pH 4-7

4×10^5 Zellen des Klons E10 +/- 5µM Ponasteron wurden in Methionin- und Cystein-freiem DMEM für 18 Stunden mit 0,4 mCi/ml ^{35}S (Methionin-Cystein-Gemisch) bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 735 x g, 5 min) und Waschen der Zellen mit physiologischer NaCl -Lösung erfolgte die Lyse in 350 µl 2D Lysis-Puffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 65 mM DTT, 1 % (v/v) IPG-Puffer pH 4 - 7) für 10 min bei RT lysiert, zentrifugiert (2 min, 13000 UpM, RT). Die erste Dimension wurde mit 18 cm Streifen mit dem pH-Bereich 4-7, die zweite Dimension mit 12,5 % igen SDS-Gelen in der Iso Dalt Kammer über Nacht bei 15°C mit 90 mA (für 8 Gele) durchgeführt.

Die Gele wurden in einer Lösung Essigsäure:Isopropanol:Wasser (10:25:65) für 30 Minuten fixiert, anschließend 30 Minuten in einer Amplify-Lösung (Pharmacia) inkubiert und über Nacht in der Fixierlösung gewaschen und auf einem Vakuum-Geltrockner bei 80°C getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C mit einem Biomax-MR Film.



Die beiden Gele zeigen im gesamten Molekularbereich und in dem pH-Bereich von 5-8 eine gute Auftrennung der Proteine. Das Proteinmuster der beiden Gele ist fast identisch, bis auf 2 zusätzliche Proteinspots in dem Gel der induzierten Probe: Spot 1 bei einem pH-Wert von ca. 6,5 und einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Der Spot 2 befindet sich im etwas höheren pH-Bereich und das Protein hat ein etwas niedrigeres Molekulargewicht. Weiter wurde ein zusätzlicher Proteinspot in dem Gel der nicht induzierten Probe gefunden. Dieser Spot 3 befindet sich im gleichen pH-Bereich wie der Spot 1, aber das Protein hat ein größeres Molekulargewicht. Die Spots wurden aus den getrockneten Gelen ausgeschnitten und durch erneute Autoradiographie wurde überprüft, dass der richtige Spot entfernt wurde.

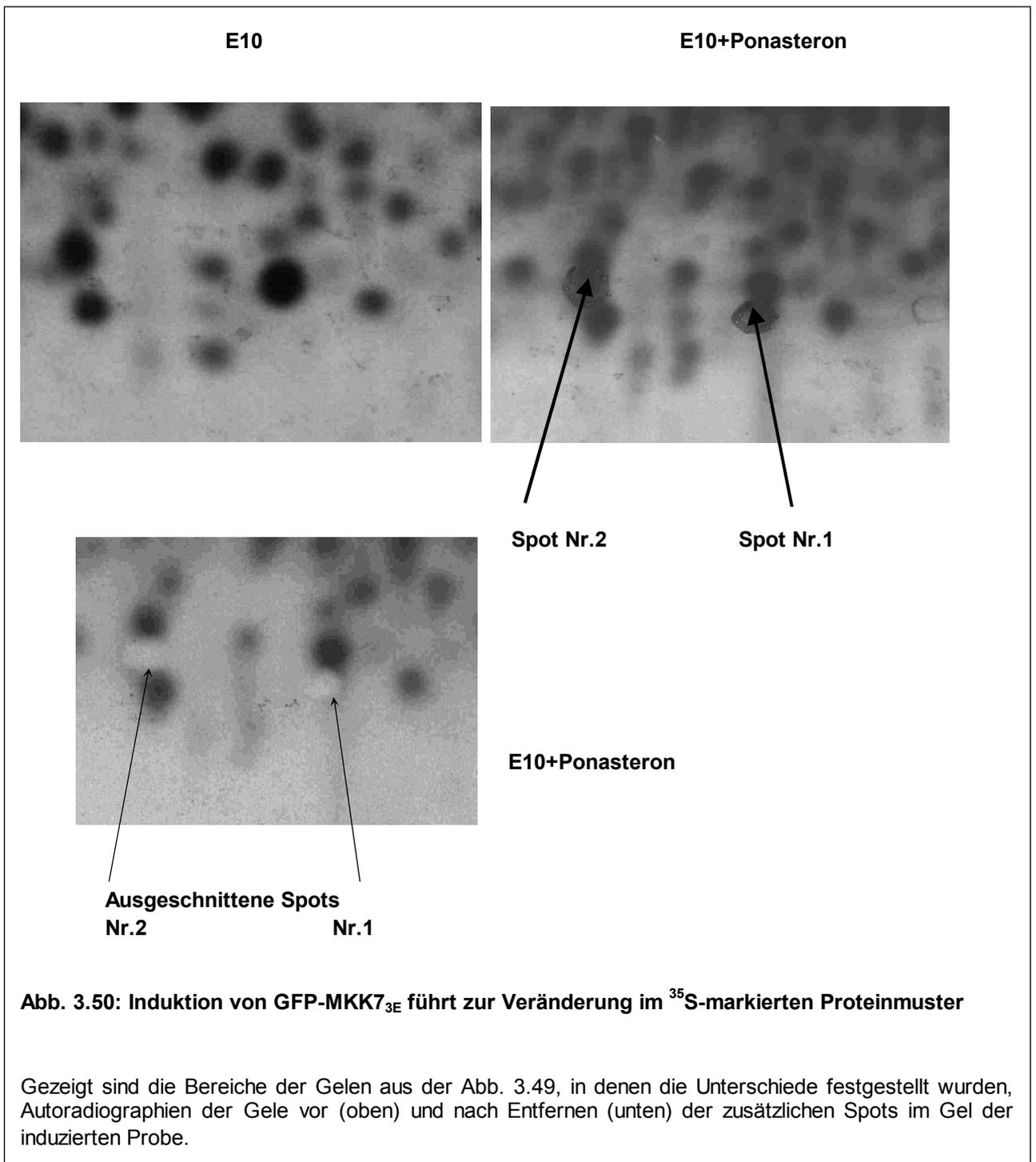
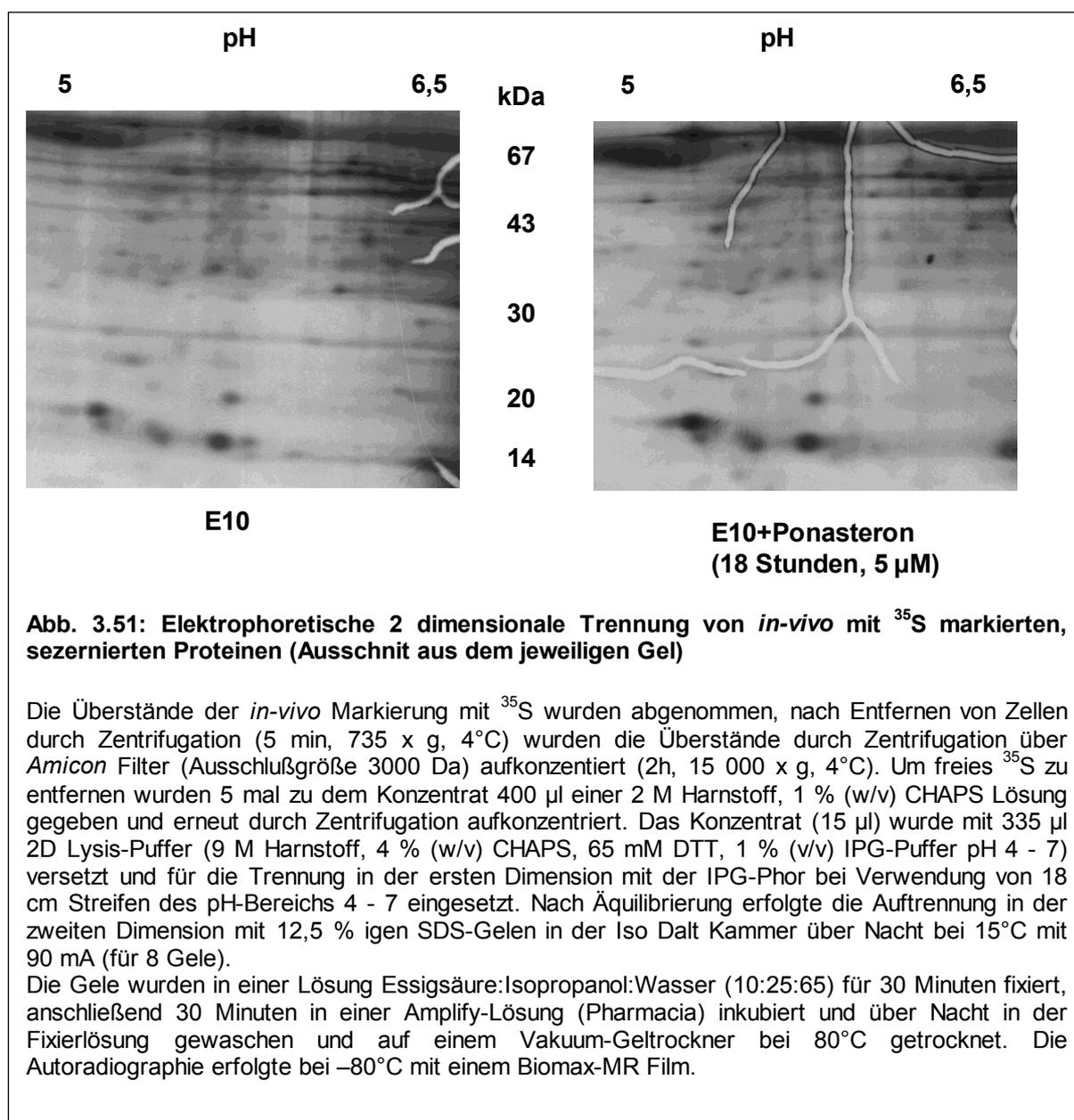


Abb. 3.50: Induktion von GFP-MKK7_{3E} führt zur Veränderung im ³⁵S-markierten Proteinmuster

Gezeigt sind die Bereiche der Gelen aus der Abb. 3.49, in denen die Unterschiede festgestellt wurden, Autoradiographien der Gele vor (oben) und nach Entfernen (unten) der zusätzlichen Spots im Gel der induzierten Probe.

3.4.3.3 2D Elektrophorese von mit ^{35}S markierten sezernierten Proteinen

Da die Auftrennung von Proteingemischen aus Ganzzellextrakten sehr komplexe 2D Proteinmuster ergab (s. Abb. 3.35 – 3.48) und nur geringe Unterschiede zwischen den Gelen vor und nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} festgestellt wurden, sollten zusätzlich die von der Zellen abgegebenen Proteine analysiert werden, da z.B. Cytokine als Botensubstanzen zwischen den Zellen fungieren. Für diese Analyse wurden Überstände der Zellen nach der Markierung ^{35}S verwendet.



Sezernierte Proteine erkennt man auf beiden Gelausschnitten überwiegend im unteren Molekularbereich bei 14 – 20 kDa im pH-Bereich von 5 - 6. Diese Proteinspots nach Induktion von MKK7_{3E} sind stärker als die auf dem Gel der nicht induzierten Probe. Weiter erkennt man auf beiden Gelen zahlreiche, aber schwache Spots im Molekularbereich von 30 - 40 kDa. Unterschiede in diesem Bereich zu detektieren ist nicht möglich, da die Fokussierung der Proteine nicht ausreichend ist. Dies kann an mitgeschleppten Ionen des Mediums liegen. Es wurden wesentlich weniger sezernierte, markierte Proteine detektiert als bei den Gelen der Ganzzelllysate.

