

Untersuchungen zur
spezifischen Funktion von JNK-Signalwegen mit
Hilfe von zellpermeablen Peptiden und *Tandem
Affinity Purification*

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biochemiker
David Alexander Holzberg
geboren am 19.11.1974 in Goslar

Hannover, 2004

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves
Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen
Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Michael Kracht
Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen
Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 05.02.2004

Zusammenfassung

MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Signalwege bestehend aus MAP-3-Kinase (MKKK), MAP-2-Kinasen (MKK) und MAP-Kinasen (MAPK) stellen ein universelles Prinzip dar, welches Zellen in die Lage versetzt, Signale geordnet von der Zelloberfläche über das Zytoplasma in den Zellkern weiterzuleiten. Entsprechend sind diese sogenannten Signalkaskaden an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Ereignissen beteiligt, so dass sie sich für die Intervention in unzählige physiologische und pathophysiologische Prozesse eignen. Aufgrund ihrer universellen Bedeutung birgt die generelle Blockade eines oder mehrerer dieser Signalwege allerdings gleichzeitig auch ein enormes Gefahrenpotential für die einzelne Zelle oder den gesamten Organismus. Sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die potentielle klinische Anwendung ist daher die Entwicklung von Strategien zur selektiven Modulation von MAP-Kinase-Signalwegen wünschenswert.

Ein entscheidender Schritt zum Verständnis des koordinierten Ablaufs der MAP-Kinase-Signalwege war die Entdeckung von sogenannten *docking sites*, kurzen Aminosäuresequenzen in Substraten, die die Affinität und damit die lokale Konzentration eines bestimmten MAP-Kinase-Substrat-Komplexes determinieren. Dieser Mechanismus zur Erzeugung und Aufrechterhaltung von Spezifität stellt somit eine potentielle Zielstruktur zur selektiven Manipulation von MAP-Kinase-abhängigen Prozessen dar.

Zur Herstellung zellpermeabler Kompetitoren, die mit der von MAP-Kinase-Kaskaden vermittelten Signaltransduktion interferieren können, wurde in dieser Arbeit daher das Wissen über solche *docking sites* mit der Technik der Zelltransduktion mittels Internalisierungssequenzen kombiniert. Dabei wurden verschiedene Strategien zur Modulation zweier ausgewählter, hochaffiner Signalkomplexe aus dem JNK MAP-Kinase-Signalweg evaluiert:

Im ersten Teilprojekt wurde durch Expression in Bakterien ein Protein, welches aus der Internalisierungssequenz des *Drosophila* Transkriptionsfaktors Antennapedia (ANTP) und der Interaktionssequenz des Aktivatorproteins TAB1 mit der MAP-3-Kinase TAK1 besteht (ANTP-TAB1C), hergestellt. Als Kontrolle wurde außerdem ein ANTP-GFP-Protein exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Eigenschaften dieser Proteine eindeutig durch die Hydrophobizität der ANTP-Sequenz dominiert werden. So konnte eine Internalisierung in HeLa-Zellen weder für ANTP-TAB1C noch ANTP-GFP detektiert werden, vielmehr wurde eine starke, unspezifische Interaktion mit der Plasmamembran der Zellen beobachtet. Als Konsequenz der fehlenden Zelltransduktion wurden auch keine funktionellen Effekte auf TAK1-TAB1-abhängige Signaltransduktion festgestellt. Diese Arbeiten lieferten zwar wesentliche Erkenntnisse über die methodischen Limitationen bei der Applikation zellpermeabler ANTP-Proteine, wurden jedoch aufgrund der fehlenden Funktionalität eingestellt.

Im zweiten Teilprojekt wurde ein Ansatz mit einem synthetisch hergestellten Peptid, welches aus der TAT-Internalisierungssequenz und der Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors c-JUN an die MAP-Kinase JNK besteht (TAT-c-JUN (wt)), erfolgreich zur hochselektiven Manipulation des JNK-Signalweges verfolgt.

In initialen Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid die c-JUN-JNK-Interaktion *in vitro* und *in vivo* sehr effektiv hemmt. Darüber hinaus wurde TAT-c-JUN (wt) von 100% der Zellen in einer konzentrations- und zeitabhängigen Weise aufgenommen. Dieses Peptid hat einen starken und hochspezifischen apoptotischen Effekt auf verschiedene getestete Zelllinien, der molekular aufgeklärt werden konnte. Die aus diesen Versuchen abgeleitete antiapoptische Wirkung von c-JUN wurde mittels RNAi (RNA Interferenz) gegen c-JUN bestätigt. Die Erkenntnisse aus den eigenen Arbeiten konnten schließlich mit bereits publiziertem Wissen zu einem Modell über die Funktion des c-JUN-JNK-Komplexes - bzw. der Phosphorylierung von c-JUN - für die Regulation von Zellwachstum kombiniert werden.

In einer DNA-*Microarray*-Analyse in primären humanen Fibroblasten konnten mit Hilfe des TAT-c-JUN (wt) Peptides und des niedermolekularen JNK-Inhibitors SP600125 zum erstem Mal drei Gruppen an entzündungsrelevanten Genen unterschieden werden, deren IL-1-induzierte Expression entweder von c-JUN, von JNK oder von beiden abhängig ist. Diese Ergebnisse konnten somit dazu verwendet werden, mit dem etablierten, aber stark vereinfachten "JNK-c-JUN-AP-1"-Paradigma zu brechen, da AP-1-Zielgene identifiziert wurden, die JNK- nicht jedoch c-JUN-abhängig reguliert wurden. Die biologische Funktion von c-JUN im Kontext der Entzündungsantwort wurde durch Bestätigung ausgewählter Ergebnisse nach Etablierung eines siRNA-vermittelten, transienten c-JUN *knock downs* in den primären Fibroblasten bekräftigt.

In einem alternativen experimentellen Ansatz wurde darüberhinaus eine Methode zur weiteren Aufklärung des JNK-Signalweges etabliert. Die *tandem affinity purification* ermöglicht es Bindungspartner eines ausgewählten Zielproteins zu identifizieren und wurde in Hefen bereits erfolgreich zur Darstellung einer Vielzahl verschiedener Proteinkomplexe eingesetzt. In dieser Arbeit konnte ein Protokoll zur Aufreinigung JNK-bindener Proteine aus Säugerzellen etabliert werden, und im analytischen Maßstab konnten JNK-Substrate, die IL-1-abhängig phosphoryliert werden, dargestellt werden. In einem präparativen Ansatz wurden acht JNK-bindene Proteine in sequenzierbaren Mengen gewonnen.

Die hier vorliegende Arbeit beschreibt somit einerseits einen hochselektiven, zellpermeablen Inhibitor von Protein-Protein-Interaktionen im JNK-Signaltransduktionsweg sowie die Etablierung einer Technik zur Identifikation weiterer JNK-Interaktionspartner. Kombiniert, könnten beide Ansätze effektiv zur weiteren Aufklärung JNK-abhängiger Prozesse genutzt werden. Darüberhinaus könnten zellpermeable Peptide wie TAT-c-JUN (wt) in der Zukunft in der Tumorthherapie oder zur Modulation von bestimmten Aspekten der Entzündung eingesetzt werden, wenn ihre Applikation gekoppelt an molekular-pathogenetische Erkenntnisse zur Rolle von Multienzymkomplexen im JNK-Signalweg erfolgt.

Schlagwörter: JNK, zellpermeable Peptide, *tandem affinity purification*

Abstract

MAP (mitogen activated protein) kinase signalling pathways consist of three-tiered core modules comprising MAP-3 kinases (MKKKK), MAP-2 kinases (MKK) and MAP-kinases (MAPK). They represent a general cytosolic mechanism enabling cells to transduce signals from the plasma membrane to the nucleus. Because these pathways are involved in the regulation of a plethora of biological effects they are attractive targets for the modulation of numerous physiological and pathophysiological processes. For the same reason unspecific blockade of MAP kinase activation carries great risks for cells and the organism as a whole. Therefore, the development of strategies aimed at selective modulation of MAP kinase signalling pathways is highly desirable for both, basic research and for clinical applications.

A major step towards the understanding of coordinated and specific transduction of signals within MAP kinase cascades was the discovery of so-called docking sites. The latter are short stretches of amino acids in MAP kinase substrates, which determine the affinity and, therefore, the concentration of a particular MAP kinase-substrate protein complex. This mechanism which generates and maintains specificity is, therefore, a potential target for selective manipulation of MAP kinase dependent biological effects.

The aim of this thesis was to combine the existing knowledge on docking sites with the technique of protein transduction by fusing small internalisation sequences to known MAP kinase docking sites to create cell-permeable inhibitors of MAP kinase mediated signaltransduction. Two high-affinity signalling complexes of the JNK pathway were chosen to evaluate this strategy.

In the first part of the project the internalisation sequence of the *Drosophila* transcription factor Antennapedia (ANTP) was fused to the C-terminal part of the adaptor protein TAB1 (ANTP-TAB1C). TAB1 forms a complex with the MAP-3 kinase TAK1, an upstream activator of JNK and p38 MAP kinase, and the C-terminus of TAB1 is required for TAK1 binding and activation. Recombinant ANTP-TAB1C and -as a control- ANTP-GFP were produced in bacteria. Both proteins did not transduce efficiently and were retained in the plasma membrane of HeLa cells, presumably because of the hydrophobic nature of the ANTP sequence. In agreement with the lack of cell transduction no functional effects on TAK1-TAB1 mediated signaltransduction was observed. These experiments gave important insights into technical limitations of the ANTP-based method of cell transduction, but were not pursued further with regard to the TAK1-TAB1 signalling complex.

The aim of the second part of the project was to disrupt the signalling complex of the protein kinase JNK with its substrate, the transcription factor c-JUN. For this purpose a peptide was synthesized containing the TAT internalisation sequence and the docking site for JNK that has been identified in c-JUN (TAT-c-JUN (wt)). Initial experiments revealed, that this peptide efficiently interfered with the c-JUN-JNK interaction *in vitro* and *in vivo*. Moreover TAT-c-JUN (wt) was internalized by 100% into cells in culture in a dose- and time-dependent manner. TAT-c-JUN (wt) strongly and specifically induced apoptosis in several tested cell lines, by a mechanism

that involves upregulation of the cell cycle inhibitor p21. These and additional experiments using siRNA molecules directed against endogenous c-JUN support an anti-apoptotic function of c-JUN. Collectively, these results are compatible with published data on the role of the c-JUN-JNK complex, and of c-JUN phosphorylation in cell survival and cell death.

Application of TAT-c-JUN (wt) and the JNK inhibitor SP600125 to human primary fibroblasts and subsequent DNA microarray analysis allowed the identification of three distinct groups of inflammatory genes, whose IL-1 induced expression was either dependent on c-JUN, on JNK or on both. The discovery of AP-1 target-genes, which are controlled by JNK but not by c-JUN, demonstrates, that the established "JNK-c-JUN-AP-1"-paradigm is most likely an oversimplification. The biological functions of c-JUN in the context of the inflammatory response were further validated by applying RNAi technology against c-JUN in human primary fibroblasts.

To reveal additional signalling complexes within the JNK pathway that might be amenable to disruption by cell-permeable peptides tandem affinity purification was used. This technique allows the identification of multiple binding partners of a selected protein and has been successfully used in yeast to isolate numerous distinct multiprotein complexes. In this thesis a protocol for the purification of JNK-binding proteins from mammalian cells was established. Thereby, endogenous JNK substrates, which were phosphorylated upon stimulation by IL-1, could be purified at an analytical scale. Finally, at a preparative scale, amounts sufficient for protein sequencing were isolated from eight JNK-binding partners.

The work presented describes the characterization and use of a highly-selective cell-permeable inhibitor of the JNK-c-JUN signalling complex as well as the usage of a novel technique for the purification of protein complexes within the JNK signalling pathway. In combination, both approaches will be very powerful to reveal novel biological functions of JNK. Peptides like TAT-c-JUN (wt) may be applicable for tumor therapy, or, for the modulation of particular aspects of the inflammatory response, if they are rationally designed and evaluated based on molecular knowledge -as demonstrated in this work.

keywords: JNK, cell-permeable peptides, tandem affinity purification

1	EINLEITUNG	1
1.1	PROTEINKINASEN - PROTOTYPISCHE SIGNALMOLEKÜLE ZWISCHEN REZEPTOR UND ZELLKERN	1
1.1.1	<i>Aufbau von MAP-Kinase-Signalwegen</i>	1
1.1.2	<i>Erzeugung von Spezifität in MAP-Kinase-Signalkaskaden</i>	3
1.1.3	<i>Der JNK-Signalweg</i>	4
1.1.3.1	Die MAP-Kinase JNK	4
1.1.3.2	Aufbau des JNK-Signalweges	6
1.1.3.2.1	MAP-2-Kinasen des JNK-Signalweges	6
1.1.3.2.2	MAP-3-Kinasen des JNK-Signalweges	6
1.1.3.2.3	<i>Scaffold-Proteine des JNK-Signalweges</i>	7
1.1.3.2.4	Substrate der MAP-Kinase JNK	7
1.1.3.3	Der Transkriptionsfaktor c-JUN: Wichtigstes JNK-Substrat und Mitglied der AP-1-Familie von Transkriptionsfaktoren	9
1.1.3.4	Hemmung der JNK-Aktivität: JNK als therapeutische Zielstruktur?	12
1.1.4	<i>Die MAP-3-Kinase TAK1 wird durch das Adaptorprotein TAB1 reguliert</i>	13
1.1.4.1	Die MAP-3-Kinase TAK1	13
1.1.4.2	Das Adaptorprotein TAB1	13
1.1.4.3	Regulation von TAK1 durch TAB1, TAB2 und TAB3	14
1.1.5	<i>In vivo Proteintransduktion mittels zellpermeabler Internalisierungssequenzen</i>	16
1.1.6	<i>Aufgabenstellung</i>	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	VERBRAUCHSMATERIAL	21
2.2	GERÄTE	21
2.3	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	22
2.4	ENZYME UND ENZYMPUFFER	22
2.5	ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN	22
2.6	KITS UND GEBRAUCHSFERTIGE REAGENZIEN UND MATERIALIEN	25
2.7	OLIGONUKLEOTIDE	25
2.8	ANTIKÖRPER UND REKOMBINANTE PROTEINE	26
2.9	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	28
2.10	PEPTIDE	29
2.11	STANDARDS	29
2.12	ZELLKULTURTECHNIKEN	30
2.12.1	<i>Zelllinien und primäre Zellen</i>	30
2.12.2	<i>Kultivierung und Passagieren adhärent wachsender Zellen</i>	30