4 DISKUSSION

MKK7 wurde 1997 zeitgleich von verschiedenen Gruppen als bisher letztes Mitglied der MAPKK Familie in Säugerzellen identifiziert (Wu *et al.*; Lu *et al.*; Tournier *et al.*, 1997; Lawler *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 1997; Moriguchi *et al.*, 1997). MKK7 ist der einzige intrazelluläre spezifische Aktivator des JNK Signalweges, da es nach übereinstimmenden Beobachtungen weder den ERK noch den p38 MAPK Signalweg aktiviert, noch andere Signalwege wie NF κ B oder ERK5 beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein System etabliert werden, um die Funktion von MKK7 in intakten humanen Zellen untersuchen zu können. Ziel dieser Experimente war zunächst die intrazelluläre Aktivierung MKK7-abhängiger Signalwege durch kontrollierte Expression geeigneter MKK7 Mutanten. Da der von MKK7 aktivierte JNK Signalweg wesentlich die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert, wurde anschließend versucht, mit verschiedenen Methoden von MKK7 abhängige Gene zu identifizieren.

Die Ausgangsplasmide, die von P. Holland zur Verfügung gestellt wurden, beinhalteten an sechs MYC-Epitope fusionierte MKK7-Konstrukte. Für die Etablierung von stabilen Zelllinien wurde MKK7 an GFP fusioniert, da die durch UV-Licht anregbare Grünfluoreszenz des GFP Anteils für das Identifizieren positiver Zellklone mittels Fluoreszenzmikroskop in lebenden Zellen verwendet werden sollte. Ohne GFP-Epitop hätten alle Zellklone sehr arbeitsintensiv mittels Western-Blot analysiert werden müssen. Außerdem ermöglicht GFP die Beurteilung der Expression von GFP-MKK7 auf Einzelzellniveau.

Durch die Fusion von MKK7, das eine molare Masse von etwa 48 kDa hat, an GFP entsteht ein Fusionsprotein von ca. 75 – 80 kDa, wodurch das Protein im Vergleich zu MYC₆-MKK7 um ca. 10 kDa größer wird. Generell ist schon bei vielen Proteinen - so auch für Moleküle aus den MAP Kinase Signalwegen - beschrieben worden, dass eine Fusion mit GFP vereinbar mit ihren biologischen Funktionen ist (Engel *et al.*, 1998; Ben-Levy *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999; Holtmann *et al.*, 2000).

Um aber sicherzustellen, dass die Funktion von MKK7 fusioniert an GFP in intakten Zellen nicht beeinflusst wird, wurden GFP-MKK7 und MYC-MKK7 transient mit vergleichbaren Expressionsstärken exprimiert und ihre Aktivität verglichen. Dabei wurde die Aktivität von MKK7 in intakten Zellen anhand der Aktivierung endogener

oder koexprimierter JNKs bestimmt. Für diese Versuche wurden neben MKK7 Wildtyp auch die konstitutiv aktiven und inaktiven Mutanten von MKK7 eingesetzt. Zusammenfassend wurde in diesen Experimenten eine Beeinflussung der Kinaseaktivität von MKK7 durch Fusion mit GFP nicht festgestellt (s. Kapitel 3.1.2.2). Um die Funktion eines Proteins zu untersuchen, wird dieses häufig in Transfektionsexperimenten durch Gentransfer der cDNA in intakten Zellen überexprimiert. Dabei kann die Expression des Proteins konstitutiv oder regulierbar erfolgen.

Ein ideales induzierbares Expressionssystem muß verschiedene Bedingungen erfüllen. Es sollte eine niedrige bzw. keine basale Expression erfolgen und die induzierende Substanz oder das induzierende Protein sollte inert für den Metabolismus der verwendeten Zelle sein, damit die beobachteten Effekte nur auf das interessierende Genprodukt zurückgeführt werden können. Weiterhin sollte eine schnelle Expression des Genprodukts stattfinden und nach Entfernen des Induktors die Expression wieder eingestellt werden.

Verschiedene induzierbare Expressionssysteme sind etabliert, die mit Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktosid (IPTG), Tetrazyklin (Tet) oder dem in dieser Arbeit verwendeten Ekdyson als Induktor funktionieren. Bei den ersten beide Systemen wurde der jeweils verwendete Mechanismus von Bakterien, beim letzteren von *Drosophila* abgeleitet. Beim IPTG System basiert die regulierbare Genexpression auf dem Prinzip der Regulation des *lac*-Operons in Prokaryoten (Jacob *et al.*, 1961). Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG. Verwendet wurde dieses System unter anderem für die Untersuchung der signal-abhängigen Induktion von Cyclooxygenase-2 in NIH 3T3 Zellen, die stabil mit einer trunkierten, konstitutiv aktiven Form von MEKK1 transfiziert waren (Guan *et al.*, 1998) oder bei der Untersuchung der Aktivierung von MKK4 durch MEKK1 (Woodgett *et al.*, 1995).

Die Regulation der Genexpression über Tetrazyklin erfolgt durch Verwendung eines Tetrazyklin abhängigen bakteriellen Repressors (Gossen *et al.*, 1992). Die Expression des Repressorproteins erfolgt durch ein Regulatorgen, das über einen konstitutiv aktiven Promotor kontrolliert wird. Außerdem ist eine für die Bindung des Repressors notwendige Operatorsequenz direkt vor den Promotor des zu regulierenden Gens geschaltet. Bei dem sogenannten „*Tet off*“ System bindet in Anwesenheit von Tetrazyklin der Repressor an die Operatorsequenz und verhindert damit die Expression. Die Induktion erfolgt durch Entfernen des Antibiotikums, da der

Repressor ohne Tetrazyklin keine Affinität zur Operatorsequenz mehr hat. Der Promotor ist dadurch frei und die Expression kann stattfinden. Dieses System wurde z.B. für die Untersuchung der Regulation der IL-8 mRNA durch Streßsignalwege in HeLa Zellen eingesetzt (Holtmann *et al.*, 1999) und bei der Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Mutanten von MEK1 und MEKK1 auf MAP Kinase Signalwege in 3T3 Zellen (Johnson *et al.*, 1996; Syu *et al.*, 1997). Bei dem „Tet on“ System wird ein durch Mutagenese veränderter Tetrazyklinrepressor verwendet, der als induzierbarer Aktivator fungiert. Der Repressor bindet ohne Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin an die Operatorsequenz. Die Genaktivität wird in Abwesenheit von Tetrazyklin oder Doxyzyklin unterdrückt. Die Behandlung mit Antibiotikum inaktiviert den Repressor und induziert die Genexpression. Eine ständige Behandlung der Zellen mit Antibiotikum ist bei diesem System nicht notwendig (Gossen *et al.*, 1995).

Das in dieser Arbeit verwendete Ekdyson-induzierbare Expressionssystem basiert teilweise auf einem Regulationssystem von Insekten, wobei Steroidrezeptoren Verwendung finden. Das Ekdyson-induzierbare Expressionssystem wurde 1996 von No *et al.* beschrieben und in Säugerzellen und transgenen Mäusen angewendet. Inzwischen haben eine Reihe von weiteren Arbeitsgruppen dieses Expressionssystem verwendet, z.B. bei der Untersuchung des humanen L-Glutamat Transporters (Dunlop *et al.*, 1999) und des humanen Dopamin D2L Rezeptors in HEK293 Zellen (Choi *et al.*, 2000). In NIH 3T3 Zellen wurde das Expressionssystem für die Untersuchungen an PTEN, einem Tumor Suppressor Gen, eingesetzt. Dazu wurden an GFP fusionierte sowie antisense cDNAs von PTEN exprimiert (Tamura *et al.*, 1998).

Da die in dieser Arbeit verwendete GFP-MKK7 Proteine regulierbar überexprimiert werden sollten, musste eine Entscheidung für eines der drei oben erwähnten Systeme getroffen werden. Gegen das IPTG System sprach vor allem die Induktion mit einer osmotisch wirksamen Zuckerlösung, weil dadurch potentiell die stressaktivierten MAP Kinasen wie JNK und p38 aktiviert werden könnten. Außerdem hatten Versuche von Andrea Krause aus der Arbeitsgruppe Kracht in KB Zellen gezeigt, dass dieses System eine hohe basale Aktivität besitzt.

Für das zum Beginn der Arbeit neue Ekdyson System sprach die Verwendbarkeit in transgenen Tiermodellen, d.h. die geringe *in-vivo* Toxizität, vor allem aber die in der Originalarbeit (No *et al.*, 1996) beschriebene bessere Regulation, d.h. geringere

basale Expression und bessere Induzierbarkeit im direkten Vergleich gegenüber Versuchen mit den beiden „Tet“ Systemen.

Die Etablierung des Ekdyson-induzierbaren Expressionssystems erfolgte zunächst mit Hilfe von Reporter genen. Unter transienten Transfektionsbedingungen konnte eine Ekdyson-abhängige regulierbare Expression von β -Galactosidase sowohl photometrisch in Zelllysaten als auch histochemisch in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Die Versuche zeigten, dass sowohl die kommerziell erworbene HEK293 Ausgangszelllinie, EcR-293, als auch die selbst hergestellten HEK293 „Mutterzelllinien“ funktionelle RXR und Ekdyson Rezeptoren exprimierten. Die Überexpression des Steroidrezeptors RxR α , einem Teil des Ekdyson Rezeptor Dimers, konnte in den verwendeten Zellen mittels Western-Blot nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7). Die für die regulierbare Genexpression geforderte Spezifität sollte durch Bildung von RxR α /EcR Heterodimeren, der Verwendung von Drosophila Steroiden und spezifischen DNA Sequenzen gewährleistet werden (No *et al.*, 1996). Mit allen Expressionsplasmiden des Systems transfizierte, aber ohne Muristeron induzierte Zellen zeigten ebenso wie die nicht transfizierten Zellen keine basale β -Galactosidase Reporter gen Aktivität (s. Abb. 3.8). Diese initialen, sowie alle weiteren im Laufe der Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigten, dass mit dem Ekdyson System ohne Induktion keine wesentliche Proteinexpression stattfindet (s. Kapitel 3.2.2).

Zur Induktion wurden die synthetischen Ekdyson Analoga Muristeron und Ponasteron eingesetzt. Beide Substanzen waren in ihrer Dosis-Wirkungskurve vergleichbar (s. Abb. 3.11 und 3.12).

Da das Ekdysonsystem unter transienten Transfektionsbedingungen die Bedingungen für ein gutes regulierbares Expressionssystem mit guter Induzierbarkeit und wenig spontaner Promotoraktivität erfüllte, wurden stabil transfizierte Zelllinien generiert, um die regulierbare Expression von GFP-MKK7 cDNAs zu ermöglichen. Zunächst wurden transfizierte Zellen selektiert und dann induziert. Die durch Fluoreszenzanalyse positiv erscheinenden Zellklone wurden expandiert und die GFP-MKK7 Fusionsproteine mit anti-GFP Antikörpern in Lysaten nachgewiesen. Es konnte nur in einem Teil der grünfluoreszierenden Zellen auch das Fusionsprotein nachgewiesen werden (s. Tabelle 3 zur Statistik der ersten Einzelzellklonierung). Bei der Mutante MKK7_{K149M} konnte kein positiver Klon identifiziert werden. Weiter fiel sowohl mikroskopisch eine schwächere Grünfluoreszenz als auch in Western-Blots

eine geringere Proteinexpression der stabilen Klone im Vergleich zu transient transfizierten Zellen auf. Bei Zellklonen, die eine starke Grünfluoreszenz zeigten, wurde ein großer Anteil an freiem GFP nachgewiesen (s. Abb. 3.9, A, Klon E22). Die im Verhältnis zur transienten Transfektion bei stabilen Klonen geringere Proteinexpression lässt sich mit der geringeren Kopienzahl an stabil integrierten GFP-MKK7 cDNAs erklären.