2.12.3	<i>Zellzählung und Vitalitätsbestimmung</i>	31
2.12.4	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	31
2.12.5	<i>Stimulation mit IL-1 und Ernten von Zellen</i>	31
2.12.6	<i>Transfektion</i>	32
2.12.6.1	Transiente Transfektion von Zelllinien mit der Kalziumphosphat-Methode	32
2.12.6.2	Herstellung eines stabilen Transfektanten-Zellpools	32
2.12.6.3	Etablierung eines genspezifischen <i>knock downs</i> durch Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA-Molekülen	33
2.12.6.3.1	Transfektion von siRNA-Molekülen mit TransIT-TKO	33
2.12.6.3.2	Transfektion von siRNA-Molekülen mit Oligofectamine	34
2.13	ARBEITEN MIT BAKTERIENKULTUREN	34
2.13.1	<i>Herstellung kompetenter Bakterien</i>	34
2.13.2	<i>Herstellung von Dauerkulturen</i>	34
2.14	MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	35
2.14.1	<i>Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren</i>	35
2.14.1.1	Minipräparation	35
2.14.1.2	Maxipräparation	35
2.14.1.3	Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien	35
2.14.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.14.2	<i>Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA</i>	36
2.14.3	<i>Extraktion von DNA aus Agarosegelen</i>	36
2.14.4	<i>Herstellung pro- und eukaryotischer Expressionsplasmide</i>	37
2.14.4.1	Polymerasekettenreaktion zur Generierung linearer DNA-Fragmente	37
2.14.4.2	Präparation des PCR-Produktes: Restriktionsverdau und Aufreinigung	38
2.14.4.3	Präparation des Zielvektors: Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Aufreinigung	38
2.14.4.4	Ligation	39
2.14.4.5	Transformation	39
2.14.4.6	Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten mittels der TOPO-Technologie	40
2.14.4.7	Identifikation positiver bakterieller Einzelklone	40
2.14.5	<i>Fluoreszenzsequenzierung von Plasmid-DNA</i>	41
2.14.6	<i>RT-PCR zur Amplifikation spezifischer mRNA-Sequenzen</i>	41
2.14.7	<i>DNA-Microarray-Analyse</i>	43
2.15	PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN	43
2.15.1	<i>Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen</i>	43
2.15.1.1	Lysate zur Immunodetektion im Western-Blot	44
2.15.1.2	Lysate zur Messung von Reporter-genaktivitäten	44
2.15.1.3	Lysate zur Herstellung von 100000xg-Überständen	45

2.15.1.4	Direktlysate	45
2.15.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
2.15.3	Bestimmung der Aktivität von Enzymen	46
2.15.3.1	Reporter-gen-Versuche	46
2.15.3.1.1	Luziferase-Messung	46
2.15.3.1.2	β -Galaktosidase-Messung	47
2.15.3.2	<i>in vitro</i> Kinaseversuch zur Bestimmung der Aktivität von JNK	47
2.15.3.2.1	Mit endogener JNK	47
2.15.3.2.2	Mit überexprimierter JNK-TAPtag	48
2.15.3.2.2.1	Mit Substrat GST-c-JUN	48
2.15.3.2.2.2	Ohne Substrat GST-c-JUN	49
2.15.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	49
2.15.4.1	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli	49
2.15.4.2	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger und Jagow	50
2.15.5	Färbemethoden zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen	52
2.15.5.1	Färbung von Proteingelen mit Coomassie	52
2.15.5.2	Färbung von Proteingelen mit Fluoreszenzfarbstoffen	52
2.15.5.3	Färbung von Proteingelen mit Silber	52
2.15.6	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot) und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion	53
2.15.7	Expression und Aufreinigung von Histag-Fusionsproteinen	54
2.15.7.1	Induktion der Expression	54
2.15.7.2	Aufreinigung	54
2.15.7.2.1	Aufreinigung unter nativen Bedingungen	54
2.15.7.2.2	Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen	56
2.15.8	Aufreinigung von TAPtag-Fusionsproteinen	57
2.15.8.1	Hintergrund	57
2.15.8.2	Aufreinigung	58
2.15.9	ELISA für das Chemokin IL-8	61
2.16	ZELLBIOLOGISCHE TECHNIKEN	61
2.16.1	Behandlung von Zellen mit zellpermeablen Peptiden und Visualisierung der Internalisierung durch Fluoreszenzmikroskopie	61
2.16.2	Chromatinfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342	61
2.16.3	Messung der Zellproliferationsrate mittels Einbau von ^3H -Thymidin	61
3	ERGEBNISSE	63
3.1	HERSTELLUNG ZELLPERMEABLER TAB1-PROTEINE ZUR MANIPULATION TAK1-TAB1-ABHÄNGIGER PROZESSE	63
3.1.1	Bakterielle Expression eines ANTP-TAB1C-Proteins	63

3.1.2	<i>Synthese und Charakterisierung der Peptide TAT-TAB1C3 (wt) und TAT-TAB1C3 (scr.)</i>	73
3.2	CHARAKTERISIERUNG UND EINSATZ EINES ZELLPERMEABLEN TAT-C-JUN PEPTIDES	78
3.2.1	<i>Initiale Charakterisierung der Peptide TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.)</i>	78
3.2.2	<i>Effekte des Peptides TAT-c-JUN (wt) auf das Überleben und Proliferationsverhalten von HeLa-Zellen</i>	85
3.2.3	<i>Effekte des Peptides TAT-c-JUN (wt) auf die Expression IL-1-abhängiger entzündlicher Gene</i>	90
3.2.4	<i>Bestätigung der durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid hervorgerufen Phänotypen in HeLa- und HuGi-Zellen mittels siRNAs gegen c-JUN</i>	99
3.3	TANDEM AFFINITY PURIFICATION VON JNK-TAPTAG	102
3.3.1	<i>Klonierung des Vektors pIND-JNK2TAPtag</i>	102
3.3.2	<i>Ponasteron-induzierbare Expression des Fusionproteins JNK2-TAPtag</i>	108
3.3.3	<i>Identifikation JNK-TAPtag bindener Proteine</i>	112
4	DISKUSSION	117
4.1	ERHÖHUNG DER BIOPERMEABILITÄT GELADENER MAKROMOLEKÜLE MIT HILFE VON PEPTID-INTERNALISIERUNGSSEQUENZEN	117
4.1.1	<i>Evaluierung der Internalisierung rekombinant hergestellter ANTP-Fusionsproteine</i>	118
4.1.2	<i>Synthetisch hergestellte, zellpermeable TAT-Peptide als molekulare Werkzeuge und ihr Einsatz zur Funktionsanalyse ausgewählter Proteine</i>	120
4.1.2.1	<i>Charakterisierung des Peptides TAT-TAB1C3 (wt)</i>	120
4.1.2.2	<i>Charakterisierung und Einsatz des Peptides TAT-c-JUN (wt)</i>	121
4.1.2.2.1	<i>Initiale Charakterisierung des Peptides TAT-c-JUN (wt)</i>	121
4.1.2.2.2	<i>Einfluss von TAT-c-JUN (wt) auf das Überleben von Zellen</i>	122
4.1.2.2.3	<i>Einfluß von TAT-c-JUN (wt) auf die Expression entzündlicher Gene</i>	126
4.2	TANDEM AFFINITY PURIFICATION ALS METHODE ZUR DARSTELLUNG VON PROTEINKOMPLEXEN	131
4.3	AUSBLICK	136
5	LITERATURVERZEICHNIS	137
6	LEBENS LAUF	149
7	LISTE WISSENSCHAFTLICHER PUBLIKATIONEN	150

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	mmol/l	Millimol pro Liter
µg	Mikrogramm	MMLV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
µl	Mikroliter	mRNA	Boten-RNA
µmol/l	Mikromol pro Liter	MS	Massenspektrometrie
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid	ng	Nanogramm
AAP	Agaroseauftragspuffer	nm	Nanometer
Abb.	Abbildung	OD	optische Dichte (Absorption)
Ac	Acetat	PAA	Polyacrylamid
Amp	Ampicillin	PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
ATP	Adenosintriphosphat	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
bp	Basenpaare	PFA	Paraformaldehyd
BSA	Rinder-Serumalbumin	RNA	Ribonukleinsäure
bzw.	beziehungsweise	rpm	Umdrehungen pro Minute
cDNA	komplementäre DNA	RT	Raumtemperatur/Reverse
cRNA	komplementäre RNA	Transkription	
ca.	circa	s	Sekunden
Ci	Curie	S	Svedberg
d/dd	vor Nukleotiden: desoxy/didesoxy	SDS	Natriumdodecylsulfat
dH ₂ O	destilliertes Wasser	S.E.M.	<i>standard error of the mean,</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser		Standardfehler des Mittelwertes
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ssDNA	einzelsträngige DNA
dsDNA	doppelsträngige DNA	Tab.	Tabelle
DTT	Dithiothreitol	TAE	Tris-Acetat-EDTA
EtBr	Ethidiumbromid	TEA	Triethanolamin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TAP	<i>tandem affinity purification</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TE	Tris-EDTA
Fmoc	<i>9-Fluorenylmethyl Carbamate</i>	TNF	Tumor Nekrose Faktor
g	Gramm	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
GST	Glutathion-S-Transferase	t-RNA	Transfer-RNA
GTP	Guanosintriphosphat	TTP	Thymintriphosphat
h	Stunden	U	Enzymeinheiten
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	UTP	Uridintriphosphat
IL	Interleukin	V	Volt
kb	Kilobasen	vol	Volumenanteil
KO	<i>knock out</i>	vgl.	vergleiche
LB	Lauria Bertoni	v/v	Volumen pro Volumen
LMW	<i>low molecular weight</i> (Abkürzung für Proteinstandard)	w/v	Gewicht pro Volumen
M	Mol pro Liter		
MEK	MAPK/ERK <i>kinase</i>		
MEKK	MAPK/ERK <i>kinase kinase</i>		
mg	Milligramm		
min	Minuten		
MKK	MAP <i>kinase kinase</i>		
ml	Milliliter		

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen - prototypische Signalmoleküle zwischen Rezeptor und Zellkern

Die reversible Modifikation von Aminosäuren in Proteinen ist ein wichtiges Prinzip, welches Zellen in die Lage versetzt, posttranslational die Aktivität von Proteinen zu regulieren. Die häufigste und am besten charakterisierte Proteinmodifikation ist dabei die Phosphorylierung von Hydroxyl-Akzeptorgruppen (Serin-, Threonin- und Tyrosinreste), die durch Proteinkinasen katalysiert wird.

Alle eukaryotischen Proteinkinasen besitzen vergleichbare homologe Kinasedomänen, die aus ca. 250-300 Aminosäuren (Hanks et al., 1988) bestehen und die in zwölf konservierte, dreidimensional ähnlich angeordnete Subdomänen unterteilbar sind (Blank et al., 1996).

Die von MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) vermittelte, reversible Phosphorylierung von Proteinen ist der entscheidende Vorgang bei der Weiterleitung von Zelloberflächensignalen in den Zellkern und ermöglicht es Zellen daher, durch Veränderung der Genexpression auf diese extrazellulären Stimuli zu reagieren.

1.1.1 Aufbau von MAP-Kinase-Signalwegen

Alle eukaryotischen Zellen besitzen multiple MAP-Kinase-Signalwege, von denen jeder präferentiell von einem anderen Stimulus rekrutiert wird, so dass eine koordinierte zelluläre Reaktion auf verschiedene extrazelluläre Signale ermöglicht wird. Diese Stimuli beinhalten unter anderem Wachstumsfaktoren, jede mögliche Art von Zellstress wie z.B. Scherkräfte, aber auch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF oder Neurotransmitter und Hormone. Entsprechend der Vielzahl an eingehenden Signalen regulieren MAP-Kinase-Signalwege auch eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Entwicklung oder Entzündung sowie apoptotische Prozesse.

Von der Hefe bis zum Säuger ist der dreiteilige modulare Aufbau der sogenannten MAP-Kinase-Signalkaskaden erhalten (Kyriakis and Avruch, 2001; Widmann et al., 1999). Die erste Kinase eines solchen Moduls ist dabei stets eine MAP-3-Kinase (MAP-Kinase-Kinase-Kinase), die entweder durch Phosphorylierung durch eine MAP-4-Kinase (MAP-Kinase-Kinase-Kinase-Kinase) oder durch Interaktion mit kleinen GTP-bindenden Proteinen der Ras- und Rho-Familie aktiviert wird. Andere potentielle Wege der Aktivierung von MAP-3-Kinasen sind beispielsweise Oligomerisierung, wie z.B. die Aktivierung von NIK (*nuclear factor kappa B-induced kinase*) durch Oligomerisierung von TRAF-Molekülen (*TNF-receptor associated factor*) oder die Veränderung der subzellulären Lokalisation (Yujiri et al., 1999). MAP-3-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, die nach Aktivierung die nächste Kinase im Modul, die sogenannten MAP-2-Kinasen (MAP-Kinase-Kinase) in einem konservierten Motiv innerhalb der Subdomäne VIII phosphorylieren. MAP-2-

Kinasen sind dualspezifisch, das bedeutet, dass sie ein Threonin-X-Tyrosin-Motiv (Payne et al., 1991) im *activation loop* der Subdomäne VIII der MAP-Kinasen erkennen und beide Reste phosphorylieren (Gartner et al., 1992). MAP-Kinasen schließlich sind die letzte Kinase in diesem dreiteiligen Modul und phosphorylieren ihre Substrate an Serin- oder Threonin-Resten. MAP-Kinasen sind dabei Prolin-gerichtet und benötigen zur Phosphorylierung der Phosphoakzeptor-Aminosäuren in dem Konsensus-Motiv Prolin-X-Serin/Threonin-Prolin (Alvarez et al., 1991; Davis, 1993) ein direkt C-terminal gelegenes Prolin. Viele Substrate von MAP-Kinasen sind Transkriptionsfaktoren, obwohl sie auch eine Reihe anderer Proteine wie Proteinkinasen, Phospholipasen oder Zytoskelettproteine phosphorylieren.

In Säugerzellen sind derzeit fünfzehn MAP-3-Kinasen, sieben MAP-2-Kinasen und zwölf MAP-Kinasen bekannt (Widmann et al., 1999), und die einzelnen MAP-Kinase-Signalwege sind nach ihren entsprechenden MAP-Kinasen benannt. Unterschieden werden dabei die drei am besten charakterisierten MAP-Kinase-Signalwege namentlich der p38,- der ERK1/2- und der JNK-Signalweg sowie die weniger gut untersuchten ERK5- und ERK3/4-Signalwege. Möglicherweise gibt es noch weitere Kinasen, wie ERK7, deren Sequenz MAP-Kinasen ähneln, deren Funktionen aber noch nicht ausreichend untersucht sind (Johnson and Lapadat, 2002). Folgende Abbildung fasst den modularen Aufbau von MAP-Kinase-Signalwegen zusammen:

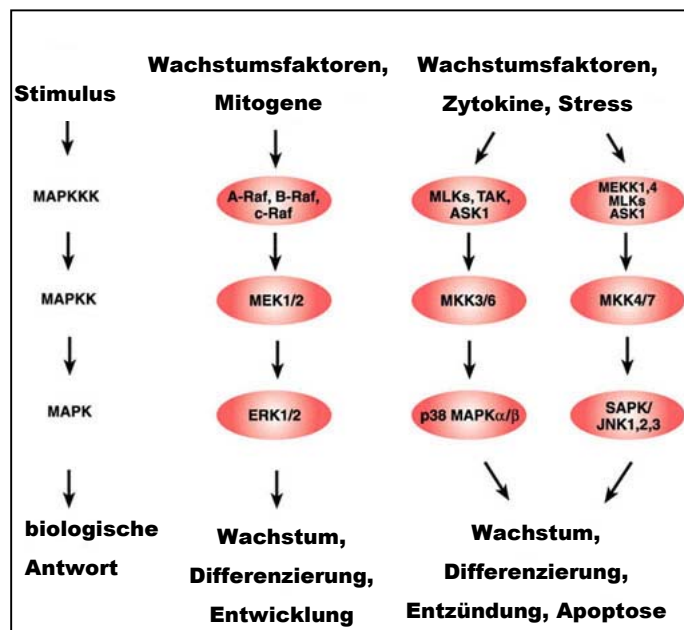


Abbildung 1: Aufbau von MAP-Kinase-Signalkaskaden

modifiziert nach [http://www.cellsignal.com/retail/reference/pathway/MAPK_Cascade.asp]

1.1.2 Erzeugung von Spezifität in MAP-Kinase-Signalkaskaden

Aus dieser Vielfalt von Molekülen ergibt unter anderem die Frage, wie in solchen Signalkaskaden Spezifität erzeugt werden kann.

MAP-3-Kinasen zeigen eine relativ geringe Spezifität und sind in der Lage, jeweils mehrere MAP-2-Kinasen zu phosphorylieren. Eine MAP-3-Kinase ist somit an mehrere MAP-2-Kinase/MAP-Kinase-Module gekoppelt und kann daher einen Schnittpunkt verschiedener MAP-Kinase-Signalwege darstellen.

MAP-2-Kinasen hingegen sind hochspezifische Moleküle, die nicht nur eine lineare Sequenz in der Umgebung des Phosphoakzeptormotivs Threonin-X-Tyrosin in den MAP-Kinasen erkennen (X = Glutamat für EKR; X = Glycin für p38; X = Prolin für JNK), sondern vielmehr auch die dreidimensionale Struktur der MAP-Kinase (Widmann et al., 1999), so dass spezifische MAP-2-Kinase/MAP-Kinase-Module entstehen. Entsprechend stellen die MAP-2-Kinasen auch die Familie mit der geringsten Anzahl an Mitgliedern in den MAP-Kinase-Kaskaden dar.

Zusätzliche Spezifität wird durch die gerichtete Anordnung verschiedener Komponenten einer Kaskade durch *scaffold*-Proteine erreicht. Unter *scaffolds* versteht man dabei Ankerproteine, die in der Zelle als Plattform dienen und durch spezifische Interaktionen mit mehreren Partnern einer MAP-Kinase-Signalkaskade diese in engen, gerichteten Kontakt zueinander bringen (Whitmarsh and Davis, 1998). Die entstehenden Multienzymkomplexe werden auch als Signalosomen bezeichnet (Burack and Shaw, 2000). Das Modellprotein eines *scaffolds* stellt dabei der Faktor Ste5p aus der Hefe dar, der sowohl eine MAP-3-Kinase (Ste11p) als auch eine MAP-2-Kinase (Ste7p) und eine MAP-Kinase (Fus3p) aus einer Kaskade binden kann (Herskowitz, 1995). Neben den Hefen wurden *scaffolds* in der Zwischenzeit auch in Säugern identifiziert, wie z.B. JIP-1 (*JNK interacting protein 1*) für den JNK-Signalweg (vgl. Abb.2) oder MP1 (MEK Partner 1) im ERK1/2-Signalweg, welches sowohl mit ERK1 als auch MEK1 (MAPK/*extracellular signal-regulated kinase kinase*) interagiert (Schaeffer et al., 1998).

Neben diesen *scaffold*-Proteinen spielen *docking sites* eine wichtige Rolle bei der Erzeugung von Spezifität bei der Signalweiterleitung über MAP-Kinase-Kaskaden. *Docking sites* sorgen besonders bei der Enzym-Substrat-Findung auf der Ebene der MAP-Kinasen für die nötige Spezifität, da MAP-Kinasen, wie bereits erwähnt, sehr ähnliche Motive mit der Konsensussequenz Serin/Threonin-Prolin phosphorylieren, welche jedoch in einer Vielzahl von Proteinen vorkommt. Unter *docking sites* versteht man daher kurze, in der Regel N-terminal von den Phosphorylierungsstellen gelegene Sequenzabschnitte innerhalb von Substraten, die ein bestimmtes Substrat zu seiner MAP-Kinase dirigieren (Holland and Cooper, 1999). Die entsprechenden Bindungsstellen in den Kinasen werden als CD (*common docking*) oder ED (Glutamat/Aspartat) *sites* bezeichnet, die häufig negativ geladene Aminosäuren enthalten (Tanoue et al., 2001). Als klassisches Beispiel für eine *docking site* kann die δ -Domäne des Transkriptionsfaktors c-JUN genannt werden, die absolut essentiell für die Aktivierung von c-JUN durch die MAP-Kinase JNK ist (Hibi et al., 1993; Kallunki et al., 1996). Aber auch andere Kinasen können *docking sites* für MAP-Kinasen enthalten, so z.B. die MAPKAP-Kinasen (*mitogen*

activated protein kinase activated protein kinase) RSK und MNK2, die carboxyterminal Bindestellen für ERK aufweisen (Zhao et al., 1996; Waskiewicz et al., 1997).

Die bisher beschriebenen Mechanismen zur Erzeugung von Spezifität werden durch weitere, weniger offensichtlich Strategien ergänzt (Chang and Karin, 2001). So können MAP-Kinasen indirekt die Expression von Liganden und Inhibitoren der Oberflächenrezeptoren, die die Signale in die MAP-Kinase-Kaskaden einspeisen, regulieren. Eine derartige Regulationsschleife spielt z.B. bei der Signalweiterleitung über den EGF-Rezeptor bei der Entwicklung von *Drosophila* eine Rolle (Wasserman and Freeman, 1998). Außerdem kann die Lokalisation einzelner Partner einer Kaskade in der Zelle für eine Erhöhung der Spezifität sorgen; so kolokalisiert MEKK1 (MEK *kinase* 1) mit Bestandteilen des Zytoskeletts und ein Rearrangement des Zytoskeletts kann zur Aktivierung von MEKK1 und in der Folge von JNK führen (Yujiri et al., 1998; Yujiri et al., 2000; Xia et al., 2000).

1.1.3 Der JNK-Signalweg

1.1.3.1 Die MAP-Kinase JNK

Biochemische Studien führten 1990 zur Identifikation und Aufreinigung einer neuen MAP-Kinase, die durch Cycloheximid aktiviert wurde (Kyriakis and Avruch, 1990) und zu der es in Hefen kein Homolog gibt, obwohl MAP-Kinase-Signalwege hochkonserviert sind. Im Gegensatz zu ERK1/2, welche den C-Terminus des Transkriptionsfaktors c-JUN phosphorylieren, bindet diese Kinase den N-Terminus von c-JUN (Adler et al., 1992; Hibi et al., 1993) und phosphoryliert die Aminosäuren Serin 73 und Serin 63 (Pulverer et al., 1991). Entsprechend wurde die Kinase als c-JUN-N-terminale-Kinase (JNK) bezeichnet. In einem alternativen Ansatz wurde JNK auch aus IL-1-behandelter Kaninchenleber isoliert (Kracht et al., 1994). Von zwei Gruppen erfolgte die Klonierung der entsprechenden cDNA (Kyriakis et al., 1994; Derijard et al., 1994). Das Rattenhomolog für die MAP-Kinase JNK wird Streß-aktivierte-Protein-Kinase (SAPK) genannt, obwohl sich die Bezeichnung JNK durchgesetzt hat.

Der JNK-Signalweg wird durch Behandlung von Zellen mit einer fast unüberschaubaren Anzahl extrazellulärer Faktoren, wie Zytokinen (z.B. TNF oder IL-1), jeglicher Art von zellulärem Stress (z.B. osmotischer Stress, oxidativer Stress, Strahlung, Zelldichte), Wachstumsfaktoren (z.B. *epidermal growth factor* = EGF), Zytostatika (z.B. cis-Platin), toxische Substanzen (z.B. Anisomycin) oder Produkten von pathogenen Organismen aktiviert.

Die Familie der JNK-Proteinkinasen wird von drei *Jnk*-Genen kodiert. *Jnk1* und *Jnk2* werden dabei ubiquitär exprimiert, während *Jnk3* hauptsächlich im Gehirn, aber auch im Herzen und den Hoden vorkommt (Finch et al., 2001). Durch alternatives Splicing werden aus diesen drei Genen zehn verschiedene JNK-Isoformen generiert (Gupta et al., 1996):

- JNK1- α 1, JNK1- α 2, JNK1- β 1, JNK1- β 2
- JNK2- α 1, JNK2- α 2, JNK2- β 1, JNK2- β 2
- JNK3- α 1, JNK3- α 2

Die Transkripte, die von diesen drei Genen abgeleitet werden, kodieren entweder für Proteine mit oder ohne eine C-terminale Verlängerung, wodurch die 46kD- und die 55kD-Isoformen entstehen, deren Bedeutung noch nicht aufgeklärt werden konnte. Eine zweite Form des alternativen Spleißens beschränkt sich nur auf *Jnk1* und *Jnk2* und involviert die Auswahl von einem oder zwei alternativen Exons, so dass sich die entstehenden JNK-Isoformen in den Bereichen zwischen den Kinasesubdomänen IX und X unterscheiden. Dieses führt zu einer unterschiedlichen Substratspezifität der JNK-Isoformen, indem die Fähigkeit der JNKs, mit den *docking sites* auf den Substraten zu interagieren, verändert wird (Gupta et al., 1996).

Die Deletion von *Jnk1* oder *Jnk2* oder *Jnk3* in Mäusen führt zu keinen offensichtlichen phänotypischen Veränderungen oder morphologischen Abnormalitäten. *Jnk1*^{-/-}/*Jnk3*^{-/-}-KO-Mäuse sind ebenso wie *Jnk2*^{-/-}/*Jnk3*^{-/-}-KO-Mäuse überlebensfähig (Davis, 2000), während *Jnk1*^{-/-}/*Jnk2*^{-/-}-KO-Mäuse in einem frühen embryonalen Stadium aufgrund von neuronalen Defekten sterben (Sabapathy et al., 1999; Kuan et al., 1999).

Experimente mit Zellen aus *Jnk1*^{-/-}- und *Jnk2*^{-/-}-Mäusen zeigen, dass diesen Genen eine wichtige Funktion in der T-Zell-Immunantwort zukommt. *Jnk1* und *Jnk2* spielen zwar keine Rolle für die Aktivierung (Proliferation und IL-2-Sekretion) von T-Zellen, sind jedoch für die Differenzierung von CD4⁺-Zellen in T_H1- oder T_H2-Effektorzellen (T-Helfer-Zellen) essentiell, so differenzieren CD4⁺ T-Zellen, denen *Jnk1* oder *Jnk2* fehlen, bevorzugt in T_H2-Zellen, die die humorale Immunität gegen Parasiten und extrazelluläre Parasiten vermitteln (Dong et al., 1998; Yang et al., 1998). Darüberhinaus ist die Expansion von CD8⁺, die defizient in *Jnk1* sind, stark vermindert, während *Jnk2* einen negativen Effekt in diesen Zellen auszuüben scheint, da *Jnk2*^{-/-}-CD8⁺-Zellen stark erhöhte Mengen an IL-2 und IFN- γ exprimieren (Arbour et al., 2002; Conze et al., 2002). Die Untersuchung an *Jnk3*-KO-Mäusen erfolgte besonders im Hinblick auf das zentrale Nervensystem, und diese Mäuse sind im Gegensatz zu *Jnk1*-KO-Mäusen und *Jnk2*-KO-Mäusen resistent gegen Kanainsäure-induzierte (ein Glutamatagonist) neuronale Apoptose (Yang et al., 1997). In weiteren Studien mit den oben genannten *knock out* Tieren, wurden den Jnk-Genen zusätzliche Funktionen in neurodegenerativen und metabolischen Erkrankungen sowie der Entstehung von Krebs zugewiesen (Manning and Davis, 2003).

Desweiteren spielt der JNK-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion, die eine entscheidende Komponente der unspezifischen Immunantwort und darüber hinaus die Ursache für eine Reihe chronisch entzündlicher Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn oder Rheumatoide Arthritis) ist. Entzündungsreaktionen werden durch pathogene Mikroorganismen und die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF gesteuert, die zur Aktivierung von JNK und inflammatorischen Zielgenen dieses Signalweges führen können (Kracht et al., 1994; Krause et al., 1998).

1.1.3.2 Aufbau des JNK-Signalweges

Der JNK-Signalweg zeichnet sich mit der Vielzahl an aktivierenden Stimuli und dem Vorhandensein der zehn JNK-Isoformen durch eine fast unüberschaubare Komplexität aus. Der folgende Abschnitt soll daher der Darstellung prinzipieller Mechanismen der Regulation dieses Signalweges dienen.

1.1.3.2.1 **MAP-2-Kinasen des JNK-Signalweges**

Die JNK-Proteine werden durch Phosphorylierung an den Resten Threonin 183 und Tyrosin 185 durch die MAP-2-Kinasen MKK4 (MAP *kinase kinase* 4) und MKK7 (MAP *kinase kinase* 7) aktiviert, die als Gruppen von alternativ gespleißten Isoformen exprimiert werden. Es wurden drei MKK4-Isoformen mit unterschiedlichen N-Termini und sechs MKK7-Isoformen mit verschiedenen N- und C-Termini beschrieben. Der Mechanismus, der für die Entstehung der MKK4-Formen verantwortlich ist, wurde noch nicht identifiziert, während die sechs MKK7-Proteine durch alternatives Spleißen und den Gebrauch verschiedener Promotoren entstehen (Tournier et al., 1999).