Die Verfügbarkeit eines polyklonalen anti-MKK7 Antikörper erlaubte in weiteren Western-Blot Experimenten die Detektion und den Vergleich der Expression sowohl des endogenen als auch des überexprimierten MKK7. Neben dem Anstieg der Expression des Fusionsproteins GFP-MKK7 wurde in einigen Experimenten auch die Zunahme der Proteinbande auf Höhe der endogenem MKK7 festgestellt (s. Abb. 3.12, B). Eine Erklärung für diese Zunahme ist, dass durch Spaltung von GFP-MKK7, die bei der Analyse derselben Membran mit dem anti-GFP Antikörper nach 16 h Induktion zu erkennen ist (s. Abb. 3.12, A), überexprimiertes MKK7 ohne GFP-Teil auf der gleichen Höhe wie endogenes MKK7 detektiert wird und freies GFP entsteht, dass auf dem Western-Blot sichtbar wird. Weiter ist aus diesen Analysen ersichtlich, dass nach Induktion keine starke Überexpression von GFP-MKK7 erreicht werden kann und endogenes und überexprimiertes Protein in vergleichbaren Anteilen vorliegen. Dies ist für die spätere Interpretationen der Versuchsergebnisse, die mit der aktiven Mutante von MKK7, GFP-MKK7_{3E}, erzielt wurden, wichtig.

Die Versuche zur Zeitabhängigkeit der Proteinexpression nach Induktion mit Muristeron zeigten, dass bereits nach 4 h die Fusionsproteine nachgewiesen werden konnten und ihre Menge linear über die Zeit zunahm, bis nach ca. 20 Stunden keine weitere Erhöhung mehr nachweisbar war. Aus den Versuchen zur Induktionskinetik konnten die geeigneten Parameter für die Induktionsdauer und die Konzentration der induzierenden Substanz bestimmt werden. So wurden in allen folgenden Experimenten die Zellen mindestens für 18 Stunden mit 2 µM Ponasteron bzw. Muristeron induziert.

Die ersten stabilen Zellklone, die zunächst für die Versuche ausgewählt wurden, wurden regelmäßig durch Fluoreszenzanalyse überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die Klone über einen längeren Zeitraum keine stabile Proteinexpression zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die zuerst generierten Zellklone erneut einzellkloniert und mittels Fluoreszenzanalyse Klone ausgewählt, bei denen alle

Zellen fluoreszierten. Der Klon E10, der für die Proteomanalytik verwendet wurde, wurde außerdem noch mittels FACS-Analyse auf Einzelzellebene sortiert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die stabile Integration aller für die Verwendung des Ekdyson Systems notwendigen Gene, wie Neomycin-phospho-Transferase, des p14 kodierenden *ble* Genes für die Zeozin-Resistenz, RxR α , VgEcR/VP16 und der GFP-MKK7 cDNAs inklusive der Ekdyson-responsiven Promoter Elemente in einer Reihe von Zelllinien erfolgreich war. In ausführlichen Experimenten wurde eine zeit- und dosisabhängige Expression der GFP-MKK7 Fusionsproteine festgestellt, deren Kinetik und Induzierbarkeit mit der des „Tet“-Systems vergleichbar ist (Gossen und Bujard, 1992) und mit insgesamt recht wenigen bisher publizierten Befunden zum Ekdyson Expressionssystem übereinstimmt (No *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2000). Versuche zum Abschalten des Systems ergaben, dass bereits nach einem Tag ohne induzierendes Agens nur noch eine geringe Menge des Proteins nachweisbar ist (s. Abb. 3.13). Einer mit verschiedenen Methoden nachgewiesenen sehr niedrigen basalen Expression steht allerdings eine im Vergleich zu viralen Promotoren (CMV, SV-40) relativ geringe Expressionsstärke nach Aktivierung des Promoters gegenüber (s. Abb. 3.3).

Das Ekdysonsystem war damit vor allem für die Expression konstitutiv aktiver Formen von MKK7 geeignet.

MKK7 ist ein spezifischer JNK-Aktivator (Wu *et al.*, 1997; Lawler *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 1997; Moriguchi *et al.*, 1997). So wurde auch in dieser Arbeit nach Induktion von MKK7 keine Aktivierung des ERK2 Signalweges oder des p38 MAPK Signalweges festgestellt (s. Abb. 3.31 und 3.32).

Es wurden Zelllinien hergestellt, die entweder den GFP-MKK7 Wildtyp, die aktive Mutante GFP-MKK7_{3E} oder eine der beiden inaktiven Mutanten GFP-MKK7_{3A} und GFP-MKK7_{K149M} Ekdyson-regulierbar exprimierten. Diese verschiedenen stabil transfizierten Zelllinien wurden mit einer Reihe unterschiedlicher extrazellulärer Stimuli wie IL-1 α , TNF α , EGF, Sorbitol, Anisomycin und Arsenit behandelt und der Einfluß der GFP-MKK7 Expression auf die JNK-Aktivierung untersucht.

Die Versuche mit IL-1 α und TNF zeigten, dass die verwendeten Zellen HEK293 nicht IL-1 α - und nur schwach TNF-responsiv sind. Deshalb hätten für Versuche zur Rolle von MKK7 bei der Signaltransduktion dieser Stimuli IL-1 oder TNF Rezeptor überexprimierende HEK293 Zellen verwendet werden müssen (Cao *et al.*, 1996). Als

stärkster extrazellulärer JNK Stimulus erwies sich Sorbitol sowie die Zellgifte Anisomycin und Arsenit.

Versuche, die mit potentiell dominant-negativen Mutanten von MKK7, GFP-MKK7_{3A} oder GFP-MKK7_{K149M} bei der Sorbitol-induzierten JNK Aktivierung durchgeführt wurden, zeigten widersprüchliche Ergebnisse. So konnte durch Induktion von MKK7_{3A} die Sorbitol-induzierte JNK-Aktivierung im Klon A5 verringert werden, im Klon A15 wurde dagegen auch nach Induktion eine stärkere JNK-Aktivierung detektiert (s. Abb. 3.30). Ähnlich konnte nach Induktion von GFP-MKK7_{K149M} in den Klonen K42 und K56 die Sorbitol-induzierte JNK-Aktivierung verringert werden (s. Abb. 3.29 und 3.30), aber nicht in dem Klon K23 (s. Abb. 3.30). Diese Versuche zeigten eine klonale Heterogenität in den hergestellten Zelllinien. Weiterhin hätten diese MKK7-Mutanten nur sinnvoll zur Hemmung Sorbitol-induzierter zellulärer Effekte eingesetzt werden können. Da Sorbitol aber auch noch über MKK4 JNKs und als weiteren Streßkinaseweg p38 MAP Kinase aktiviert (Han und Ulevitch, 1994; Raingeaud *et al.*, 1995), waren signifikante Effekte dieser Mutanten eher unwahrscheinlich. Deshalb wurden diese Zelllinien keinen weiteren funktionellen Untersuchungen unterzogen.

Die in dieser Arbeit zusammengefassten Versuche zeigen übereinstimmend, dass durch MKK7_{3E} in mehreren Klonen, E4, E6 und E10, eine endogene JNK-Aktivierung, die mit *in-vitro* Kinase Versuchen nachgewiesen wurde, erreicht werden konnte (Kapitel 3.3.1 – 3.3.4). Dieses traf sowohl im Vergleich zu der basalen JNK Aktivität der Zellen desselben Klons im nicht induzierten Zustand zu, wie auch im Vergleich mit Zellen, in denen GFP-MKK7_{3A} induziert worden war (s. Abb. 3.24, 3.26 und 3.27). Weiterhin verstärkte GFP-MKK7_{3E} die Sorbitol-induzierte JNK-Aktivierung sowohl in intakten Zellen (s. Abb. 3.20) als auch nach partieller Aufreinigung von MKK7 (s. Abb. 3.27) *in-vitro* leicht, während die GFP-MKK7_{3A} Mutante dieses nicht bewirkte (s. Abb. 3.27).

Die durch MKK7_{3E} Induktion erzielbare JNK-Aktivierung war in den meisten Experimenten aber schwächer als die durch extrazelluläre Stimuli, wie z.B. durch Sorbitol, erreichbare (s. Abb. 3.18 - 3.23). Dieses kann dadurch erklärt werden, dass Sorbitol beide JNK Aktivatoren, sowohl MKK4 als auch MKK7 aktiviert. Alternativ führen die in MKK7_{3E} eingeführten Punktmutationen nur zu einer partiellen Aktivierung von MKK7, die nicht so hoch ist wie die durch die Phosphorylierung des nativen MKK7 erreichbare. Letztere Hypothese ist experimentell nur schwer zu überprüfen.

Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen hatten vorher gezeigt, dass auch in MKK7 die Substitution der in allen MAPKK konservierten phosphorylierbaren Aminosäuren durch negativ geladene Aminosäuren zur Aktivierung des Enzyms in transienten Transfektionsexperimenten führt (Holland *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Holtmann *et al.*, 1999). Hier dargestellte eigene Ergebnisse bestätigen dieses für stabile Zelllinien. In der Literatur gibt es allerdings auch einen einzelnen Bericht, dass die Mutationen Ser-271 und Thr-275 (MKK7_{2E}) sowie Ser-271, Thr-275 und Ser-277 (MKK7_{3E}) bei MKK7 nicht zu einer konstitutiv aktiven Form führen (Zheng *et al.*, 1999). Diese Arbeitsgruppe hat daher durch Generierung eines Fusionsproteins aus MKK7 und JNK1 eine konstitutiv aktive chimäre Kinase hergestellt, welche nach Transfektion in Zellen JNK-abhängige Reportergene aktiviert. Endogenes JNK wird nicht aktiviert. Mit diesem Konstrukt gewonnene Daten sind daher nicht direkt mit dem hier verwendeten Ansatz vergleichbar. Andere Alternativen zur Aktivierung MKK7-abhängiger JNKs ergeben sich nach dem derzeitigen Erkenntnisstand der Literatur nicht.

Es existieren 10 JNK-Isoformen, die auf Aminosäureebene hoch homolog sind (s. Abb. 1.2). Diese Isoformen unterscheiden sich u.a. in der Fähigkeit Transkriptionsfaktoren zu binden und zu phosphorylieren (Gupta *et al.*, 1996). Es ist deshalb denkbar, dass MKK7 über die Aktivierung bestimmter JNK Isoformen spezifische Funktionen ausübt. Es sollte deshalb untersucht werden, ob MKK7 bevorzugt einzelne endogene JNK-Isoformen aktiviert. Die Voraussetzung für die Klärung dieser Frage ist die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper gegen die JNK Isoformen.

Für die Untersuchungen wurden 4 verschiedene Antikörper eingesetzt, zwei kommerziell erhältliche, als anti-JNK1 und anti-JNK2 bezeichnete Antikörper von Santa Cruz, sowie zwei ausgetestete Antiseren von Prof. Jeremy Saklatvala, SAK-9, welche gegen lange JNK-Isoformen (JNK2 α 2 und JNK2 β 2) gerichtet sind SAK-10, welche nur mit JNK3 α 1 (kurze Form) reagieren (J. Saklatvala, pers. Mitteilung).

Nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} konnte eine signifikante Aktivierung endogener JNK Formen nach Immunpräzipitation (IP) mit dem Antikörper anti-JNK1 und mit dem SAK-9 Antiserum detektiert werden, während nach IP mit dem SAK-10 Antiserum nur eine geringe JNK Aktivität messbar war. Letzteres beruht möglicherweise auf einer relativ geringen Expression der JNK3 Isoform in HEK293 Zellen, da JNK3 nach Berichten anderer Arbeitsgruppen präferentiell nur im Gehirn exprimiert wird (Mohit *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997). *In-vitro* war partiell aufgereinigte MKK7_{3E} in der Lage,

die lange Form von JNK3, JNK3 α 2, fusioniert an GST zu phosphorylieren (s. Abb. 3.27).