Obwohl sowohl MKK4 als auch MKK7 dualspezifische Kinasen sind, zeigen sie Unterschiede in ihrer Substratspezifität. Zum einen kann MKK4 in Gegensatz zu MKK7 auch die p38-MAP-Kinase phosphorylieren (Lin et al., 1995; Derijard et al., 1995), zeigt jedoch eine Präferenz für JNK. Zum anderen phosphorylieren sowohl MKK4 als auch MKK7 JNK an beiden Phosphorakzeptorstellen, jedoch tut MKK4 dieses bevorzugt an Tyrosin 185, MKK7 hingegen an Threonin 183 (Lawler et al., 1998). Entsprechend ist die Aktivierung von JNK durch jeweils nur eine der Kinasen niedrig, durch sowohl MKK4 als auch MKK7 jedoch synergistisch.

Die Deletion von sowohl MKK4 als auch MKK7 ist letal, wobei MKK4^{-/-}-Mäuse vermutlich an Leberapoptose sterben (Ganiatsas et al., 1998), die Ursache für die Letalität von MKK7^{-/-}-Mäusen jedoch nicht geklärt ist. Die Untersuchung der JNK-Aktivierung in MKK4^{-/-}-T-Zellen und MKK7^{-/-}-Zellen zeigte, dass diese nur in letzteren vermindert ist, MKK7 also Funktionen von MKK4 übernehmen kann (Dong et al., 2000). Die Zerstörung des MKK7-Gens ist ausreichend, um die Aktivierung von JNK durch proinflammatorischen Zytokine zu unterbinden (Tournier et al., 2001).

1.1.3.2.2 **MAP-3-Kinasen des JNK-Signalweges**

Die Gruppe der MAP-3-Kinase mit ihren 15 Mitgliedern ist sehr heterogen und über die Beteiligung einer Vielzahl von MAP-3-Kinasen an der Aktivierung des JNK-Signalweges wurde berichtet. Dazu gehören Mitglieder der MEKK-Gruppe (MEKK1-4) oder TAK1 (TGFβ *activated kinase*).

MEKK1 ist eine 196kD große Proteinkinase und ein starker JNK-Aktivator mit Bindestellen für MKK4 und MKK7 sowie für JNK (Xu and Cobb, 1997). MEKK1-defiziente Mäuse zeigen lediglich kleine morphologische Defekte. An Zellen aus diesen Tieren konnte jedoch gezeigt werden, dass MEKK1 für die JNK-Aktivierung als Antwort auf eine ausgewählte Gruppe von Stimuli verantwortlich ist (Yujiri et al., 1998; Yujiri et al., 2000), wie eine Reihe von Zytostatika,

nicht jedoch für IL-1. Die MAP-3-Kinase TAK1 hingegen scheint unter Beteiligung der Adaptorproteine TAB1 und TAB2 (vergl. unten) die IL-1-induzierte JNK-Aktivierung zu vermitteln.

Andere Kinasen, die JNK aktivieren können, sind z.B. ASK1 und ASK2 (ASK = *apoptosis signal-regulating kinase*) sowie Mitglieder der MLK-Familie (*mixed lineage kinase*). Da ein großer Teil dieser Daten jedoch auf der Überexpression dieser Kinasen oder dominant negativer Mutanten beruht, ist es zur Zeit noch schwierig, eine Aussage darüber zu treffen, welche MAP-3-Kinasen für welchen extrazellulären Stimulus *in vivo* relevant sind.

1.1.3.2.3 Scaffold-Proteine des JNK-Signalweges

Protein-Protein-Interaktionen sind von besonderer Bedeutung für den geordneten Ablauf einer durch JNK vermittelten Signaltransduktion. In den letzten Jahren ist es in diesem Zusammenhang gelungen, *scaffolds* des JNK-Signalweges zu identifizieren. Die prominentesten Vertreter sind dabei die Mitglieder der JIP-Familie (JNK *interacting protein*), JIP1, JIP2 und JIP3. (Dickens et al., 1997; Whitmarsh et al., 2001). Weitere *scaffold*-Proteine von JNK sind Filamin, β -Arrestin, JASP1 (JNK/SAPK *associated protein 1*) und p130, die jeweils Bindestellen für eine MAP-3-Kinase, MKK4 oder MKK7 und JNK1, JNK2 oder JNK3 haben (Manning and Davis, 2003). Da der Großteil der Daten in Überexpressionssystemen gewonnen wurde, ist die physiologische Rolle dieser *scaffolds* noch nicht eindeutig geklärt und es läßt sich daher nicht beurteilen, welchen funktionellen Einfluß ein *scaffold* auf einen MAP-Kinase-Signalweg ausübt (Burack and Shaw, 2000). Während z.B. JIP1 von einer Arbeitsgruppe als zytoplasmatischer Inhibitor von JNK identifiziert wurde (Dickens et al., 1997), wurde es von einer anderen Arbeitsgruppe als nukleärer Transkriptionsfaktor charakterisiert (Bonny et al., 1998).

1.1.3.2.4 Substrate der MAP-Kinase JNK

Trotz der mittlerweile über zehn Jahre andauernden, intensiven Erforschung des JNK-Signalweges wurden bisher im Verhältnis zu den anderen MAP-Kinase-Signalwegen relativ wenige Substrate von JNK identifiziert. Das wohl wichtigste oder zumindest am besten charakterisierte JNK-Substrat ist der Transkriptionsfaktor c-JUN (Kallunki et al., 1996; Morton et al., 2003), der von JNK hochspezifisch an zwei Serin-Resten phosphoryliert und damit aktiviert wird. c-JUN gehört zu Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren, auf die gesondert eingegangen wird.

Eine Reihe weiterer JNK-Substrate, wie JUND, NFAT4, ELK, c-MYC oder p53 sind ebenfalls Transkriptionsfaktoren, so dass die Vermutung naheliegt, dass die Hauptfunktion von JNK die Regulation von Genexpression ist (Manning and David, 2003). Andere JNK-Substrate wie bcl-2, bcl-xL (Fan et al., 2000) oder BAD (Donovan et al., 2002) sind wichtig für Apoptose oder spielen eine Rolle bei neurodegenerativen Prozessen, wie das TAU-Protein (Reynolds et al., 1997).

Die folgende Abbildung faßt den JNK-Signalweg in seinen Kernkomponenten zusammen:

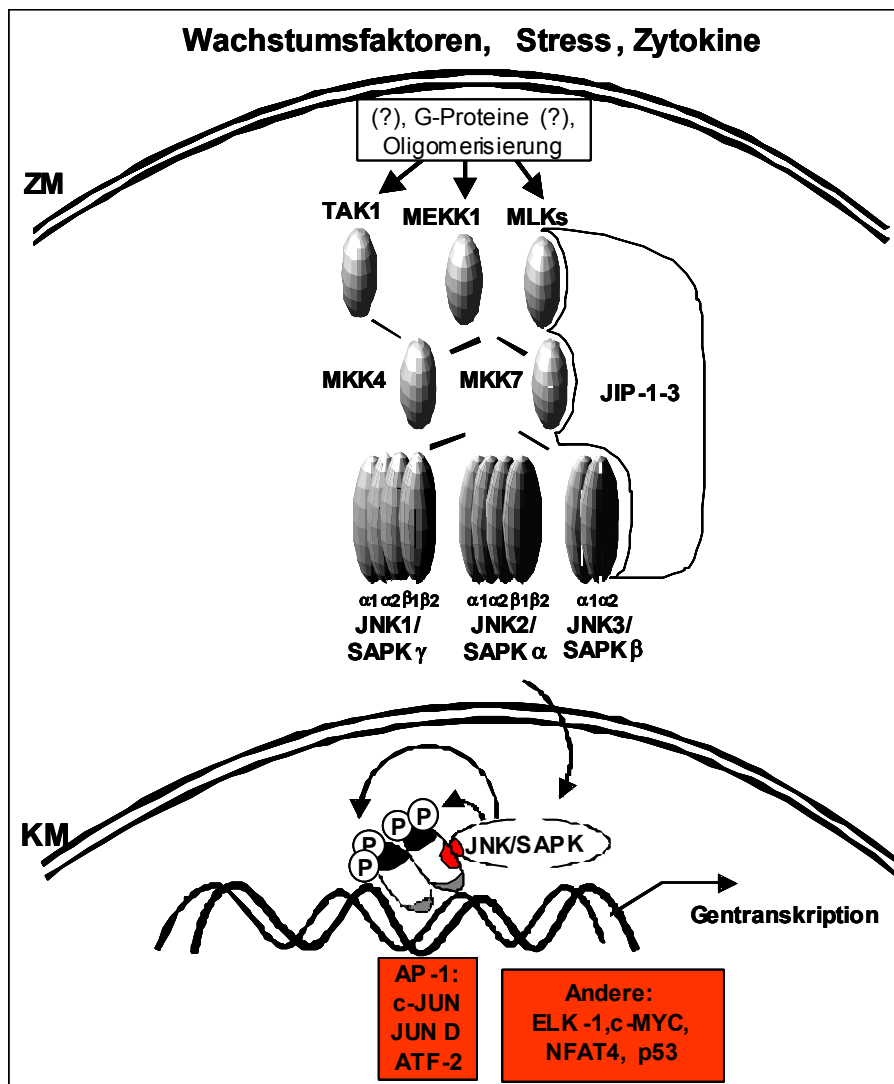


Abbildung 2: Der JNK-Signalweg

Dargestellt sind die Kernkomponenten des JNK-Signalweges. Dieser wird durch eine Reihe verschiedener extrazellulärer Stimuli und jede Art von zellulärem Stress aktiviert. Viele verschiedene MAP-3-Kinasen sind an der Signalweiterleitung über den JNK-Weg beteiligt, so z.B. MEKK1 oder TAK1. G-Proteine oder Oligomerisierungsreaktionen spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle, beispielsweise die Oligomerisierung von TRAF6-Molekülen bei der Aktivierung von TAK1 durch IL-1, die für die Kopplung an den Rezeptor sorgt. MKK4 und MKK7 sind die MAP-2-Kinasen des JNK-Signalweges, jedoch kann MKK4 auch p38-MAP-Kinase phosphorylieren. *Scaffold*-Proteine wie die Mitglieder der JIP-Familie können mehrere Komponenten des Signalweges binden und den koordinierten Ablauf der Signaltransduktion vermitteln. Phosphorylierte und aktivierte JNKs translokieren in der Folge in den Kern und binden und aktivieren im Gegenzug ihre Substrate, bei denen es sich zum größten Teil um Transkriptionsfaktoren handelt, so dass die Hauptfunktion von JNK vermutlich die Regulation von Gentranskription ist.

ZM: Zellmembran

KM: Kernmembran

1.1.3.3 Der Transkriptionsfaktor c-JUN: Wichtigstes JNK-Substrat und Mitglied der AP-1-Familie von Transkriptionsfaktoren

c-JUN gehört zur Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren (*activating protein 1*) (Karin et al., 1997). Und obwohl AP-1 bereits vor 15 Jahren entdeckt wurde (Angel et al., 1987), ist das Verständnis über die Funktionen noch sehr unvollständig, was an der Komplexität dieses Transkriptionsfaktors liegt.

AP-1 besteht nicht aus einem einzelnen Protein, sondern ist ein Homo- oder Heterodimer aus einer Vielzahl von bZIP-Proteinen (*basic region-leucine zipper*). Die bZIP-Domäne dient den Partnern eines Dimers dabei sowohl der Dimerisierung als auch der DNA-Bindung. Neben den JUN-Proteinen (c-JUN, JunB und JunD) werden die Mitglieder der Fos-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und der ATF-Familie (ATF2, LRF/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) sowie eine große Zahl anderer Transkriptionsfaktoren (z.B. Maf- oder NFAT-Proteine) zu Bildung von AP-1-Dimeren herangezogen (Shaulian and Karin, 2002; Chinenov and Kerppola 2001). Der AP-1-Transkriptionsfaktor erkennt entweder ein TRE (TPA *response element*, TPA = 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat, ein Phorbolster) mit der Sequenz 5'-TGAG/CTCA-3' oder ein CRE (cAMP *response element*) mit der Sequenz 5'-TGACGTCA-3' (Nakabeppu et al., 1988). JUN-Proteine können stabile Dimere bilden, die bevorzugt an TREs binden, während die FOS-Proteine dazu nicht in der Lage sind. Die DNA-Bindung durch FOS-Proteine findet daher in Heterodimeren mit JUN-Proteinen statt, wobei diese Heterodimere stabiler als die JUN:JUN-Homodimere sind (Halazonetis et al., 1988). ATF-Proteine hingegen bilden sowohl Homodimere als auch JUN:ATF-Heterodimere, die preferentiell an CREs binden. Die DNA-Affinität und das Transaktivierungspotential der JUN-Proteine ist sehr unterschiedlich, wobei c-JUN das stärkste Transaktivierungspotential hat (Ryseck and Bravo, 1991). Durch Heterodimerisierung mit c-Fos kann dieses weiter gesteigert werden, zudem translozieren JUN:FOS-Dimere besser in den Zellkern (Chida et al., 1999). Die Interaktion von c-JUN mit JunB, welches antagonistisch zu c-JUN ist, hingegen vermindert die transaktivierende Wirkung von c-JUN durch die Bildung inaktiver Heterodimere (Deng and Karin, 1993). Entsprechend ist ein möglicher Mechanismus zur Regulation der AP-1-Aktivität die Expression der einzelnen Komponenten der Dimere. Darüberhinaus spielen posttranslationale Modifikationen bei der Veränderung des Transaktivierungsvermögens sowie der Proteinstabilität von AP-1-Komponenten eine entscheidene Rolle.

c-JUN ist eine der am besten untersuchten AP-1-Komponenten. Der Aufbau von c-JUN mit seiner C-terminalen DNA-bindenden Domäne und seiner N-terminalen transaktivierenden Domäne ist in Abb.16 dargestellt. Zur Regulation seines Transaktivierungspotentials wird c-JUN in seiner Transaktivierungsdomäne durch die MAP-Kinase JNK an den beiden Serinen 63 und 73 phosphoryliert (Hibi et al., 1993). Die Interaktion von c-JUN und JNK wird dabei über die δ -Domäne vermittelt, die c-JUN als *docking site* für JNK dient. Folgende Abbildung zeigt eine schematische Struktur des c-JUN/JNK-Komplexes:

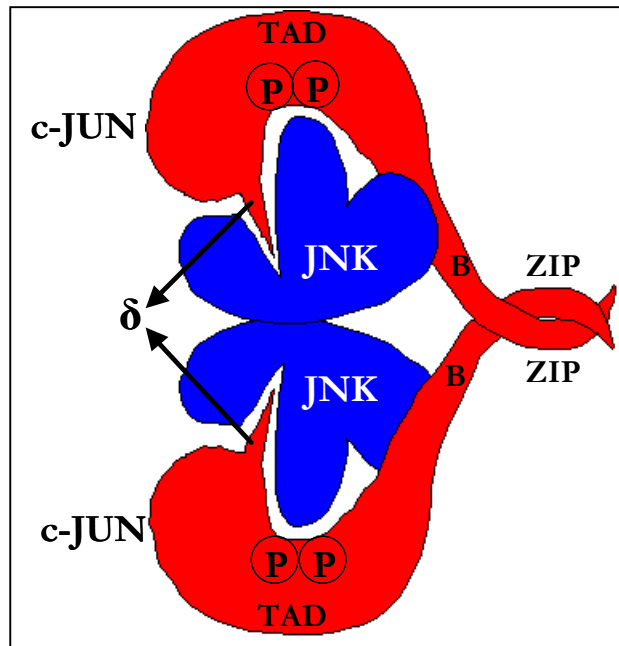


Abbildung 3: Modell des c-JUN/JNK-Komplexes

Sowohl c-JUN als auch JNK können Dimere bilden. Theoretische Überlegungen haben zu dem obigen Modell geführt, in dem der Komplex aufgrund der kumulativen Effekte von *docking sites* eine maximale Stabilität hat. Die tatsächlichen stöchiometrischen Verhältnisse von c-JUN und JNK im JUN/JNK-Komplex wurden allerdings noch nicht ermittelt. *In vivo* vermitteln zusätzlich zur δ -Domäne Bereiche im C-Terminus von c-JUN einen Teil der Bindung an JNK (May et al., 1998). Aktivierte JNK-Proteine können c-JUN an zwei Resten in der TAD phosphorylieren (mit P markiert), was die transaktivierende Wirkung von c-JUN erhöht. (modifiziert nach (Dunn et al., 2002))

TAD: Transaktivierungsdomäne

ZIP: Leucin-Zipper-Motiv

B: Basischer Bereich

δ : Delta-Domäne

Ebenso wie c-JUN enthält JunB eine δ -Domäne, wird jedoch trotzdem nicht von JNK phosphoryliert, da der Bereich um die Phosphoakzeptorstellen nicht mit dem von c-JUN identisch ist. JunD hingegen wird zwar durch JNK phosphoryliert, jedoch nur, wenn es mit c-JUN heterodimerisiert, da es keine δ -Domäne enthält. c-JUN ist also dazu in der Lage, Dimerisierungspartner zur Phosphorylierung durch JNK zu rekrutieren (Kallunki et al., 1996). Die δ -Domäne von c-JUN ist zusätzlich für den Ubiquitin-vermittelten Abbau dieses Transkriptionsfaktors verantwortlich. In v-JUN (v = viral), einem Oncoprotein des SV17 Virus, ist die δ -Domäne deletiert, so dass dieses Protein stabiler als c-JUN ist und für seine Aktivierung nicht auf JNK angewiesen ist, zwei Eigenschaften denen das starke transformierende Potential von v-JUN zugeschrieben wird (Treier et al., 1994).

Kürzlich wurde der Phosphorylierungsstatus von c-JUN reevaluiert (Morton et al., 2003). Nach dieser Studie wird c-JUN an folgenden Aminosäuren durch die angegebenen Kinasen phosphoryliert:

Phosphorylierungsstelle	Kinase
Serin 63	JNK(und/oder ERK1/2)
Serin 73	JNK (und/oder ERK1/2)
Threonin 91	JNK
Threonin 93	JNK
Threonin 239	GSK3
Serin 243	unbekannt

} je nach
Stimulus

Tabelle 1: Phosphorylierungsstellen im c-JUN-Protein

Eine biologische Funktion, wie z.B. die transaktivierende Wirkung der Phosphorylierung an Serin 63 und 73, ist für die übrigen Phosphorylierungen nicht bekannt.

Entsprechend den vielfältigen Stimuli, die zur Aktivierung von JNK führen, sind AP-1 und c-JUN an der Regulation vieler verschiedener Prozesse beteiligt. Die AP-1-Aktivität wird z.B. durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF erhöht und einige AP-1-Zielgene wie z.B. Collagenase, IL-2 oder IL-8 spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und der angeborenen Immunantwort (Angel et al., 1987a; Sefling et al., 1989; Hoffmann et al., 2002).

c-JUN ist außerdem an praktisch allen Ereignissen beteiligt, die mit Zellüberleben- und Sterben oder Proliferation und Differenzierung von Zellen in Verbindung stehen (Shaulian and Karin 2002; Karin and Shaulian; 2001 Shaulian et al., 2000).

Entsprechend sind c-JUN^{-/-}-Mäuse nicht überlebensfähig, da die Tiere an einer stark erhöhten Apoptoserate von Leberzellen sterben (Eferl et al., 1999), und MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*), die aus den entsprechenden Embryonen isoliert wurden, zeigen starke Proliferationsdefekte und sind nur sehr schwer kultivierbar (Wisdom et al., 1999). Transgene Mäuse die eine phosphorylierungsdefiziente c-JUN-Mutante exprimieren (Ser63/Ala und Ser73/Ala) sind hingegen vital, allerdings zeigen auch diese MEFs ein stark verlangsamtes Wachstum, so dass geschlußfolgert werden kann, dass einige, aber nicht alle Funktionen von c-JUN von der Phosphorylierung von Serin 63 und Serin 73 abhängen. Diese Beobachtung konnte in einem konditionalen c-JUN *knock out* bestätigt werden (Behrens et al., 2002).

Die Rolle von c-JUN bei der Regulation von Zellüberleben hängt jedoch auch stark von der Art der betrachteten Zelle und dem Kontext ab. So wird die Aktivierung von JNK und c-JUN in neuronalen Zellen in der Regel mit pro-apoptotischen Ereignissen in Verbindung gebracht (Behrens et al., 1999), während c-JUN und auch JNK in einer Reihe anderer experimenteller Ansätze eindeutig protektive, anti-apoptotische bzw. proliferationsfördernde Eigenschaften haben. Es konnte gezeigt werden, dass c-JUN für den korrekten Ablauf des Zellzyklus benötigt wird, wobei sich jedoch nicht die Menge an c-JUN verändert. Vielmehr findet eine transiente Phosphorylierung von c-JUN beim Übergang von der G2- zur M-Phase statt, die bis zum Ende der Mitose anhält (Bakiri et al., 2000). Ein wichtiges c-JUN Zielgen, welches entscheidend zur Zellzykluskontrolle beiträgt, ist p53. p53 ist ein negativer Regulator von Zellwachstum und trägt

in seinem Promotor eine AP-1-Bindungsstelle. c-JUN wirkt inhibierend auf den p53-Promotor, so dass in c-JUN-KO-Zellen die Menge an exprimiertem p53 höher ist als in Wildtypzellen. Dieses führt dazu, dass c-JUN^{-/-}-Zellen höhere Mengen an p53-regulierten Genen exprimieren, wozu speziell der Zellzyklusinhibitor p21^{cip1/waf1} gehört, was den starken Proliferationsdefekt dieser Zellen erklärbar macht (Schreiber et al., 1999; Shaulian et al., 2000). Zusätzlich steht das Zyklin D1-Gen unter direkter Kontrolle von c-JUN und eine Aktivierung von c-JUN führt zur vermehrten Zyklin D1-Expression. Da Zyklin D1 jedoch wichtig für den Übertritt von der G1 in die S-Phase während des Zellzyklus ist, zeigt sich hier ein weiterer Mechanismus auf, über den c-JUN positiv auf das Proliferationsverhalten von Zellen Einfluß nimmt (Wisdom et al., 1999).

1.1.3.4 Hemmung der JNK-Aktivität: JNK als therapeutische Zielstruktur?

Der JNK-Signalweg ist an einer großen Anzahl physiologischer Prozesse beteiligt, wie z.B. der Regulation von Genexpression als Antwort auf Zytokine oder Wachstumsfaktoren, der Regulation von Zellüberleben und Proliferation oder dem Prozess der Transformation als Antwort auf Oncogene. Da es sich dabei um Ereignisse handelt, die ursächlich an der Pathogenität von Erkrankungen beteiligt sein können, kann die Hemmung der enzymatischen Aktivität der MAP-Kinase JNK eine therapeutische Strategie zu Behandlung darstellen.

Unter physiologischen Bedingungen inaktivieren eine Reihe von Proteinphosphatasen MAP-Kinasen, so auch JNK und p38-MAPK, durch Dephosphorylierung in dem Threonin-X-Tyrosin-Motiv (Theodosiou et al., 1999; Theodosiou and Ashworth, 2002). Die Phosphatasen werden transkriptionell auf mRNA-Ebene reguliert und können die stimulus-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen beenden, wobei jedoch eine JNK-spezifische MKP (*MAP kinase phosphatase*) noch nicht beschrieben wurde.

Neben diesen natürlich vorkommenden Inhibitoren der MAP-Kinaseaktivität wurden in den letzten Jahren eine Reihe synthetischer, niedermolekularer Inhibitoren identifiziert, bei denen es sich in der Regel um Moleküle handelt, die die ATP-Bindungstasche in den Kinase-Domänen ihrer Zielmoleküle besetzen. Da Proteinkinasen, wie bereits erwähnt, an der Regulation praktisch jedes wichtigen Ablauf in einer Zelle beteiligt sind, wird diesen Kinaseinhibitoren eine große Bedeutung als Medikamentenklasse des 21. Jahrhunderts zugeschrieben, so dass die finanziellen Investitionen und die Anzahl an klinischen Studien entsprechend hoch sind (Cohen, 2002).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurde über mindestens zwölf verschiedene Substanzen berichtet, die sich als JNK-Inhibitor eignen sollen (Manning and Davis, 2003). Die genaue Spezifität der meisten Substanzen muß dabei noch unter Beweis gestellt werden, jedoch wurden einige Verbindungen bereits in Tiermodellen zur Behandlung verschiedener Krankheitsbilder eingesetzt. Der kommerziell erhältliche JNK-Inhibitor SP600125 wurde in einer Studie gegen autoimmune und neurodegenerative Krankheiten verwendet (Bennett et al., 2001), eine Substanz der Firma Aventis für die Behandlung von Asthma und Arthritis (Radcliffe et al., 2003)

Da die meisten Kinase-Inhibitoren ATP-Kompetitoren sind und die ATP-Bindungstasche in verschiedenen Kinase konserviert ist, stellt sich oft die Frage der Spezifität dieser Substanzen. Die Entwicklung alternativer Strategien zu spezifischeren Hemmung einzelner Kinasen oder gar spezieller Funktionen einer Kinase sind daher sowohl für die pharmazeutische Industrie, als auch für die Grundlagenforschung von großem Interesse.

1.1.4 Die MAP-3-Kinase TAK1 wird durch das Adaptorprotein TAB1 reguliert

1.1.4.1 Die MAP-3-Kinase TAK1

Die MAP-3-Kinase TAK1 (*TGF β activated kinase*) wurde in einem genetischen Ansatz entdeckt, der das Ziel hatte, neue MAP-3-Kinasen zu identifizieren, die einen STE11-defizienten Hefestamm "retten" können. STE11 ist eine MAP-3-Kinase, der eine wichtige Rolle bei der Fortpflanzung von Hefen zugewiesen wird. Die Namensgebung von TAK1 erfolgte aufgrund der ersten funktionellen Zuordnung, da die ursprünglich entdeckte, N-terminal deletierte TAK1-Form partiell aktiv ist und nach Expression in Säugerzellen TGF β -responsive Reportergene aktivieren kann. Entsprechend wurde TAK1 durch Stimulation mit TGF β aktiviert, und eine katalytisch inaktive Mutante von TAK1 wirkte dominant negativ auf TGF β -aktivierte Signalwege (Yamaguchi et al., 1995). Das Protein besteht aus 579 Aminosäuren mit einer N-terminalen Kinasedomäne, die die konservierten Subdomänen I–XI umfasst und einer 300 Aminosäuren langen C-terminalen Domäne ohne Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen. In der Domäne II an Position 63 befindet sich ein Lysinrest, der bei den meisten Proteinkinasen konserviert ist und eine wichtige Funktion in der ATP-Bindungstasche der Kinasen hat. Wie bei den meisten Proteinkinasen führt eine Mutation dieses Lysinrestes zur einer katalytisch inaktiven TAK1-Form (Shibuya et al., 1996).

TAK1 stellt einen Verzweigungspunkt mehrerer Signalwege dar und kann durch Phosphorylierung von MKK3 und MKK6 die Aktivierung von p38, durch Phosphorylierung von MKK4 die Aktivierung von JNK vermitteln (Moriguchi et al., 1996; Wang et al., 1997; Shirakabe et al., 1997). Darüberhinaus stimuliert in Säugerzellen exprimiertes und aktiviertes TAK1 durch Aktivierung des IKK-Komplexes den NF- κ B-Signalweg (Sakurai et al., 1998; Sakurai et al., 1999).

1.1.4.2 Das Adaptorprotein TAB1

TAK1 ist die einzige bisher bekannte MAP-3-Kinase, die alleine keine Aktivität zeigt, auch wenn sie in großen Mengen in Säugerzellen überexprimiert wird. Für die Aktivierung seiner Kinaseaktivität benötigt TAK1 vielmehr das Adaptorprotein TAB1 (*TAK1 binding protein*), welches über einen *2-Hybrid-Screen* in Hefen gemeinsam mit einem zweiten Adaptorprotein (TAB2) gefunden wurde (Shibuya et al., 1996).

Humanes TAB1 umfaßt 504 Aminosäuren und lässt sich in eine N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-436) und eine C-terminale Domäne (Aminosäuren 437-504) unterteilen. Der C-Terminus vermittelt die Interaktion und Aktivierung von TAK1 und bindet dabei an die N-terminale Hälfte von TAK1, die sich innerhalb der ersten 303 Aminosäuren befindet (Sakurai et al., 2000). Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der TAB1-vermittelten Aktivierung von TAK1 erfolgten zum größten Teil in transienten Transfektionsexperimenten. Die Assoziation zwischen der Kinasedomäne von TAK1 und TAB1 bewirkt eine TAK1-Autophosphorylierung an einem Serin- und einem Threoninrest in der Aktivierungsschleife. Die C-terminale, aus 68 Aminosäuren bestehende Sequenz von TAB1 wurde zu diesem Zeitpunkt als minimale TAK1-Aktivierungsdomäne bezeichnet. Diese besteht aus zwei Subdomänen, wobei die eine für die Assoziation mit der Kinase und die andere für die Aktivierung von TAK1 verantwortlich ist (vgl. Abb.13). Der N-Terminus von TAB1 spielt möglicherweise eine regulatorische Rolle in Bezug auf TAK1 (Sakurai et al., 2000).