Keine JNK Aktivierung durch GFP-MKK7_{3E} konnte mit dem sogenannten anti-JNK2 Antikörper von Santa-Cruz nachgewiesen werden, obwohl JNK2 Isoformen in den HEK293 Zellen vorkommen müssen, da das SAK-9 Antiserum sie erkennt. Aus weiteren Versuchen ergibt sich ebenfalls eindeutig, dass MKK7 intrazellulär JNK2 aktiviert. So wurde nach Koexpression von JNK2 und Induktion der aktiven MKK7 Mutante eine stärkere JNK-Aktivität als in Kontrollansätzen ohne JNK2 gemessen (s. Abb. 3.21). Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass der anti-JNK2 Antikörper von Santa-Cruz spezifische, nicht in den HEK293 Zellen vorkommende, JNK Isoformen detektiert. Dieses wurde von der Firma nicht getestet, sondern die Namensgebung des Antikörpers erfolgte anhand des für die Immunisierung verwendeten JNK Polypeptids.

Bei den meisten Untersuchungen, die in der Literatur erwähnt wurden, fand bisher keine Differenzierung zwischen den JNK-Isoformen statt. Holland *et al.* zeigen, dass MKK7 *in-vitro* mit JNK1 assoziiert (Holland *et al.*, 1997). Andere Versuche zeigten, dass MKK7 rekombinantes JNK1 *in-vitro* phosphoryliert (Lawler *et al.*, 1999, Foltz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Hirai *et al.*, 1998). Für die maximale Aktivierung von JNK3 α 1-Form ist die Phosphorylierung durch MKK7 und MKK4 notwendig. Aber schon die alleinige Phosphorylierung durch MKK7, wobei bevorzugt Thr phosphoryliert wird, konnte die Aktivität von JNK3 α 1 um ein Vielfaches über den Basalwert erhöhen (Lisnock *et al.*, 2000). In SHP-77 SCL- und PC12 Zellen wurde eine unterschiedliche Aktivierung der JNK-Isoformen in Abhängigkeit von den verwendeten Stimuli, UV-Strahlung und osmotischen Streß festgestellt. Es wurde aber keine Verbindung zwischen MKK7 und den untersuchten JNK-Isoformen hergestellt (Butterfield *et al.*, 1999).

Die bis jetzt bekannt gewordenen Funktionen des JNK Signalweges betreffen die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren mit nachfolgenden Änderungen der Genexpression (Widmann *et al.*, 1999). Für die Regulation und das Verständnis eines MAP Kinase Signalweges ist es daher auch wichtig die Lokalisation der involvierten Moleküle zu kennen.

Studien über den ERK Signalweg zeigten, dass in unstimulierten Zellen ERKs im Zytoplasma lokalisiert sind und nach Aktivierung im Zellkern akkumulieren (Chen *et al.*, 1992; Seth *et al.*, 1992; Gonzalez *et al.*, 1993). Dagegen wurden MEK1 und MEK2 nur im Zytoplasma nachgewiesen (Ahn *et al.*, 1992). Wichtig für die Lokalisation im Zytoplasma ist eine bestimmte Aminosäuresequenz, die reich an hydrophoben Aminosäuren - oft wird Lysin gefunden - ist und sich im Bereich des N-Terminus (Aminosäuren 34-44) befindet. Ein solches Signal ist im N -Terminus von MKK7 nicht vorhanden, da es zwischen den Aminosäuren 34 – 44 nur 1 hydrophobe Aminosäure gibt.

Endogenes MKK7 und MKK4 kommen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor. Die Stimulation mit UV-Strahlung oder durch IL-1 α änderte die Lokalisation der Kinasen kaum. Versuche mit den β - und γ -Isoformen zeigten, dass beide MKK7 Isoformen zytosolisch und nukleär vorliegen und durch MEKK1 im Kern aktiviert werden können (Tournier *et al.*, 1999). Für JNKs konnten verschiedene Gruppen zeigen, dass aktivierte JNKs im Kern nach Stimulation akkumulieren (Kawasaki *et al.*, 1996 ; Mizukami *et al.*, 1997).

Übereinstimmend mit diesen Literaturangaben konnte mit Hilfe von Western-Blot Analysen sowohl endogenes MKK7 als auch das Fusionsprotein GFP-MKK7 im Zytosol wie auch in der Kernfraktion der stabil transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden (s. Abb. 3.25). Entsprechend wurde auch eine Aktivierung des JNK Signalweges im Zytosol und in der Kernfraktion durch Expression von GFP-MKK7_{3E}, aber nicht durch GFP-MKK7_{3A}, festgestellt (s. Abb. 3.26).

Die GFP-MKK7_{3E} exprimierenden Zelllinien des Klones E4 und später des aus E4 subklonierten und angereicherten Klons E10 zeigten eine dauerhafte Expression des Transgens in allen Zellen, eine gute Regulierbarkeit durch Ekdyson und eine Erhöhung der endogenen JNK Aktivität nach Induktion. Diese Zelllinie erfüllte damit alle Voraussetzungen, um mit Hilfe von differentiellen „Screening Methoden“ MKK7-abhängige Veränderungen der Genexpression zu analysieren. Von besonderer Wichtigkeit war dabei, dass die nicht-induzierten Zellen desselben Klons bei jedem Versuch als Kontrolle verwendet werden.

Für Untersuchungen der differentiellen Genexpression können verschiedene Methoden verwendet werden. Es können Northern Blot-Analysen für schon bekannte Gene durchgeführt werden. Um neue Moleküle zu finden für die bisher kein

Zusammenhang mit dem JNK Signalweg bekannt ist, eignen sich andere Methoden besser. Bei dem verwendeten *cDNA-array* handelt es sich um eine Membran auf der 588 cDNAs (bzw. Fragmente von cDNAs oder auch ESTs) immobilisiert sind. Dieser „Array“ wurde auch für die Untersuchung bezüglich der Aktivierung von TRAF2 und TRAF6 durch proinflammatorische Zytokine in stabil transfizierten HeLa-Zellen eingesetzt. Durch $IL1\alpha$ und $TNF\alpha$ wurde 5 Gene (bereits bekannte Chemokine und Zytokine) gefunden, die induziert wurden (Baud *et al.*, 1999).

Der Versuch wurde mit RNA des Klons E4 durchgeführt. Nach Induktion der aktiven Mutante wurden 3 Gene, FRA-2, die cDNA einer Serin-Kinase (SRPK1) und ATF-4 identifiziert, deren Expression verstärkt war. Bei Thymosin Beta 10 wurde eine geringere Expression festgestellt (s. Abb. 3.33). Die Überprüfung wurde mittels RT-PCR und Northern-Blot durchgeführt (s. Abb. 3.34 und 3.35). Die festgestellten Unterschiede zwischen nicht induzierten und induzierten Zellen konnten nicht reproduziert werden. Mit dem durchgeführten *cDNA-array* konnten nach Induktion von MKK7_{3E} keine differentiell exprimierten Gene gefunden werden. Dies kann daran liegen, dass die Gene, die durch MKK7 beeinflusst werden, auf dem verwendeten *cDNA-array* nicht vertreten waren, oder dass MKK7_{3E} nicht stark genug überexprimiert wird, so dass zu den Kontrollzellen der Unterschied zu gering ist. Eine umfangreichere Analyse wird im Moment in Zusammenarbeit mit Prof. Fred Muchinski vom National Institute of Cancer Research, NIH, Maryland, USA mit Hilfe von *cDNA MicroArrays*, auf denen über 6000 cDNAs immobilisiert sind, durchgeführt. Durch eine Erhöhung der analysierten cDNAs um den Faktor 10 können möglicherweise MKK7_{3E}-abhängige Gene erfasst werden, allerdings werden auch mit diesem „Array“ nur 10% der geschätzten 100.000 Gene (s.u.) des humanen Genoms erfasst.

In einem weiteren ausführlichen Versuchsansatz wurde versucht, die Auswirkungen der GFP-MKK7_{3E} Expression auf Proteomebene zu erfassen. Die Australier M. Wilkins und K. Williams prägten im Jahr 1994 den Begriff „Proteome“. Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt vom Genom einer Zelle oder Organismus exprimiert werden. Von den geschätzten Genen einer Zelle, die Werte schwanken zwischen 60000 – 100000 Genen (Celis and Gromov, 1999), wird nur ein kleiner Teil auch exprimiert. Ein Teil davon ist zelltypspezifisch. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom nicht statisch, sondern

verhält sich in Abhängigkeit von inneren und äußeren Parametern dynamisch und flexibel. Für die Funktion der Zelle sind letztlich nur die exprimierten Proteine relevant. Die Proteomanalyse ist eine wichtige Ergänzung zur Analyse des Genoms, denn die komplexe Organisation der Zellregulation kann nicht allein durch das Entschlüsseln von genomischer DNA eines Organismus aufgeklärt werden. Auch besteht nur eine geringe Korrelation zwischen den Mengen an mRNA und den entsprechenden Genprodukten (Gygi *et al.*, 1999), so dass nur mit Hilfe der Proteomanalyse feststellbar ist, welche Proteine unter bestimmten Bedingungen wie stark exprimiert und posttranslational verändert werden.

Wichtig für die Durchführung einer Proteomanalyse ist die Möglichkeit komplexe Proteingemische reproduzierbar unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse aufzutrennen. Bei der zweidimensionalen (2D) Elektrophorese werden die Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Kriterien, dem isoelektrischem Punkt und dem Molekulargewicht, getrennt. Diese Methode wurde 1975 von O'Farrell und Klose als 2D PAGE entwickelt (O'Farrell *et al.*, 1975; Klose, 1975). Die bis dahin angewandten Methoden waren nur zur Trennung von löslichen Proteinen geeignet. O'Farrell gelang es durch Verwendung von Harnstoff, Mercaptoethanol und dem Detergenz NP-40 für die Probenaufbereitung Proteingemische in viele hundert Proteinspots aufzutrennen.

Die isoelektrische Fokussierung ist eine Elektrophorese in einem pH-Gradient. Eine Weiterentwicklung für die isoelektrischen Fokussierung war die Etablierung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) (Bjellqvist, 1982). Der immobilisierte pH-Gradient entsteht durch Kopolymerisation von Immobiline[®] (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit Acrylamid-Monomeren. Die Verwendung der IPGs hat gegenüber den vorher eingesetzten Trägerampholyten mehrere Vorteile: Der pH-Gradient ist stabiler, es können auch basische Proteine getrennt werden. Bei Verwendung der Trägerampholyte gehen schon Proteine mit einem pH > 7,5 durch die Kathodendrift verloren. Die Herstellung der IPGs erfolgt mit chemisch definierten Einzelverbindungen, beides erhöht die Reproduzierbarkeit der 2D-Elektrophorese.

Die 2D-Elektrophorese von zellulären Proteinen mit immobilisierten pH-Gradienten wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Es wurden verschiedene pH-Gradienten, Streifen unterschiedlicher Länge sowie mehrere Detektionsverfahren angewendet. Bei der Durchführung der Proteomuntersuchung mit Hilfe von 2D-Elektrophorese wurde ersichtlich, dass viele Parameter die Ergebnisse beeinflussen. Besonders die

analoge Vorbereitung der Proben war für die Reproduzierbarkeit der Gele entscheidend. Ebenso wichtig war die Anwendung von sensitiven Detektionsmethoden.

Bei Verwendung des pH-Gradienten 3 - 10 konnten die Hauptproteine der Zellen getrennt werden. Mit den 13 cm Streifen konnten ca. 200 - 300 Proteinspots, die mit der Silberfärbung des Pharmacia Kits angefärbt wurden, detektiert werden (s. Abb. 3.36). Durch Verwendung der 18 cm Streifen wurden mit dem gleichen Silberfärbemethode unwesentlich mehr Proteinspots gefunden. Erst beim Färben der Gele mit der sehr sensitiven ammoniakalischen Diamin-Silberfärbung wurden ca. 800 – 1000 Spots detektiert (s. Abb. 3.40) und es konnten auch unterschiedlich exprimierte Proteine identifiziert werden (s. Abb. 3.41). Allerdings ist die Sequenzierung von Proteinen, die wie bei der ammoniakalischen Silberfärbung mit Glutaraldehyd fixiert wurden, meistens nicht möglich (Shevchenko *et al.*, 1996).