Durch NMR-Studien konnte die Interaktion von TAB1 mit TAK1 genauer charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die letzten 30 Aminosäuren von TAB1 eine charakteristische α -helikale Struktur einnehmen und TAB1 als *docking site* dienen, welche zwischen Säugern, *Xenopus* und *C. elegans* konserviert ist (Ono et al., 2001). Durch zielgerichtete Mutagenese wurde der Aminosäure an Position 484 (Phenylalanin bei Säugern) bei der Interaktion mit TAK1 eine entscheidene Rolle zugesprochen, die jedoch durch eigene Arbeiten nicht bestätigt werden konnte (Kracht et al., unveröffentlichte Arbeiten).

1.1.4.3 Regulation von TAK1 durch TAB1, TAB2 und TAB3

Der Aktivierungsmechanismus von TAK1 wurde in den letzten Jahren besonders hinsichtlich der Stimulation durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 untersucht. Durch biochemische Analysen wurde dabei dem zusammen mit TAB1 identifizierten Adaptormolekül TAB2 eine wichtige Rolle in der initialen TAK1-Aktivierung zugesprochen. Im unstimulierten Zustand liegt TAB2 in membranösen Strukturen der Zelle (vermutlich in der Zellmembran) lokalisiert vor und transloziert nach IL-1-Stimulation ins Zytosol. Dieses ermöglicht es dem konstitutiven, aber katalytisch inaktiven TAB1/TAK1-Komplex mit TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) und IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) zu interagieren, was in der Folge die Aktivierung von TAK1 und somit des p38-, JNK- und NF- κ B-Signalweges bewirkt (Takaesu et al., 2001; Jiang et al., 2002). Da neben der membrangebundenen Fraktion von TAB2 jedoch auch ein Teil konstitutiv mit TAK1 im Komplex vorliegt, ist die Funktion von TAB2 noch nicht endgültig geklärt (Ishitani et al., 2003; Kracht et al., unveröffentlichte Befunde)

Die Stimulation mit IL-1 führt zur TAK1-Autophosphorylierung an Serin 192 und Threonin 187. Ebenso hat die gemeinsame Überexpression von TAK1 und TAB1 die konstitutive Phosphorylierung beider Proteine zur Folge (Kishimoto et al., 2000; Sakurai et al., 2000), die von der Aktivität von TAK1 abhängt. Hingegen besitzt keines der beiden Proteine aktivierendes Potential, wenn es alleine exprimiert werden. TAK1 phosphoryliert TAB1 dabei in Phospho-

Akzeptoraminosäuren, die in der TAK1-Interaktions- und Aktivierungsdomäne von TAB1 liegen. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, weshalb der konstitutiv in Zellen vorliegende Komplex aus TAK1 und TAB1 inaktiv ist, während der Komplex nach Überexpression beider Partner katalytische Aktivität besitzt. Eine mögliche Erklärung ist, dass der endogene TAK1/TAB1-Komplex durch einen Inhibitor besetzt wird, der die Interaktion mit den TRAF6-Molekülen und damit die Aktivierung hemmt. Über eine inhibitorische Funktion von ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) auf die TAK1-abhängige Signaltransduktion wurde in diesem Zusammenhang berichtet (Mochida et al., 2000).

Durch einen sehr unkonventionellen Mechanismus wird der Regulation der TAK1-Aktivität durch TAB1 zusätzliche Komplexität hinzugefügt. So konnte gezeigt werden, dass TAB1, welches selbst keine katalytische Aktivität besitzt, die MAP-Kinase p38 α bindet, was zu deren Autophosphorylierung und Aktivierung führt (Ge et al., 2003).

Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass TAB1 *in vitro* von p38 α an Serin 423, Serin 438 und Threonin 431 phosphoryliert wird, und die Hemmung von p38 α mit SB203580 führt zur Aktivierung von TAK1. Zudem ist die katalytische Aktivität von TAK1 in p38 α -defizienten Zellen erhöht (Cheung et al., 2003).

TAK1-defiziente Mäuse konnten bis zum heutigen Zeitpunkt nicht generiert werden. RNAi vermittelte Suppression von TAK1 hebt jedoch die IL-1- und auch TNF-vermittelte NF- κ B-Aktivierung auf und zeigt, dass TAK1 für diesen Signalmechanismus essentiell ist (Takaesu et al., 2003). Die Zerstörung des Tab1-Gens ist embryonal letal, was wohlmöglich die Wichtigkeit von TAB1 bei der TGF β -Signaltransduktion verdeutlicht. In primären embryonalen Fibroblasten konnte zudem gezeigt werden, dass die basale Aktivität von TAK1 tatsächlich von der Anwesenheit von TAB1 abhängig ist (Komatsu et al., 2002). Daten zur IL-1-abhängigen Signaltransduktion wurden in dieser Arbeit jedoch nicht erhoben. Ebenso ist ein TAB2-*knock out* letal, da die Entwicklung der Leber gestört ist. In Experimenten mit Zellen aus diesen Embryos konnte jedoch gezeigt werden, dass TAB2 keine Funktion in der IL-1-abhängigen Signaltransduktion hat, was ein klarer Widerspruch zu den biochemisch erhaltenen Daten ist (Sanjo et al., 2003). Ein mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Kompensation der TAB2-Funktionen durch das kürzlich klonierte TAB3 sein (Munoz-Sanjuan et al., 2002; Ishitani et al., 2003). Dieses liegt ebenso wie TAB2 im konstitutiven Komplex mit TAK1 vor und kann TRAF6 binden. Über die Interaktion mit TRAF2 übernimmt TAB3 darüberhinaus noch eine Rolle im TNF-Signalweg. Folgende Abbildung fasst den gegenwärtigen Wissensstand zur Regulation der TAK1-Aktivität durch die Proteine der TAB-Familie zusammen:

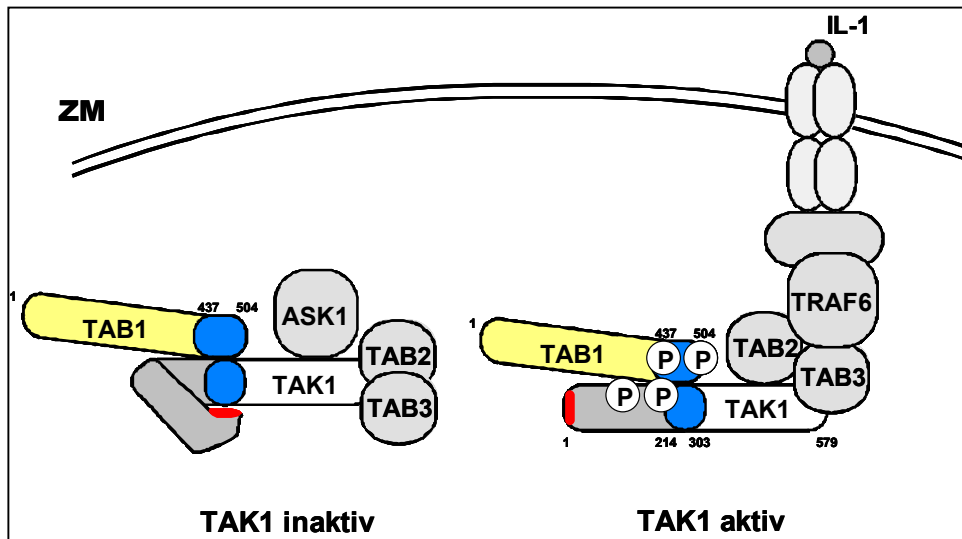


Abbildung 4: Aktivierung von TAK1 nach IL-1-Stimulation

Im inaktiven Zustand liegt in Zellen ein konstitutiver Komplex aus TAK1, TAB1 sowie TAB2 und TAB3 vor. TAB2 und TAB3 binden nicht an TAB1, können jedoch Homo- und Heterodimere bilden. In diesem Komplex besitzt TAK1 keine katalytische Aktivität, da TAK1 zusätzlich mit ASK1 interagiert, was die Bindung an TRAF6 verhindert. Stimulation mit IL-1 induziert die Interaktion von TAB2 und TAB3 mit TRAF6 und die Verdrängung von ASK1. Die Aktivierung von TAK1 führt zu einer Konformationsänderung und zur Autophosphorylierung und in der Folge zur TAK1-abhängigen Phosphorylierung von TAB1. Zur Aktivierung des TAK1-Komplexes ist die Bildung eines rezeptornahen Komplexes bestehend aus MYD88, IRAK1 und IRAK4 sowie die folgende Oligomerisierung von TRAF6-Molekülen essentiell.

ZM: Zellmembran

1.1.5 *In vivo* Proteintransduktion mittels zellpermeabler Internalisierungssequenzen

Die Aufnahme geladener Makromoleküle wie z.B. Polypeptide oder Oligonukleotide ist aufgrund der lipophilen Eigenschaften von Zellmembranen nicht ohne Manipulation möglich. Das Einschleusen großer hydrophiler Moleküle in Zellen, ohne dabei die Integrität der Zellmembran zu stören, ist daher sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die pharmakologische Applikation von Substanzen von großem Interesse. Die Entdeckung von Proteinen, die ohne besondere Transportsysteme der Zelle oder andere Hilfsproteine dazu in der Lage sind, die Zellmembran praktisch frei zu passieren, hat daher großes Interesse geweckt. Dieses Phänomen, welches als Zellpenetration oder Proteintransduktion (Schwarze and Dowdy, 2000; Lindgren et al., 2000) bezeichnet wird, wurde erstmals 1988 beim TAT-Protein des HIV-1 (*human immunodeficiency virus type 1*) beobachtet (Green and Loewenstein, 1988) und in den folgenden Jahren wurden eine Reihe weiterer Proteine mit Transduktionseigenschaften beschrieben, wie der Transkriptionsfaktor ANTP (Antennapedia) aus *Drosophila* (Joliot et al., 1991) und der HSV-1 (*herpes simplex type 1*) Transkriptionsfaktor VP22 (Elliott and O'Hare, 1997). Die als Internalisierungssequenzen bezeichneten Domänen, welche für das Penetrationspotential dieser

Proteine verantwortlich sind, haben in der Regel eine Länge von 10-16 Aminosäuren und ihr Einsatz als Werkzeuge zum Transport anderer Makromoleküle in Zellen hat sich in einer Vielzahl von Studien bewährt. Neben diesen natürlich vorkommenden Sequenzen wurden in der Folge auch eine Reihe artifizieller zellpermeabler Peptide entwickelt, wie das Transportan (Pooga et al., 1998) oder verschiedene amphipatische Peptide (Scheller et al., 1999). Da in der Mehrzahl der Arbeiten, wie auch in der hier vorliegenden, mit den Internalisierungssequenzen aus TAT und ANTP gearbeitet wird, beschränken sich die weiteren Ausführungen auf diese beiden Peptide.

TAT ist ein Transkriptionsfaktor, der je nach Virenstamm aus 86-102 Aminosäuren besteht und an der Replikation des HIV-1 beteiligt ist, indem er zur Transaktivierung der viralen LTRs (*long terminal repeats*) beiträgt. Neben der sauren, N-terminalen Transaktivierungsdomäne und der cysteinreichen DNA-bindenden Domäne (Aminosäuren 22-37), die ein Zinkfinger-Motiv enthält, sind die Aminosäuren 47-57 für die Transduktion von TAT von einer Zelle in die nächste verantwortlich (Ruben et al., 1989). Diese Sequenz (YGRKKRRQRRRG) ist reich an basischen Aminosäuren und enthält zusätzlich ein Kernlokalisierungssignal (GRKKR), so dass sich TAT zwischen Zytosol und Kern verteilt.

ANTP gehört zur Klasse der Homeoprotein-Transkriptionsfaktoren. Durch zielgerichtete Mutagenese der Homeodomäne, die der DNA-Bindung dient, konnte der dritten Helix (Aminosäuren 43-58) das volle Transduktionsvermögen von ANTP zugeschrieben werden (Derossi et al., 1996).

Der Mechanismus der Aufnahme von TAT- und ANTP-Peptiden und den entsprechenden Fusionsproteinen ist nicht endgültig aufgeklärt und bleibt auch weiterhin umstritten. Da es zunächst so schien, dass das Phänomen der Transduktion auch bei 4°C abläuft und somit energieunabhängig ist, wurden klassische Wege wie Endozytose zunächst ausgeschlossen. Auch konnte keine Rezeptorabhängigkeit der Internalisierung ausgemacht werden, da sowohl inverse und aus D-Aminosäuren bestehenden Peptide eine zum ursprünglichen Peptid vergleichbare Aufnahme in die Zellen zeigten (Berlose et al., 1996; Wender et al., 2000). Da die Transduktion, die in der Regel innerhalb von Minuten abläuft, zudem nicht auf bestimmte Zellen beschränkt zu sein schien, wurden verschiedene Modelle entwickelt. So wurde für die ANTP-Internalisierungssequenz zunächst eine unspezifische Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden nachgewiesen (Berlose et al., 1996), worauf die Bildung von invertierten Micellen in der Plasmamembran (ausgelöst durch einen bestimmten Tryptophanrest in der Sequenz (W48)) und die Aufnahme des Peptides folgen (Derossi et al., 1996; Derossi et al., 1998).

Da jedoch z.B. die TAT-Sequenz keine hydrophoben Aminosäuren enthält, die zur Ausbildung solcher Micellen absolut notwendig sind, wurde dieser Mechanismus reevaluiert. In der Tat sind eine Vielzahl der Ergebnisse der mechanistischen Studien aus den späten 90er-Jahren wohl auf Artefakte aus der Fixierung von Zellen zurückzuführen. Peptid-Transduktionssequenzen enthalten eine große Anzahl positiv geladener Aminosäuren wie Arginine und Lysine, so dass sich diese Peptide schnell und sehr stark an die Plasmamembran anlagern. Werden die Zellen in der Folge mit Methanol, Aceton oder in selteneren Fällen auch mit Paraformaldehyd fixiert, so

verteilen sich die Peptide während der folgenden Waschschriffe neu in der Zelle, was zu falschen Ergebnissen führen kann (Leifert et al., 2002; Richard et al., 2003). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde folgender Mechanismus für die Aufnahme von HIV-1 TAT und TAT-Fusionsproteinen entwickelt:

Im ersten Schritt erfolgt die Interaktion mit negativ geladenen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche, wobei die positiv geladenen Aminosäuren der TAT-Internalisierungssequenz auf der einen Seite sowie Glykosaminoglykane der Zelle auf der anderen Seite beteiligt sind. Im nächsten Schritt wird TAT über Caveolen in Form von *lipid rafts* aufgenommen und kolokalisiert zunächst mit frühen Endosomen und später mit Lysosomen. Dabei handelt es sich um einen temperaturabhängigen, endozytotischen Prozess, der unabhängig von der klassischen Clathrin-vermittelten Endozytose ist (Console et al., 2003; Fittipaldi et al., 2003). Ob dieser Mechanismus in gleicher Weise für die ANTP-Sequenz zutrifft und alle anderen Möglichkeiten der Internalisierung ausschließt, ist nicht geklärt.

Die mittlerweile recht umfangreiche Anzahl an Studien, die den erfolgreichen Einsatz zellpermeabler Peptide besonders in Kombination mit der TAT-Sequenz beschreibt, lässt jedoch vermuten, dass zumindest ein Teil der über Endozytose aufgenommenen Peptide aus den Endosomen in das Zytosol gelangt (Lindsay, 2002). Besonders bemerkenswert ist dabei der praktisch ungehinderte Transport von Proteinen, Peptiden oder Oligonukleotiden in Zellen nach Fusion an diese Internalisierungssequenzen, so konnte z.B. bei *in vivo*-Untersuchungen gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein aus TAT (YGRKKRRQRRR) und β -Galaktosidase in fast alle Gewebe und sogar auch über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden kann (Schwarze et al., 1999).

In *in vitro*-Experimenten gelang ebenfalls, Proteine unterschiedlicher Größen (zum Beispiel β -Galaktosidase: 116kD, *horseradish peroxidase*: 40kD und RNase A: 13kD) in Zellen verschiedener Geweben und Zelllinien zu transduzieren (Fawell et al., 1994).

Neben diesen hauptsächlich methodischen Arbeiten, konnte jedoch gerade in den letzten Jahren eine Reihe von Gruppen auch den funktionellen Einsatz dieser Peptide demonstrieren. Zum einen scheinen sich diese Peptide besonders bei der Manipulation von Signaltransduktionsprozessen, die beispielsweise eine wichtige Rolle bei der entzündlichen Genexpression spielen, zu bewähren (Holzberg et al., 2003; Han et al., 2003; May et al., 2000; Bucci et al., 2000). Zum anderen beschreiben mehrere Arbeiten das Design und den Einsatz von zellpermeablen Peptiden mit starkem anti-apoptischen Potential (Sawada et al., 2003; Cao et al., 2002; Denicourt and Dowdy, 2003).

1.1.6 Aufgabenstellung

Die Bedeutung von MAP-Kinase-Signalkaskaden für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie z.B. bei der Regulation von Proliferation oder bei der Weiterleitung der Signale von inflammatorischen Effektoren, ist in der Literatur gut belegt.

Durch die Entdeckung von *docking sites*, die ein hohes Maß an Spezifität bei der Kinase-Substrat-Findung gewährleisten, wurde ein entscheidender Schritt zum Verständnis des koordinierten Ablaufs dieser Kaskaden als Antwort auf die große Anzahl verschiedener Stimuli geleistet. Da diese *docking sites* in der Regel zwischen sechs und zwanzig Aminosäuren lang sind und in der Zwischenzeit in einer Reihe von Substraten gut charakterisiert wurden, stellen sie eine ideale Zielstruktur zur Entwicklung kleiner Kompetitoren dar. Diese sollten dazu in der Lage sein, spezifisch mit der Interaktion zweier ausgewählter Partner zu interferieren und damit die Funktion einer bestimmten Kinase bzw. eines Kinase-Substrat-Komplexes zu stören. Aufgrund der geringen Biopermeabilität geladener Makromoleküle sind solche Aminosäuresequenzen jedoch nur begrenzt einsetzbar.

Einen methodischen Ausweg zeigt hier der Einsatz kleiner Peptid-Internalisierungssequenzen auf, die über einen noch nicht genau geklärten Mechanismus dazu in der Lage sind, die Plasmamembran von Zellen praktisch frei zu passieren. Durch die Fusion von *docking sites* an diese Internalisierungssequenzen sollte es daher möglich sein, zellpermeable Inhibitoren MAP-Kinase-abhängiger Signaltransduktion zu generieren.

Zur Herstellung und Charakterisierung zellpermeabler Proteine sollten gut charakterisierte Interaktionsdomänen verwendet werden. Da die MAP-3-Kinase TAK1 für ihre Aktivierung in einzigartiger Weise auf das Adaptorprotein TAB1 angewiesen ist, sollte zum einen die Herstellung eines zellpermeablen Proteins, welches die Interaktionsdomäne des Adaptorproteins TAB1 mit TAK1 enthält, erfolgen.

Aufgrund von Belegen aus der Literatur, dass die Herstellung zellpermeabler Proteine in großen Mengen in Bakterien möglich ist (Nagahara et al., 1998), sollte dieses Vorgehen für ein zellpermeables ANTP-TAB1-Protein ausgetestet werden. Ein derartiger Ansatz würde einen praktisch unbegrenzten Zugang zu dieser Art von zellpermeablen Kompetitoren ermöglichen würde. Im Anschluss sollte die Internalisierung in Zellen nachgewiesen und das Protein dann in funktionellen Tests zur Manipulation TAK1/TAB1-abhängiger Signaltransduktion eingesetzt werden.

Gleichzeitig sollte ein zweiter, gut untersuchter Komplex, der in der Signalweiterleitung unterhalb des TAK1/TAB1-Komplexes angeordnet ist, mit Hilfe eines synthetisch hergestellten Peptides rupturiert werden. Die Wichtigkeit der δ -Domäne des Transkriptionsfaktors c-JUN für die Bindung an die MAP-Kinase JNK wurde bereits erwähnt (vgl. 2.1.3.3). Da sich die δ -Domäne mit 20 Aminosäuren gut für eine klassisch-chemische Festphasensynthese eignet und es zusätzlich Hinweise gab, dass ein solches Peptid *in vitro* die c-JUN-Phosphorylierung hemmen kann (Adler et al., 1994), sollte ein synthetisch hergestelltes TAT-c-JUN-Peptid zunächst im

Hinblick auf seine Fähigkeit, mit der c-JUN/JNK-Interaktion zu interferieren, charakterisiert werden. Darüberhinaus sollte sein Internalisierungsvermögen beurteilt werden. Nach dieser initialen Phase der Charakterisierung sollte das Peptid zur Manipulation und damit zur Aufklärung der Funktion des JNK-cJUN-Komplexes in intakten Zellen verwendet werden.

Parallel sollte ein alternativer methodischer Ansatz zur weiteren Aufklärung des JNK-Signalweges etabliert werden. Dieser Signalweg zeichnet sich durch seine enorme Komplexität und die Vielzahl verschiedener Stimuli, die zu seiner Aktivierung führen, aus. Dennoch ist die Anzahl der bis *dato* identifizierten JNK-Substrate verhältnismäßig gering. Zu deren Identifikation eignen sich prinzipiell verschiedene Methoden, wie zum Beispiel der weit verbreitete *2-Hybrid-Screen* in Hefen oder die Koimmunopräzipitation. In dieser Arbeit wurde die vergleichsweise neue Methode der *tandem affinity purification* (TAP-Methode) ausgewählt (vgl. Abb.5). Die Stärke der TAP-Methode liegt in der Betrachtung tatsächlich in einer Zelle stattfindender Protein-Protein-Interaktionen, wobei theoretisch selbst modifikationsabhängige Wechselwirkungen dargestellt werden können.

Zur Isolierung JNK-bindener Proteine sollte daher zunächst die Klonierung eines eukaryotischen Expressionsvektors für das Protein JNK-TAPtag erfolgen. Da die Stabilität von Proteinkomplexen darüber hinaus von den stöchiometrischen Verhältnissen der einzelnen Partner abhängt, sollte die Expression von JNK-TAPtag unter einem regulierbaren Promotor stattfinden, so dass die Menge an exprimierter JNK-TAPtag leicht veränderbar bleibt.

Da in der Arbeitsgruppe keine experimentelle Expertise mit der TAP-Methode vorlag, sollte im nächsten Schritt ein Protokoll zu Aufreinigung von TAPtag-Fusionsproteinen etabliert und das Potential der *tandem affinity purification* zur Darstellung JNK-interagierender Proteine evaluiert werden. Falls sich diese Methode in analytischen Experimenten für diese Fragestellung bewährt, sollten schließlich in einem präparativen Ansatz sequenzierbare Mengen an JNK-bindenden Proteinen isoliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterial

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

2.2 Geräte

- *Elektrophorese-, Westernblot- und Fotografiesysteme*

Biometra BioDoc Analyze UV-Transilluminator

Biotec Fisher PHERO-STAB 0632 Spannungsgerät

Hoefer Mighty Small, SE250/260 Gelelektrophorese-Apparatur

LKB 2051 Midget Multiblott

Schleicher&Schuell *Semi-Dry-Blotter*

Sigma Vertikale duale Elektrophoresekammer

- *Mikroskope und Photometer*

Eppendorf BioPhotometer

Leitz Diavert

Leitz Laborlux 11

MR6500 Dynatech Mikrottestplattenleser

Shimadzu Spektralphotometer UV-160A

Zeiss Axiovert 200M mit Kameraausstattung

- *Verschiedenes*

EG&G Berthold Lumat LB 9507 Luminometer

Eppendorf Thermomixer 5436

Heidolph Vortex-Gerät

Landgraf Thermocycler

Lauda C6 CS Wasserbad

Perkin Elmer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzer)

Protec Optimax Filmentwicklermaschine

Ziegra Eismaschine

ELISA-Reader (Firma Dynatech)

- *Waagen*

Chyo Electronic Balance MP-3000

Sartorius *analytic*

- *Zellkultur*

GFL Wasserbad

Heraeus Brutschrank CO₂ Autozero

Heraeus Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472

- *Zentrifugen*

Beckmann J2-21 Centrifuge

Beckmann L8-70M Ultracentrifuge

Beckmann TL-100 Ultracentrifuge

Eppendorf Concentrator 5301

Heraeus Biofuge Fresco

Heraeus Biofuge Pico

Sorvall RC2B

Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge (DuPont)

Sigma 4K15

Sigma 6K10

2.3 Chemikalien und Lösungsmittel

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*").

2.4 Enzyme und Enzympuffer

Sämtliche Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen, MBI Fermentas, Stratagen und Amersham Pharmacia bezogen und in den entsprechenden Puffern eingesetzt.

2.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

Coomassie Brilliant Blue-Lösung

0,1% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue G250*

50% (v/v) Methanol

20% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

30% (v/v) Methanol

2xHEBS (sterilfiltriert)

0,28mol/l NaCl

0,05mol/l HEPES
1,5mmol/l Na_2HPO_4
pH 7,05 mit 5mol/l NaOH einstellen
1% (v/v) Ameisensäure

10x Laemmli-Laufpuffer

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

4x Laemmli-Auftragungspuffer

100mmol/l Tris (pH 8,8)
8% (w/v) SDS
24% (v/v) Glycin
16% (v/v) β -Mercaptoethanol
0,02% (w/v) Bromphenolblau
mit ddH₂O auf 25ml auffüllen

Luziferase-Reagenz

200mmol/l Tricin
10,7mmol/l $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
26,7mmol/l MgSO_4
333mmol/l DTT
10mg Coenzym A
5,931mg Na-Luziferin
5,3mmol/l ATP

PBS

137mmol/l NaCl
2,7mmol/l KCl
4,3mmol/l Na_2HPO_4
1,4mmol/l KH_2PO_4

RNA/DNA Auftragungspuffer

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

Sammelgelpuffer

1mol/l Tris (pH 6,8)

10x *Semi Dry* Blotpuffer

30,25g Tris

144,2g Glycin

20% (v/v) Methanol

TAE-Puffer

4mmol/l Tris

0,11% (v/v) Essigsäure

1mmol/l EDTA

TE-Puffer

10mmol/l Tris (pH 7,0-8,0)

1mmol/l EDTA

TBS-Puffer (pH 7,4)

10mmol/l Tris

1,54mol/l NaCl

TBST-Puffer

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

Trenngelpuffer

1mol/l Tris (pH 8,8)

TSS-Lösung

10% (w/v) Polyethylenglykol 6000

5% (v/v) DMSO

50mmol/l MgSO₄ *7H₂O

mit LB-Medium auf 25ml auffüllen

LB-Medium

10g BactoTrypton

10g NaCl

5g Hefeextrakt

mit ddH₂O auf 1l auffüllen und autoklavieren

Spezielle Puffer und Lösungen sind den jeweiligen Versuchsdurchführungen zu entnehmen.

2.6 Kits und gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Bradford-Kit	Protein Assay Dye Reagent, Bio Rad
Calmodulin-Agarose	Stratagen
dNTP Set	New England Biolabs
GSH-Sepharose	Pharmacia
IgG-Agarose	Sigma
Medium und Zusätze (Zellkultur)	GibcoBRL
Molekulargewichtsstandard für Proteine	Pharmacia
Mini-Präp Kit	Pharmacia
Nickel-Agarose	Qiagen
PVDF-Membran	Millipore
pd(N ₆)	Pharmacia
Qiagen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
Radioaktive Isotope	ICN
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen
Röntgenfilme Biomax-ML, Biomar-MR	Kodak
Zellkulturmaterial	Nunc

Spezielle Kits und gebrauchsfertige Reagenzien sind an entsprechender Stelle gesondert im Methodenteil aufgeführt.