Aus diesem Grund müssen andere Färbemethoden verwendet werden. In den letzten Jahren wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe für die Proteinfärbung entwickelt, die geeignet für Proteinsequenzierungen sind. Dabei können die Farbstoffe in zwei Gruppen unterteilt werden, die sich im Mechanismus der Färbung unterscheiden.

Bei Sypro Red, Sypro Orange und Sypro Tangerine interagieren die Farbstoffe mit den SDS-Protein Komplexen. Da SDS an Proteine mit einer konstanten Stöchiometrie bindet, ist bei dieser Färbemethode eine Quantifikation möglich (Daban *et al.*, 1996; Steinberg *et al.*, 1996; Alba and Daban, 1998; Steinberg *et al.*, 2000). Dagegen beruht die Färbung von Proteinen mit Sypro Ruby und Sypro Rose auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten und den Farbstoffen, es entstehen Metall-Chelat Komplexe, die eine sensitive Proteinfärbung ermöglichen (Lim *et al.*, 1997; Berggren *et al.*, 1999; Patton *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu vielen Silberfärbemethoden werden mit den Sypro Fluoreszenzfarbstoffen keine Nukleinsäuren oder bakterielle Lipopolysaccharide angefärbt (Steinberg *et al.*, 1996; Steinberg *et al.*, 2000). Dadurch wird die Auswertung der Gele erleichtert. Allerdings sind die Fluoreszenzfarbstoffe in ihrer Sensitivität sehr unterschiedlich. Mit Sypro Ruby konnten noch weniger als 50 ng BSA nachgewiesen werden (s. Abb. 3.42), die Nachweisgrenze von Sypro Tangerine lag höher und kann in etwa mit einer Coomassie-Färbung gleichgesetzt werden. Die Sensitivität der ammoniakalischen Diamin-Silberfärbung konnte mit Sypro Ruby nicht

erreicht werden. Die Sensitivität der verwendbaren Detektionsmethoden ist bei Proteomuntersuchungen sehr entscheidend, damit auch Proteine, die nur in geringer Konzentration in der Zelle oder dem Organismus vorkommen, überhaupt detektiert werden können.

Wichtig ist bei den angewendeten Detektionsmethoden aber auch, dass eine lineare Korrelation zwischen Proteinkonzentration und Färbesignal besteht, damit Aussagen über mengenmäßige Änderungen getroffen werden können. Als weitere Möglichkeit der Detektion ist auch die kovalente Bindung von Fluoreszenzsubstanzen an Proteine möglich. So wird z.B. Monobromobiman direkt zu den solubilisierten Proteinen gegeben, um eine möglichst starke Fluoreszenzmarkierung von Sulfhydrylgruppen zu erhalten (Urwin and Jackson, 1993). Ein großer Nachteil bei dieser Färbemethode besteht darin, dass das Vorkommen von Cysteinen sich bei Proteinen stark unterscheiden kann, bei Serumalbumin findet man 35 Cystein-Reste, dagegen bei manchen Proteinen, wie z.B. Myoglobin, β -Casein oder Cytochrom b₅, nicht ein Cystein (Patton, 2000).

Eine andere Möglichkeit die Proteinauftrennung zu verbessern, liegt in der Verwendung von kleinen pH-Gradienten. Allerdings sind bis jetzt Streifen, die die Auftrennung innerhalb einer pH-Einheit ermöglichen, nur für den sauren Bereich kommerziell erhältlich. Anhand der Gele, die mit den Streifen des Bereichs pH 3 - 10 angefertigt wurden, ist aber ersichtlich, dass im sauren Bereich die Anzahl der Proteine der HEK293 Zellen im Vergleich zum neutralen bzw. leicht basischen Bereich eher gering ist (s. Abb. 3.43 und 3.40). Für diese Bereiche könnte eine bessere Auftrennung möglicherweise auch zur Identifizierung neuer Proteine führen.

Die Auftrennung der Proteine im basischen Bereich bei Verwendung von Streifen mit einem pH-Gradienten von 6 - 9 lieferte keine interpretationsfähigen Gele, da die Fokussierung der Proteine unzureichend war. Diese können durch das Kohlendioxid der Luft verursacht werden, da es bei ca. pH 8,5 zum Eintritt des Gases und zur Bildung von HCO_3^- mit dem in der Probe enthaltenen Wasser kommt. Dies führt zur Störung bei der isoelektrischen Fokussierung (Righetti, 1990). Weiter wird bei basischen Trennungen empfohlen, die Probe erst nach der Rehydrierung der Streifen aufzutragen. Dies ist bei Verwendung der Multiphor II möglich, bei der eingesetzten IPGPhor müssen dafür extra Probenauftragsschalen benutzt werden, die nicht verfügbar waren.

Beim Vergleich der Proteinmuster, der mit den 13 cm und den 17 bzw. 18 cm Streifen und den verwendeten pH-Gradienten angefertigt wurden, ergaben nicht induzierte und induzierte Proben jedesmal ein sehr ähnliches Proteinmuster. Daraus lässt sich folgern, dass die Expression der aktiven MKK7 Mutante auf die Proteinexpression nur einen geringen Einfluß hat. Dies ist auch mit dem Ergebnis des *cDNA arrays* vereinbar, da kein großer Unterschied bei der Expression von mRNA auftrat. Möglicherweise betreffen die Veränderungen in der Proteinexpression Proteine, die nur in geringen Konzentrationen vorliegen und mit den verwendeten Methode nicht identifiziert werden konnten.

Eine andere sensitive Nachweismethode liegt darin, neu synthetisierte Proteine *in-vivo* zu markieren. Mit ^{35}S konnten auch durch Verwendung der *Amplify*-Lösung wesentlich mehr Proteine detektiert werden als mit ^{32}P (s.u.). Limitierend bei dieser Methode können verschiedene Faktoren sein, so werden auch durch radioaktive Markierung keine Proteine detektiert, die sehr langsam oder nur in sehr geringen Konzentrationen gebildet werden (Celis, 1999). Durch diese Methode unter Verwendung enger pH Gradienten wurden auch Unterschiede zwischen nicht induzierten und induzierten Zellen festgestellt (s. Abb. 3.49). Die entsprechenden Spots wurden ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse an Prof. Saklatvala weitergeleitet. Die Ergebnisse liegen leider noch nicht vor.

Durch ^{32}P -ortho Phosphat konnten ähnlich viele Proteinspots wie mit der Silberfärbung im analytischen Maßstab detektiert werden. Unterschiede durch Induktion von GFP-MKK7_{3E} wurden aber nicht festgestellt, möglicherweise wurden die Zellen durch die radioaktive Strahlung - wie in der Einleitung erwähnt, aktiviert energiereiche Strahlung JNKs - auch stimuliert und der Einfluß der recht schwachen MKK7 Mutante war nicht mehr detektierbar.

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kracht konnte in KB-Zellen und HEK293 Zellen nach transienter Überexpression von MYC₆-MKK7_{3E} eine leicht erhöhte IL-8 Sekretion festgestellt werden (Holtmann *et al.*, 1999). Deshalb wurde versucht, GFP-MKK7_{3E}-abhängige Änderungen sezernierter Proteine zu detektieren. Unterschiede in der Sekretion ^{35}S markierter Proteine in Abhängigkeit der Induktion von GFP-MKK7_{3E} ließen sich auf 2D Gelen allerdings nicht nachweisen, obwohl eine ganze Reihe sezernierter Proteine detektiert werden konnten (s. Abb. 3.51). Möglicherweise reicht die Expressionsstärke von der Ekdyson-induzierten GFP-MKK7_{3E} nicht aus,

um genügend IL-8 zu induzieren, außerdem benötigt die Induktion dieses Zytokins die Aktivierung weitere Stresskinase Signalwege (Holtmann *et al.*, 1999), welche vielleicht nur in transienten Transfektionsexperimenten, nicht aber in den stabilen HEK293 Zelllinien mitaktiviert werden.

Die oben ausführlich dargestellten Ergebnisse der Proteomanalyse der GFP-MKK7_{3E} exprimierenden Zellen, zeigen deutlich die augenblicklichen Limitationen dieses Ansatzes auf. Als Verbesserung oder Weiterentwicklung der Proteomuntersuchung werden verschiedene Methoden in Betracht gezogen. Wie hier ausführlich dargestellt ist die Trennung von Ganzzelllysaten häufig schwierig, deshalb könnten Fraktionierungen oder Affinitätsanreicherungen vor der 2D Elektrophorese durchgeführt werden (Pandey and Mann, 2000). Schwierig ist es auch hydrophobe oder große Proteine mit 2D Elektrophorese aufzutrennen, da diese Proteine nicht in das SDS-Gel der zweiten Dimension einwandern. Als Weiterentwicklung sind Trennung über eine 1-dimensionale Elektrophorese mit anschließender massenspektrometrischen Analyse möglich (Pandey and Mann, 2000). Analog zu den DNA Mikroarrays werden auch Protein Mikroarrays entwickelt, mit denen auch Protein-Protein Interaktionen untersucht werden sollen (Luecking *et al.*, 1999).

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Proteomanalysen mit der Auftrennung von insgesamt sicher 1500 - 2000 unterschiedlichen Proteinspots, dass der Einfluss der GFP-MKK7_{3E} Mutante auf die globale Proteinexpression der HEK293 Zellen entweder sehr klein ist, oder was wahrscheinlicher ist, nur Proteine betrifft, die mengenmässig mit den etablierten Nachweisethoden kaum erfassbar sind. Dieses kann daraus geschlossen werden, dass nur in präparativen Gelen mit einer extrem sensitiven Silberfärbung oder durch metabolische Markierung und Auftrennung der Proteine auf engen pH-Gradienten einige wenige GFP-MKK7_{3E}-abhängige Proteinveränderungen detektierbar waren. Diese Identifizierung von Unterschieden, die durch die Überexpression der aktiven MKK7 Mutante verursacht wurden, gelang erst am Ende dieser Arbeit. Leider liegen die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen dieser Proteine zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor. Außerdem müssten diese Veränderungen auch mit anderen Methoden überprüft werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 oder zellulären Stress erfolgt die Aktivierung von Jun N-terminalen Proteinkinase (JNK). Obwohl bereits viele involvierte Moleküle des JNK Signalweges identifiziert werden konnten, sind die zellbiologischen Auswirkungen seiner Aktivierung unzureichend geklärt.

Um diese Fragestellung zu untersuchen wurde ein System etabliert, um durch den spezifischen JNK Aktivator, MAP Kinase Kinase 7 (MKK7), den Signalweg in intakten Zellen zu aktivieren. Verschieden Mutanten von MKK7 wurden an das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert und zellulär klonierte HEK293 Zelllinien hergestellt, die mit Hilfe von Ekdyson-responsiven Promotoren eine regulierbare Expression der Fusionsproteine erlauben.

Die Induktion mit den synthetischen Ekdyson Analoga Ponasteron oder Muristeron zeigte eine dosis- und zeitabhängige Expression der MKK7 Fusionsproteine anhand von Western-Blot Untersuchungen mit anti-GFP und anti-MKK7 Antikörpern. In nicht-induzierten Zellen war keine Expression detektierbar.

Durch die Expression der konstitutiv aktiven Mutante GFP-MKK7_{3E}, aber nicht durch die inaktiven Mutanten GFP-MKK7_{3A} und GFP-MKK7_{K149M}, konnte eine spezifische Aktivierung endogener JNK1 und JNK2 Isoformen erreicht werden. Eine Aktivierung des ERK2 oder des p38 MAPK Signalweges durch die GFP-MKK7 Proteine wurde nicht festgestellt.

Die von MKK7-abhängigen zellulären Veränderungen sollten durch Untersuchungen der Genexpression auf mRNA Ebene und auf Proteinebene erfasst werden. Hierbei wurde jeweils die Genexpression einer Zelllinie vor und nach Induktion von GFP-MKK7_{3E} verglichen. Auf mRNA Ebene konnten mit dem verwendeten *cDNA array* keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen in der Genexpression von 588 mRNAs festgestellt werden.

Für die Proteomuntersuchungen wurden 2D Elektrophoresen zellulärer Proteine unter Verwendung von immobilisierten pH Gradienten verschiedener Bereiche und Längen durchgeführt, wobei die Proteine durch Silberfärbung und Fluoreszenzfarbstoffe oder nach metabolischer Markierung mit ³²P oder ³⁵S detektiert wurden. Zusammenfassend zeigen die Analysen von ca. 1500-2000 Proteinspots, dass nur in präparativen Gelen mit einer extrem sensitiven Silberfärbung oder durch metabolische Markierung und Auftrennung der Proteine auf engen pH Gradienten

einige wenige GFP-MKK7_{3E}- abhängige Proteinveränderungen detektierbar waren. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen dieser Proteine liegen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass in einem exakt definierten regulierbaren Expressionssystem der Einfluss einer aktiven GFP-MKK7_{3E} Mutante auf die globale Proteinexpression von HEK293 Zellen nur Proteine betrifft, die mit den etablierten Nachweismethoden der Proteomanalytik kaum erfassbar sind.

MKK7, Ekdyson-induzierbares Expressionssystem, Proteomanalysen

6 ANHANG

6.1 MKK7 Isoformen

	1		70			
MKK7- γ 2	MAASSLEQKLSRLEAKLKQENREARRRIDLNLDISPQRPRPIIVITLSPAPAPSQRAALQLPLANDGGSR					
MKK7- γ 1	M.....					
MKK7- β 2	M.....T-----					
MKK7- β 1	M.....T-----					
	71		140			
MKK7- γ 2	SPSSESSPQHPTPPTRPRHMLGLPSTLFTPRSMESIEIDQKLQEIMKQTGYLTIGGQRYQAEINDLENLG					
MKK7- γ 1					
MKK7- β 2					
MKK7- β 1					
MKK7- α 2M.....					
MKK7- α 1M.....					
	141	I	II	III	IV	210
MKK7- γ 2	EMSGTTCGQVWVKMRFRKTGHI IAVKQMRRSNGKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIVQCFTFITNTDVF					
MKK7- γ 1					
MKK7- β 2					
MKK7- β 1					
MKK7- α 2					
MKK7- α 1					
	211	v	VI	VII	280	
MKK7- γ 2	AMELMGTCAEKLKRMQGP I PERILGKMTVAIVKALYYLKEKHGVIHRDVKPSNILLDERGQIKLCDFGI					
MKK7- γ 1					
MKK7- β 2					
MKK7- β 1					
MKK7- α 2					
MKK7- α 1					
	281	VIII	IX	350		
MKK7- γ 2	SGRLVDSKAKTRSAGCAAYMAPERIDPPDPTKPDYDIRADVWSLGI SLVELATGQFPYKNCKTDFEVLTK					
MKK7- γ 1					
MKK7- β 2					
MKK7- β 1					
MKK7- α 2					
MKK7- α 1					
	351	x	420			
MKK7- γ 2	VLQEEPELLPGHMGFSGDFQSFVKDCLTKDHRKRPKYNKLLHESFIIKHYEILEVDVASWFKDVMAKTES					
MKK7- γ 1					
MKK7- β 2					
MKK7- β 1					
MKK7- α 2					
MKK7- α 1					
	421		467			
MKK7- γ 2	PRTSGVLSQHHLPFFSGSLEESPTSPSPKSFPLSPAIPQAQAEWVSGR#					
MKK7- γ 1R#					
MKK7- β 2#					
MKK7- β 1R#					
MKK7- α 2#					
MKK7- α 1R#					

Isoformen der murinen MKK7 Proteine (aus Tournier *et al*, 1999)

#: Stopcodon
(-): Deletionen

6.2 Nukleotidsequenz der MKK7a mRNA

1 tgagcggcgg cagcggcggc ggggaagatg gcggcgtcct cctggagca gaagctgtcc
61 cgcctggaag ccaagctgaa gcaggagaac cgtgaggccc gcaggaggat cgacctcaac
121 ttggatatca gcccacagcg gcccaggccc acctgcaac tcccactggc caacgatggg
181 ggcagccgct caccatcctc agagagctcc ccacagcacc ctacaccccc caccggccc
241 cgccacatgc tggggctccc atcaaccttg ttcacaccgc gcagtatgga gagcatcgag
301 attgaccaga agctgcagga gatcatgaag cagacagggg acctgactat cgggggcccag
361 cgttatcagg cagaaatcaa tgactggag aactgggtg agatgggcag tggtaacctgt
421 ggtcaggtgt ggaagatgcg gttccggaag acaggccaca tcattgctgt taagcaaatg
481 cggcgtctg ggaacaagga agagaataag cgcatttga tggacctgga tgtagtactc
541 aagagccatg actgccctta catcgttcag tgctttggca cttcatcac caacacagac
601 gtctttattg ccatggagct catgggcaca tgtgcagaga agctgaagaa acgaatgcag
661 ggccccattc cagagcgaat cctgggcaag atgactgtgg cgattgtgaa agcactgtac
721 tatctgaagg agaagcatgg cgtcatccat cgcgatgtca aacctccaa catcctgcta
781 gatgagcggg gccagatcaa gctctgtgac ttggcatca gtggccgtct tgtgactcc
841 aaagccaaaa cacggagtgc tggctgtgct gcctatatgg ctcccgagcg catcgacct
901 ccagatcca ccaagcctga ctatgacatc cgagctgatg tgtggagcct gggcatctca
961 ctggtggagc tggcaacagg acagttccc tataagaact gcaagacgga cttgaggtc
1021 ctaccaaag tctacagga agagcccca ctctgcctg gtcacatggg cttctcaggg
1081 gactccagt catttgtaa agactgcct actaaagatc acaggaagag accaaagtat
1141 aataagctac ttgaacacag ttcatcaag cactatgaga tactcgaggt ggatgtcgcg
1201 tcttggttta aggatgtcat ggcgaagacc gagtcccaa ggactagtgg agtctgagt
1261 cagcaccatc tgcccttctt caggtagcct catggcagc

mRNA von muriner MAP Kinase Kinase 7a (MKK7a)
(Accession-Nr.: U74463)

7 LITERATUR

Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG.
Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase.
J Biol Chem. 1991 Mar 5;266(7):4220-7.

Alba FJ, Daban JR.
Rapid fluorescent monitoring of total protein patterns on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and western blots before immunodetection and sequencing.
Electrophoresis. 1998 Oct;19(14):2407-11.

Allen M, Svensson L, Roach M, Hambor J, McNeish J, Gabel CA.
Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells.
J Exp Med. 2000 Mar 6;191(5):859-70.

Alvarez E, Northwood IC, Gonzalez FA, Latour DA, Seth A, Abate C, Curran T, Davis RJ.
Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase.
J Biol Chem. 1991 Aug 15;266(23):15277-85.

Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M.
Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain.
Genes Dev. 1999 May 15;13(10):1297-308.

Behrens A, Sibilica M, Wagner EF.
Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation.
Nat Genet. 1999 Mar;21(3):326-9.

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ.
Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2.
Curr Biol. 1998 Sep 24;8(19):1049-57. Review.

Berggren K, Steinberg TH, Lauber WM, Carroll JA, Lopez MF, Chernokalskaya E, Zieske L, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF.
A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports.
Anal Biochem. 1999 Dec 15;276(2):129-43.

Birnboim HC, Doly J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Blank JL, Gerwins P, Elliott EM, Sather S, Johnson GL.

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.

J Biol Chem. 1996 Mar 8;271(10):5361-8.

Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W.

Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications.

J Biochem Biophys Methods. 1982 Sep;6(4):317-39.

Bowtell DD.

Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray.
Nat Genet. 1999 Jan;21(1 Suppl):25-32. Review.

Bradford MM.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

Butterfield L, Zentrich E, Beekman A, Heasley LE.

Stress- and cell type-dependent regulation of transfected c-Jun N-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase kinase isoforms.

Biochem J. 1999 Mar 15;338 (Pt 3):681-6.

Canonica L, Kroszczyński W, Ranzi BM, Rindone B, Santaniello E, Scolastico C.

Biosynthesis of mycophenolic acid.

J Chem Soc [Perkin 1]. 1972;21:2639-43.

Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV.

TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1.

Nature. 1996 Oct 3;383(6599):443-6.

Cao Z, Henzel WJ, Gao X.

IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor.

Science. 1996 Feb 23;271(5252):1128-31.

Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M.

The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase.

EMBO J. 1996 Nov 15;15(22):6269-79.

Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M.

Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation.

EMBO J. 1995 Dec 1;14(23):5957-64.

- Celis JE, Gromov P.
2D protein electrophoresis: can it be perfected?
Curr Opin Biotechnol. 1999 Feb;10(1):16-21. Review.
- Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH.
The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation.
J Biol Chem. 1996 Dec 13;271(50):31929-36.
- Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, Gaietta G, Jurchott K, Royer HD, Mann M, Karin M.
Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation.
Genes Dev. 2000 May 15;14(10):1236-48.
- Cheng M, Zhen E, Robinson MJ, Ebert D, Goldsmith E, Cobb MH.
Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3.
J Biol Chem. 1996 May 17;271(20):12057-62.
- Cheng M, Boulton TG, Cobb MH.
ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase.
J Biol Chem. 1996 Apr 12;271(15):8951-8.
- Chomczynski P, Sacchi N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.
- Choi DS, Wang D, Tolbert L, Sadee W.
Basal signaling activity of human dopamine D2L receptor demonstrated with an ecdysone-inducible mammalian expression system.
J Neurosci Methods. 2000 Jan 15;94(2):217-25.
- Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ.
Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway.
Science. 1997 Nov 28;278(5343):1638-41.
- Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M.
JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection.
Immunity. 1999 Dec;11(6):721-31.
- Clark S, Eckardt G, Siddle K, Harrison LC.
Changes in insulin-receptor structure associated with trypsin-induced activation of the receptor tyrosine kinase.
Biochem J. 1991 May 15;276 (Pt 1):27-33.
- Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ.
Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress.
Cell Regul. 1991 Dec;2(12):965-78. Review.

Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M.
Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38).
EMBO J. 1997 Jan 15;16(2):295-305.

Daban M, Medrano A, Querol E.
Cloning, sequencing and expression of the transferrin-binding protein 1 gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
Biochem J. 1996 Apr 1;315 (Pt 1):257-64.

Davies J, Jacob F.
Genetic mapping of the regulator and operator genes of the lac operon.
J Mol Biol. 1968 Sep 28;36(3):413-7

Davis RJ.
The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.
J Biol Chem. 1993 Jul 15;268(20):14553-6. Review.

Davis RJ.
Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase.
Biochem Soc Symp. 1999;64:1-12. Review.

Deacon K, Blank JL.
Characterization of the mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)/c-Jun NH2-terminal kinase 1 and MKK3/p38 pathways regulated by MEK kinases 2 and 3. MEK kinase 3 activates MKK3 but does not cause activation of p38 kinase in vivo.
J Biol Chem. 1997 May 30;272(22):14489-96.

Deacon K, Blank JL.
MEK kinase 3 directly activates MKK6 and MKK7, specific activators of the p38 and c-Jun NH2-terminal kinases.
J Biol Chem. 1999 Jun 4;274(23):16604-10.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ.
JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.
Cell. 1994 Mar 25;76(6):1025-37.

Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ.
Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms.
Science. 1995 Feb 3;267(5198):682-5.

Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ.
A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway.
Science. 1997 Aug 1;277(5326):693-6.

Dignam JD.

Preparation of extracts from higher eukaryotes.

Methods Enzymol. 1990;182:194-203.

Dong C, Yang DD, Wusk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA.

Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1.

Science. 1998 Dec 11;282(5396):2092-5.

Dong C, Yang DD, Tournier C, Whitmarsh AJ, Xu J, Davis RJ, Flavell RA.

JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation.

Nature. 2000 May 4;405(6782):91-4.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR.

A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 15;92(17):7686-9.

Dunlop J, Lou Z, Zhang Y, McIlvain HB.

Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter.

Br J Pharmacol. 1999 Dec;128(7):1485-90.

Engel K, Kotlyarov A, Gaestel M.

Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation.

EMBO J. 1998 Jun 15;17(12):3363-71.

Enslen H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, Soderling TR.

Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1;93(20):10803-8.

Enslen H, Branch DM, Davis RJ.

Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms.

EMBO J. 2000 Mar 15;19(6):1301-11.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T.

The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.

Science. 1988 Jul 1;241(4861):42-52. Review.

Hirai S, Noda K, Moriguchi T, Nishida E, Yamashita A, Deyama T, Fukuyama K, Ohno S.

Differential activation of two JNK activators, MKK7 and SEK1, by MKN28-derived nonreceptor serine/threonine kinase/mixed lineage kinase 2.

J Biol Chem. 1998 Mar 27;273(13):7406-12.

Finch A, Holland P, Cooper J, Saklatvala J, Kracht M.

Selective activation of JNK/SAPK by interleukin-1 in rabbit liver is mediated by MKK7.

FEBS Lett. 1997 Nov 24;418(1-2):144-8.

Fitzgerald EM.

Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurones involves a ras-mitogen-activated protein kinase pathway.

J Physiol. 2000 Sep 15;527 Pt 3:433-44.

Foltz IN, Schrader JW.

Activation of the stress-activated protein kinases by multiple hematopoietic growth factors with the exception of interleukin-4.

Blood. 1997 May 1;89(9):3092-6.

Foltz IN, Gerl E, Wieler JS, Luckach M, Salmon RA, Schrader JW Human Mitogen-activated Kinase Kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-Jun N-terminal Kinase/Stress-activated protein Kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli

J. Biol. Chem. 1998 273: 9344 – 9351.

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27.

Cell. 1994 Sep 23;78(6):1039-49.

Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E.

Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal.

J Biol Chem. 1996 Aug 16;271(33):20024-8.

Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu IH, Davis RJ.

An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells.

Science. 1994 Aug 5;265(5173):806-8.

Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Ikeda T, Labow MA, Zon LI.

SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 9;95(12):6881-6.

van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA.

Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways.

Annu Rev Cell Biol. 1994;10:251-337. Review.

Gerwins P, Blank JL, Johnson GL.

Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway.

J Biol Chem. 1997 Mar 28;272(13):8288-95.

Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P.

Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases.

EMBO J. 1997 Jun;16(12):3563-71.

- Goldenberg DP, Creighton TE.
Gel electrophoresis in studies of protein conformation and folding.
Anal Biochem. 1984 Apr;138(1):1-18. Review.
- Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper RI, Davis RJ, Harlow E, Sanchez I.
Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):3302-7.
- Gossen M, Bujard H.
Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 15;89(12):5547-51.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H.
Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.
Science. 1995 Jun 23;268(5218):1766-9.
- Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR.
Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway.
J Biol Chem. 1998 May 22;273(21):12901-8.
- Gygi SP, Rochon Y, Fianza BR, Aebersold R.
Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.
Mol Cell Biol. 1999 Mar;19(3):1720-30.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ.
Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors.
EMBO J. 1996 Jun 3;15(11):2760-70.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ.
A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.
Science. 1994 Aug 5;265(5173):808-11.
- Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K.
Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells.
Blood. 1999 Aug 1;94(3):845-52.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M.
Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain.
Genes Dev. 1993 Nov;7(11):2135-48.
- Hirai S, Noda K, Moriguchi T, Nishida E, Yamashita A, Deyama T, Fukuyama K, Ohno S.
Differential activation of two JNK activators, MKK7 and SEK1, by MKN28-derived nonreceptor serine/threonine kinase/mixed lineage kinase 2.
J Biol Chem. 1998 Mar 27;273(13):7406-12.

Hirano M, Osada S, Aoki T, Hirai S, Hosaka M, Inoue J, Ohno S.
MEK kinase is involved in tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation and degradation of IkappaB-alpha.
J Biol Chem. 1996 May 31;271(22):13234-8.

Holland PM, Cooper JA.
Protein modification: docking sites for kinases.
Curr Biol. 1999 May 6;9(9):R329-31. Review.

Holland PM, Suzanne M, Campbell JS, Noselli S, Cooper JA.
MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous.
J Biol Chem. 1997 Oct 3;272(40):24994-8.

Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, Kracht M.
Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways.
Mol Cell Biol. 1999 Oct;19(10):6742-53.

Ip YT, Davis RJ.
Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development.
Curr Opin Cell Biol. 1998 Apr;10(2):205-19. Review.

Johnson NL, Gardner AM, Diener KM, Lange-Carter CA, Gleavy J, Jarpe MB, Minden A, Karin M, Zon LI, Johnson GL.
Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death
J Biol Chem. 1996 Feb 9; 271(6): 3220-37

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R, Karin M.
JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation.
Genes Dev. 1994 Dec 15;8(24):2996-3007.

Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M.
c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions.
Cell. 1996 Nov 29;87(5):929-39.

Kamps MP, Sefton BM
Neither arginine nor histine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding
Mol Cell Biol. 1986 Mar;6(3):751-7

Karin M, Liu Zg, Zandi E.
AP-1 function and regulation.
Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr;9(2):240-6. Review.

Karin M, Hunter T.

Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus.

Curr Biol. 1995 Jul 1;5(7):747-57. Review.

Kawakami Y, Hartman SE, Holland PM, Cooper JA, Kawakami T.

Multiple signaling pathways for the activation of JNK in mast cells: involvement of Bruton's tyrosine kinase, protein kinase C, and JNK kinases, SEK1 and MKK7.

J Immunol. 1998 Aug 15;161(4):1795-802.

Kawasaki H, Moriguchi T, Matsuda S, Li HZ, Nakamura S, Shimohama S, Kimura J, Gotoh Y, Nishida E.

Ras-dependent and Ras-independent activation pathways for the stress-activated-protein-kinase cascade.

Eur J Biochem. 1996 Oct 15;241(2):315-21.

Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ.

Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3.

Mol Cell Biol. 2000 Feb;20(3):1030-43.

Klose J.

Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.

Humangenetik. 1975;26(3):231-43.

Kracht M, Truong O, Totty NF, Shiroo M, Saklatvala J.

Interleukin 1 alpha activates two forms of p54 alpha mitogen-activated protein kinase in rabbit liver.

J Exp Med. 1994 Dec 1;180(6):2017-25.

Kracht M, Shiroo M, Marshall CJ, Hsuan JJ, Saklatvala J.

Interleukin-1 activates a novel protein kinase that phosphorylates the epidermal-growth-factor receptor peptide T669.

Biochem J. 1994 Sep 15;302 (Pt 3):897-905.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR.

The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.

Nature. 1994 May 12;369(6476):156-60.

Laemmli UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. 1970 Aug 15;227(259):680-5.

Lallemant D, Ham J, Garbay S, Bakiri L, Traincard F, Jeannequin O, Pfarr CM, Yaniv M.

Stress-activated protein kinases are negatively regulated by cell density.

EMBO J. 1998 Oct 1;17(19):5615-26.

- Lawler S, Cuenda A, Goedert M, Cohen P.
SKK4, a novel activator of stress-activated protein kinase-1 (SAPK1/JNK).
FEBS Lett. 1997 Sep 1;414(1):153-8.
- Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P.
Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro.
Curr Biol. 1998 Dec 17-31;8(25):1387-90.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al.
A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.
Nature. 1994 Dec 22-29;372(6508):739-46.
- Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y.
TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival.
Immunity. 1997 Nov;7(5):703-13.
- Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams JL.
p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials.
Pharmacol Ther. 1999 May-Jun;82(2-3):389-97. Review.
- Li YS, Shyy JY, Li S, Lee J, Su B, Karin M, Chien S
Mol Cell Biol 1996 Nov;16(11):5947-54
The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression.
- Lim MJ, Patton WF, Lopez MF, Spofford KH, Shojaee N, Shepro D.
A luminescent europium complex for the sensitive detection of proteins and nucleic acids immobilized on membrane supports.
Anal Biochem. 1997 Feb 15;245(2):184-95.
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ.
cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase.
Cell. 1993 Jan 29;72(2):269-78.
- Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, Karin M.
Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2.
Science. 1995 Apr 14;268(5208):286-90.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ.
High density synthetic oligonucleotide arrays.
Nat Genet. 1999 Jan;21(1 Suppl):20-4. Review
- Lisnock J, Griffin P, Calaycay J, Frantz B, Parsons J, O'Keefe SJ, LoGrasso P.
Activation of JNK3 alpha 1 requires both MKK4 and MKK7: kinetic characterization of in vitro phosphorylated JNK3 alpha 1.
Biochemistry. 2000 Mar 21;39(11):3141-8.

Loewith R, Hubberstey A, Young D.
Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*.
J Cell Sci. 2000 Jan;113 (Pt 1):153-60.

Lu X, Nemoto S, Lin A.
Identification of c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK)-activating kinase 2 as an activator of JNK but not p38.
J Biol Chem. 1997 Oct 3;272(40):24751-4.

Lu HT, Yang DD, Wysk M, Gatti E, Mellman I, Davis RJ, Flavell RA.
Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice.
EMBO J. 1999 Apr 1;18(7):1845-57.

Mansour SJ, Resing KA, Candi JM, Hermann AS, Gloor JW, Herskind KR, Wartmann M, Davis RJ, Ahn NG.
Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis.
J Biochem (Tokyo). 1994 Aug;116(2):304-14.

Mansour SJ, Candia JM, Gloor KK, Ahn NG.
Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 mediate similar transcriptional and morphological responses.
Cell Growth Differ. 1996 Feb;7(2):243-50.

Marinus MG, Morris NR
Isolation of desoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12.
J Bacteriol. 1973 Jun; 114(3):1143-50

Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S, Nishida E.
T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A.
J Biol Chem. 1998 May 15;273(20):12378-82.

Meier R, Rouse J, Cuenda A, Nebreda AR, Cohen P.
Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells.
Eur J Biochem. 1996 Mar 15;236(3):796-805.

Meyer CF, Wang X, Chang C, Templeton D, Tan TH.
Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 signaling cascade in mediating kappaB enhancer activation.
J Biol Chem. 1996 Apr 12;271(15):8971-6.

Merritt SE, Mata M, Nihalani D, Zhu C, Hu X, Holzman LB.
The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate.
J Biol Chem. 1999 Apr 9;274(15):10195-202.

Minden A, Karin M.

Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases.

Biochim Biophys Acta. 1997 Oct 24;1333(2):F85-104. Review.

Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida Ki.

A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion.

J Biol Chem. 1997 Jun 27;272(26):16657-62.

Mohit AA, Martin JH, Miller CA.

p493F12 kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system.

Neuron. 1995 Jan;14(1):67-78.

Moriguchi T, Toyoshima F, Masuyama N, Hanafusa H, Gotoh Y, Nishida E.

A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF α and cellular stresses.

EMBO J. 1997 Dec 1;16(23):7045-53.

Muhlenbeck F, Haas E, Schwenzer R, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P, Wajant H.

TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways.

J Biol Chem. 1998 Dec 4;273(49):33091-8.

Musti AM, Treier M, Bohmann D.

Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases.

Science. 1997 Jan 17;275(5298):400-2.

Nagata Y, Nishida E, Todokoro K.

Activation of JNK signaling pathway by erythropoietin, thrombopoietin, and interleukin-3.

Blood. 1997 Apr 15;89(8):2664-9.

Nakielnny S, Cohen P, Wu J, Sturgill T.

MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase.

EMBO J. 1992 Jun;11(6):2123-9.

Nishina H, Bachmann M, Oliveira-dos-Santos AJ, Kozieradzki I, Fischer KD, Odermatt B, Wakeham A, Shahinian A, Takimoto H, Bernstein A, Mak TW, Woodgett JR, Ohashi PS, Penninger JM.

Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes.

J Exp Med. 1997 Sep 15;186(6):941-53.

Nishina H, Vaz C, Billia P, Nghiem M, Sasaki T, De la Pompa JL, Furlonger K, Paige C, Hui C, Fischer KD, Kishimoto H, Iwatsubo T, Katada T, Woodgett JR, Penninger JM.

Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4.

Development. 1999 Feb;126(3):505-16.

No D, Yao TP, Evans RM.

Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 16;93(8):3346-51.

O'Farrell PH.

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.

J Biol Chem. 1975 May 25;250(10):4007-21.

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J.

Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice.

Science. 1999 Nov 12;286(5443):1374-7.

Patton WF, Lim MJ, Shepro D.

Protein detection using reversible metal chelate stains.

Methods Mol Biol. 1999;112:331-9. Review

Patton WF.

A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics.

Electrophoresis. 2000 Apr;21(6):1123-44. Review.

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW.

Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase).

EMBO J. 1991 Apr;10(4):885-92.

Peng X, Angelastro JM, Greene LA.

Tyrosine phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase 4 in response to growth factors.

J Neurochem. 1996 Mar;66(3):1191-7.

Printen JA, Sprague GF Jr.

Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade.

Genetics. 1994 Nov;138(3):609-19.

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR.

Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases.

Nature. 1991 Oct 17;353(6345):670-4.

Rabilloud T.

A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains.

Electrophoresis. 1992 Jul;13(7):429-39.

Rabilloud T, Brodard V, Peltre G, Righetti PG, Etori C.

Modified silver staining for immobilized pH gradients.

Electrophoresis. 1992 Apr;13(4):264-6.

Rabilloud T.

Solubilization of proteins for electrophoretic analyses.

Electrophoresis. 1996 May;17(5):813-29. Review.

Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ.

Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine.

J Biol Chem. 1995 Mar 31;270(13):7420-6.

Raingaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ.

MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.

Mol Cell Biol. 1996 Mar;16(3):1247-55.

Reiser V, Ruis H, Ammerer G.

Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Mol Biol Cell. 1999 Apr;10(4):1147-61.

Resing KA, Ahn NG.

Deuterium exchange mass spectrometry as a probe of protein kinase activation. Analysis of wild-type and constitutively active mutants of MAP kinase kinase-1.

Biochemistry. 1998 Jan 13;37(2):463-75.

Righetti PG, Gianazza E, Bjellqvist B.

Modern aspects of isoelectric focusing: two-dimensional maps and immobilized pH gradients.

J Biochem Biophys Methods. 1983 Sep;8(2):89-108. Review.

Rincon M, Whitmarsh A, Yang DD, Weiss L, Derijard B, Jayaraj P, Davis RJ, Flavell RA.

The JNK pathway regulates the *In vivo* deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes.

J Exp Med. 1998 Nov 16;188(10):1817-30.

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR.

A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.

Cell. 1994 Sep 23;78(6):1027-37.

Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, Schreiber M, David JP, Jochum W, Wagner EF, Karin M.

JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development.

Curr Biol. 1999 Feb 11;9(3):116-25.

Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP, Ley SC.

Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase.

EMBO J. 1996 Feb 15;15(4):817-26.

Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ.

MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade.

Science. 1998 Sep 11;281(5383):1668-71.

Schagger, H. & von Jagow, G. (1991) Anal.

Biochem. 199, 223-231

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr.

Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.

Biochem Biophys Res Commun. 1967 Sep 7;28(5):815-20. No abstract available.

Seger R, Krebs EG.

The MAPK signaling cascade.

FASEB J. 1995 Jun;9(9):726-35. Review.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M.

Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.

Anal Chem. 1996 Mar 1;68(5):850-8.

Steinberg TH, Haugland RP, Singer VL.

Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains.

Anal Biochem. 1996 Aug 1;239(2):238-45.

Steinberg TH, Chernokalskaya E, Berggren K, Lopez MF, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF.

Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain.

Electrophoresis. 2000 Feb;21(3):486-96.

Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y.

JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes.

Cell. 1994 Jun 3;77(5):727-36.

Syu LJ, Guan KL, Saltiel AR.

Inducible expression of a mutant form of MEK1 in Swiss 3T3 cells.

J Cell Biochem. 1997 Dec 1;67(3):367-77.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM.
Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN.
Science. 1998 Jun 5;280(5369):1614-7.

Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M.
Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis.
Cell. 2000 Jul 21;102(2):221-31.

Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ.
Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 8;94(14):7337-42.

Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ.
The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases.
Mol Cell Biol. 1999 Feb;19(2):1569-81.

Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E.
A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators.
Nat Cell Biol. 2000 Feb;2(2):110-6.

Urwin VE, Jackson P.
Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labelled with the fluorophore monobromobiamine prior to first to first-dimensional isoelectric focusing: imaging of fluorescent protein spot patterns using a cooled charge-coupled
Anal Biochem. 1993 Feb 15;209(1): 57-62.

Wang Y, Su B, Sah VP, Brown JH, Han J, Chien KR.
Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells.
J Biol Chem. 1998 Mar 6;273(10):5423-6.

Wu Z, Wu J, Jacinto E, Karin M.
Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase.
Mol Cell Biol. 1997 Dec;17(12):7407-16.

Welham MJ, Duronio V, Sanghera JS, Pelech SL, Schrader JW.
Multiple hemopoietic growth factors stimulate activation of mitogen-activated protein kinase family members.
J Immunol. 1992 Sep 1;149(5):1683-93.

Westwick JK, Bielawska AE, Dbaiibo G, Hannun YA, Brenner DA.
Ceramide activates the stress-activated protein kinases.
J Biol Chem. 1995 Sep 29;270(39):22689-92.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL.
Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.
Physiol Rev. 1999 Jan;79(1):143-80. Review.

Whitmarsh AJ, Davis RJ.
Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals.
Trends Biochem Sci. 1998 Dec;23(12):481-5. Review.

Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ.
A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation.
Science. 1998 Sep 11;281(5383):1671-4.

Wysk M, Yang DD, Lu HT, Flavell RA, Davis RJ.
Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 30;96(7):3763-8.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME.
Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis.
Science. 1995 Nov 24;270(5240):1326-31.

Xia Y, Wu Z, Su B, Murray B, Karin M.
JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension.
Genes Dev. 1998 Nov 1;12(21):3369-81.

Xu S, Robbins DJ, Christerson LB, English JM, Vanderbilt CA, Cobb MH.
Cloning of rat MEK kinase 1 cDNA reveals an endogenous membrane-associated 195-kDa protein with a large regulatory domain.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 May 28;93(11):5291-5.

Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K.
Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction.
Science. 1995 Dec 22;270(5244):2008-11.

Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, Flavell RA.
Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):3004-9.

Yang D, Kuan C, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene.

Nature. 1997 Oct 23;389(6653):865-70.

Yang X, Gabuzda D.

Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway.

J Virol. 1999 Apr;73(4):3460-6.

Yang H, Lu D, Raizada MK.

Angiotensin II-induced phosphorylation of the AT1 receptor from rat brain neurons.

Hypertension. 1997 Sep;30(3 Pt 1):351-7.

Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ.

The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins.

Mol Cell Biol. 1999 Oct;19(10):7245-54.

Yu H, Li X, Marchetto GS, Dy R, Hunter D, Calvo B, Dawson TL, Wilm M, Anderregg RJ, Graves

LM, Earp HS.

Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation.

J Biol Chem. 1996 Nov 22;271(47):29993-8.

Yan M, Dai T, Deak JC, Kyriakis JM, Zon LI, Woodgett JR, Templeton DJ.

Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1.

Nature. 1994 Dec 22-29;372(6508):798-800.

Yao Z, Diener K, Wang XS, Zukowski M, Matsumoto G, Zhou G, Mo R, Sasaki T, Nishina H, Hui CC, Tan TH, Woodgett JP, Penninger JM.

Activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal protein kinases (SAPKs/JNKs) by a novel mitogen-activated protein kinase kinase.

J Biol Chem. 1997 Dec 19;272(51):32378-83.

Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, Kyriakis J, Liu FF, Woodgett JR.

The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat.

Curr Biol. 1996 May 1;6(5):606-13.

Zheng C, Xiang J, Hunter T, Lin A.

The JNKK2-JNK1 fusion protein acts as a constitutively active c-Jun kinase that stimulates c-Jun transcription activity.

J Biol Chem. 1999 Oct 8;274(41):28966-71.

Zinck R, Cahill MA, Kracht M, Sachsenmaier C, Hipskind RA, Nordheim A.

Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1.

Mol Cell Biol. 1995 Sep;15(9):4930-8.

Publikationen

Wolter S, Lenz P, Thiefes A, Resch K and Kracht M

„Analysis of the cellular function of MAP kinase kinase 7 by two-dimensional electrophoresis“

Immunobiol. 200 (1999) 3-5:716

2nd Joint Meeting 'Cytokines in Inflammation' der Dgfl und der GCI, 11-14.05.2000 in Lübeck: „Analysis of the cellular function of MAP kinase kinase 7 by two-dimensional electrophoresis“, Wolter S, Thiefes A, Kammer W, Resch K and Kracht M

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Resch danke ich für das Interesse an dem Thema und die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut zu bearbeiten.

Bei Herrn PD Dr. Michael Kracht bedanke ich mich für die sehr gute Betreuung, die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. W. H. Müller bedanke ich mich für die Übernahme des Referats.

Bei meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken, besonders bei Solveig Kälble für ihre kompetente technische Assistenz. Ebenfalls danken möchte ich den „Ehemaligen“ Frau Dr. Andrea Krause und Petra Lenz für ihre Unterstützung.

Allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie möchte für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima danken. Besonders danken möchte ich Frau Annette Garbe für ihre Unterstützung bei den FACS Untersuchungen, Herrn Dr. R. Schwinzer für die bei der FACS-Sortierung, Frau Dr. Uschi Dreikhausen für ihre Hilfsbereitschaft und Frau Dr. Eveline Sowa für ihre Diskussion und Unterstützung in Labor- und Alltagsfragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Sabine Wolter

Geburtsdatum: 20.11.1964
Geburtsort: Wolfenbüttel

Anschrift: Gosewischs Garten 4
30855 Langenhagen

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1971 - 1975 Grundschule Am Schwarzen Berge, Braunschweig
1975 - 1977 Orientierungsstufe Nibelungenplatz, Braunschweig
1977 - 1984 Gymnasium Ricarda-Huch-Schule, Braunschweig
Abschluß: Abitur

Studium:

1984 - 1986 TU Braunschweig
Studienfach: Informatik

Berufsfachschule:

1986 - 1988 Dr. von Morgenstern Schule
Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin

Berufstätigkeit:

1988 - 1990 Beschäftigung als BTA bei Salzgitter Industriebau GmbH

Studium:

Oktober 1990 Studium an der Universität Hannover
Studienfach: Biochemie

Dezember 1992 Vordiplom

Diplomarbeit:

11/1996 - 05/1997 Niedersächsisches Institut für Peptidforschung,
Abteilung: Molekularbiologie bei PD Dr. J. Mägert
Thema: Heterologe Expression und protein-
chemische Charakterisierung eines neuen humanen
Serin- Protease- Inhibitors vom Kazal-Typ

seit Januar 1998

Anfertigung der Dissertation im Institut für
Pharmakologie (Prof. Dr. K. Resch),
Medizinische Hochschule Hannover
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Kracht

Eidesstattliche Erklärung

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

Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Sabine Wolter