2.7 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

Primer zur Klonierung des Vektors pThm3Ha4-Tab1C (Expressionsprodukt: 6xHIS-MYC-ANTP-TAB1C):

Name	Sequenz
<i>Tab1</i> se <i>Apa</i> I	5'-GCGCGGGCCCCAAAGCCCGACCTTAACCCTG-3'
<i>Tat-Tab1</i> as <i>Bam</i> HI	5'-GCGCGGATCCCTACGGTGCTGTCACCACGCTCT-3'

Primer zur Klonierung des Vektors pThm3Ha4-GFP (Expressionsprodukt: 6xHIS-MYC-ANTP-GFP):

Name	Sequenz
<i>Gfp</i> se <i>Apa</i> I	5'-GCGCGGGCCCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'

<i>Gfp</i> as <i>Bam</i> HI	5'-GCGCGGATCCCATCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'
-----------------------------	---

Primer zur Klonierung des Vektors pIND-Jnk2TAPtag (Expressionsprodukt: JNK2-TAPtag):

Name	Sequenz
<i>hJnk2</i> se <i>Kpn</i> I	5'-GGTACCGTGCATCATGAGCGACAG-3'
<i>hJnk2</i> as <i>Kpn</i> I oStop	5'-GGTACCTCGACAGCCTTCAAGGGT-3'

Sequenzierprimer:

Name	Sequenz
<i>Gfp</i> cterm se	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'
<i>Gfp</i> Seq-Pr. as	5'-GTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGAG-3'
<i>hJnk2</i> Seq-Pr. 1 se	5'-AGTAAGTAGCAACGCCACTC-3'
<i>hJnk2</i> Seq-Pr. 2 se	5'-TCTGTAGACGAAGCTCTGC-3'
<i>Tap</i> Seq-Pr. 1 se	5'-AACACGATGAAGCCGTGGA-3'
<i>Tap</i> Seq-Pr. 1 as	5'-TCCACGGCTTCATCGTGT-3'
<i>Tap</i> Seq-Pr. 2 se	5'-CGAAAGTAGACAACAAATTC-3'
<i>Tap</i> Seq-Pr. 2 as	5'-GAATTTGTTGTCTACTTTCG-3'

Primer für RT-PCR-Reaktionen:

Name	Sequenz
<i>IL-8</i> se	5'-AAGGAACCATCTCACTG-3'
<i>IL-8</i> as	5'-GATTCTTGGAZACCACAGAG-3'
<i>Tubulin</i> se	5'-TTCCCTGGCCAGCT(GC)AA(AGCT)GC(AGCT)GACCT(AGCT)CGCAAG-3'
<i>Tubulin</i> as	5'-CATGCCCTCGCC(AGCT)GTGTACCAGTG(AGCT)A(AGCT)GAAGGC-3'
<i>Mcp1</i> se	5'-AATCAATGCCCCAGTCACCTGC-3'
<i>Mcp1</i> as	5'-GCAAAGACCCTCAAAACATCCC-3'
<i>p21</i> se	5'-ACTGTGATGCGCTAATGG -3'
<i>p21</i> as	5'-AGAAATCTGTCATGCTGG -3'

Tabelle 2: Oligonukleotide

2.8 Antikörper und rekombinante Proteine

- anti-ERK2-Antikörper (C-14, Santa Cruz)

polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus Kaninchen, immunisierendes Peptid abgeleitet von C-terminalen Aminosäuren von p42 (ERK2) der Ratte

- anti-GFP-Antikörper (Boehringer Mannheim)

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

- anti-c-JUN-Antikörper (Cell Signaling Technology)

polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, immunisierendes Peptid abgeleitet von humanem c-JUN, aufgereinigt an Protein A

- anti-c-JUN-Antikörper (H-79, Santa Cruz)

polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit den Aminosäuren 1-79 von humanem c-JUN

- anti-phospho-c-JUN-Antikörper (Ser63) (Cell Signaling Technology)

polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Antikörper erhalten durch Immunisierung mit einem synthetischen phospho-Ser63-Peptid, welches zusätzlich die Ser63-umgebenen Aminosäuren von humanem c-JUN enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A.

- anti-JNK-Antikörper (Cell Signaling Technology)

polyklonal aufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, der totale JNK/SAPK-Mengen erkennt, Immunisierung erfolgte mit einem Fusionsprotein, welches das gesamte p54/JNK enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A

- anti-phospho-JNK-Antikörper (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling Technology)

polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Antikörper erhalten durch Immunisierung mit einem synthetischen phospho-Thr183/Tyr185-Peptid, welches zusätzlich die Thr183/Tyr185-umgebenen Aminosäuren von humanem p54/JNK enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A

- anti-RXR-Antikörper (D-20, Santa Cruz)

polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, immunisierendes Peptid abgeleitet von den N-terminalen Aminosäuren des humanen RXR (2-21)

- anti-TAB1-Antikörper (Prof. Matsumoto, Nagoya, Japan)

polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung mit Peptid der Aminosäuren 480-500 aus TAB1

- anti-Maus IgG-POD-Antikörper und anti-Kaninchen IgG-POD-Antikörper:

Pharmacia, Freiburg

- humanes, rekombinantes GST-c-JUN (1-135):

Prof. Dr. M. Kracht

- humanes, rekombinantes IL-1:

Prof. Dr. J. Saklatvala

2.9 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Klonierung wurden die folgenden *E. coli*-Stämme verwendet:

- XL1 Blue

Genotyp: F⁺ *Tn10* (*Tet*^r) *proA*+*B*+ *lacI*^h Δ (*lacZ*)*M15I* *recA1* *gyrA96* (*Nal*^r) *thi-1* *hsdR17* (*r_k m_k*) *glnV44* *relA1* *lac*

- TOP10

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str*^R) *endA1* *nupG*

Die Expression bakterieller Proteine erfolgte in dem *E. coli*-Stamm:

- BL21(DE3)pLysS

Genotyp: F⁻ *ompT* *hsdS_B* (*r_B m_B*) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

pEGFP-TAK1wt	Prof. Dr. M. Kracht, Hannover
pEGFPc1	Clontech, Heidelberg
pEF-TAB1wt	Prof. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
pEGFP-TAB1wt	Ph.D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pEGFP-TAB1C	Ph.D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pEGFP-TAB1C1	Ph.D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pEGFP-TAB1C2	Ph.D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pEGFP-TAB1C3	Ph.D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pEGFP-TAB1N	Ph.D. H. Sakurai, Osaka, Japan
pCS3MT	Dr. P. Holland, London
pCDNA3.1	Invitrogen, Mannheim
pSV- β -Gal	Promega, Karlsruhe
pUHD13.3-IL-8-Promotor-Luc wt	Prof. Dr. M. Kracht, Hannover
pNF- κ B3-Luc	Dr. L. Schmitz, Bern
p(GAL4) ₂ -Luc	Dr. L. Schmitz, Bern
pFA2-c-JUN	Dr. L. Schmitz, Bern
pFC2-dbd	Dr. L. Schmitz, Bern
pFC-MEKK1	Dr. L. Schmitz, Bern

pThm3Ha4	Dr. A. Prochaintz, Frankreich
pCDNA3.1TAPtag	Prof. Gaestl, Hannover
pBS1479	Cellzome, Heidelberg
pVgRXR	Invitrogen, Mannheim
peVHAJNK2	Prof. Dr. M. Kracht, Hannover
pINDLacZ	Invitrogen, Mannheim

Plasmide, die in dieser Arbeit generiert und für weitere Experimente eingesetzt wurden, sind im Ergebnisteil gesondert aufgeführt.

2.10 Peptide

Die in dieser Arbeit eingesetzten zellpermeablen Peptide wurden von Dr. Graham Knight von der *University of Cambridge, Department of Biochemistry* hergestellt. Die Synthese erfolgte als C-terminale Amide in einer Festphasensynthese an einer TentaGel R RAM-Matrix, wobei die Identifizierung der korrekten Verbindung mittels HPLC und MS-Spektroskopie durchgeführt wurde. Einzelheiten zur Synthese sind der Referenz Holzberg et al., 2003 zu entnehmen.

Name	Sequenz
TAT-c-JUN (wt)	YGRKKRRQRRG-GABA-ILKQSMTLNLADPVGSLKPHLRAKN
TAT-c-JUN (scr.)	YGRKKRRQRRG-GABA-DSNLIRGVLP TLMPKSLAQNKLKHA
TAT-TAB1C3 (wt)	YGRKKRRQRRG-GABA-PYVDFAEFYRLWSVDHGEQSVVTAP
TAT-TAB1C3 (scr.)	YGRKKRRQRRG-GABA-VFREPD LSTDWHYASQVGVAFYFYPVE

Tabelle 3: Zellpermeable Peptide

Abkürzungen:

GABA = γ -Aminobuttersäure

wt = *wildtype*

scr. = *scrambled*

2.11 Standards

- DNA-Standards

GeneRuler 100bp DNA Ladder

MBI Fermentas:

1031 bp

900 bp

800 bp

700 bp

600 bp

λ -DNA/ *EcoRI* und *HindIII* Marker 3

MBI Fermentas:

21226 bp

5148 bp

4973 bp

4268 bp

3530 bp

500 bp	2027 bp
400 bp	1904 bp
300 bp	1584 bp
200 bp	1375 bp
100 bp	947 bp
80 bp	831 bp
	564 bp

- Niedermolekularer Proteinstandard (*Low Molecular Weight Calibration Set for SDS Electrophoresis*, Amersham Bioscience):

97kD	Phosphorylase B
66kD	Albumin
45kD	Ovalbumin
30kD	Carboanhydrase
20kD	Trypsininhibitor
14kD	α -Lactalbumin

2.12 Zellkulturtechniken

2.12.1 Zelllinien und primäre Zellen

- HEK293 IL-1R:

humane, adenovirustransformierte, embryonale Nierenzelle; Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan

- HeLa:

humane, epitheloide Cervix-Carcinoma Zelllinie; DSZM Braunschweig

- HuGi:

humane, primäre Zahnfleischfibroblasten; Prof. Dr. J. Saklatvala, London, England

2.12.2 Kultivierung und Passagieren adhärent wachsender Zellen

Die verwendeten Zelllinien sind adhärent und wurden in 25, 75 oder 175 cm² Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und einer wassergesättigten Atmosphäre in DMEM-Vollmedium (10% (v/v) FKS, 2mmol/l L-Glutamin, 1mmol/l Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) kultiviert.

Die Passage adhärent wachsender Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage, sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten. Zu diesem Zweck wurde das Medium dekantiert, neues Medium zugefügt, die Zellen abgeschlagen (HEK293 IL-1R) oder abgescharbt (HeLa und HuGi) und resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche, in der frisches Medium vorgelegt wurde, überführt.

2.12.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in einem Hämocytometer (Neubauer Zählkammer), indem die Zellsuspension 1+1 mit Trypanblau (0,8% (v/v) in PBS) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage Trypanblau aktiv auszuschleiden, während tote oder geschädigte Zellen dies nicht mehr vermögen und blau angefärbt werden. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurde zunächst mit kleiner Vergrößerung kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig in der Kammer verteilt waren, anschließend wurden in der Regel mindestens vier Großquadrate ausgezählt.

Auswertung für vier ausgezählte Großquadrate:

$(\text{Summe der Zellen aller Großquadrate}/4) \times 10000 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellen/ml}$

2.12.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die mit Medium abgelösten Zellen bei 1000rpm für 5min bei RT sedimentiert, in 1ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt.

Die Kryoröhrchen wurden anschließend über Nacht in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol befüllten Nalgene-*Cryo Freezing Container* in einen -80°C Tiefkühlschrank gestellt und zur längeren Lagerung in einem Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

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

Material:

Einfriermedium

DMEM mit 2mmol/l L-Glutamin, 1mmol/l Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 40% FKS, 10% DMSO

2.12.5 Stimulation mit IL-1 und Ernten von Zellen

Die Stimulation der Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 erfolgte in Vollmedium in einer finalen Konzentration von 10ng/ml. Zum Ernten der Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS abgescharbt, anschließend für 10min bei 500xg und 4°C abzentrifugiert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.12.6 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einführen von Fremd-DNA in eine Eukaryotenzelle, meist mit dem Ziel, eines oder mehrere Gene der neu aufgenommenen DNA zu exprimieren und zu charakterisieren. Es gibt verschiedene Techniken, um eukaryotische Zellen zu transfizieren, z.B. die Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode, die Elektroporation, das Einsetzen viraler Vektoren oder die Verwendung kationischer Liposomen.

Bei der stabilen Transfektion, wird die eingeführte DNA dauerhaft in das Genom der Zelle eingebaut, während dies bei transienten Transfektion nicht geschieht, und die Zellen die Fremd-DNA nach mehreren Tagen der Kultivierung wieder verlieren.

2.12.6.1 Transiente Transfektion von Zelllinien mit der Kalziumphosphat-Methode

Diese Methode macht sich die schwere Löslichkeit des Salzes Kalziumphosphat zunutze. Die Ausbildung von Kalziumphosphat-DNA-Komplexen wird dabei durch langsames Mischen einer HEPES-gepufferten Salzlösung mit einer Lösung aus Kalziumchlorid und DNA initiiert. Die Präzipitate lagern sich anschließend auf der Oberfläche der Zellen ab und werden über einen nicht geklärten Mechanismus von 10-30% Zellen aufgenommen.

Die Transfektionseffizienz ist von einer Vielzahl verschiedener Parameter, wie z.B. den verwendeten Zellen, der angewandten Methode oder der Größe und Qualität der zu transfizierenden DNA abhängig.

Die folgenden Angaben gelten für jeweils ein Loch einer 6-Loch Platte. Erfolgte die Transfektion der Zellen in anderen Kulturgefäßen, wurden die einzelnen Volumina der Kulturfläche angepaßt. Am Vortag der Transfektion wurden pro Loch 4×10^5 Zellen in 2ml Medium ausgesät. Für jedes Loch wurden 225µl 2xHEBS, 250µl H₂O und die gewünschte Menge DNA gemischt, die Bildung der Präzipitate erfolgte durch vorsichtige Zugabe von 31,5µl einer kalten 2mol/l CaCl₂-Lösung. Die Suspension wurde auf die Zellen pipettiert und diese dann für mindestens 4h im Brutschrank inkubiert. Zum Entfernen der Präzipitate wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2ml frischem Medium versehen und für weitere 24-48h kultiviert.

Variationen dieser allgemeinen Prozedur sowie die jeweils transfizierten DNA-Mengen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

2.12.6.2 Herstellung eines stabilen Transfektanten-Zellpools

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie HEK293 IL-1R stabil mit dem Plasmid pVgRXR transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 6-Loch Platten nach der Kalziumphosphatmethode. Nach 48h wurden die Zellen aus drei Löchern vereinigt und in eine 75cm² Zellkulturflasche überführt, in denen ca. vier Wochen die Selektion mit dem Antibiotikum Zeozin (400µg/ml) durchgeführt wurde, dessen Resistenzgen auf dem pVgRXR-Plasmid liegt. Falls die Flaschen zu dicht wurden, wurden diese wie bereits beschrieben geteilt.

2.12.6.3 Etablierung eines genspezifischen *knock downs* durch Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA-Molekülen

Wird durch Einbringen von dsRNA in eukaryotische Zellen eine sequenzspezifische Expressionsreduktion von einem homologen endogenen oder exogen eingebrachten Gen erreicht, wird allgemein von RNAi (RNA Interferenz) gesprochen.

Die als siRNA-Moleküle (*small interfering RNA*) bezeichneten Effektoren wirken, indem sie die Konzentration komplementärer mRNA-Moleküle herabsetzen. Der Mechanismus von RNAi ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass RNAi posttranskriptionell wirkt (Montgomery and Fire, 1998), indem die siRNA-Moleküle nach Bindung an die endogene, komplementäre mRNA-Sequenz einen RNAi-spezifischen Enzymkomplex RISC (*RNA Interference Specificity Complex*) zur mRNA des Zielgens rekrutieren und somit zu deren Abbau führen. Die mRNA-Degradation des Zielgens kann auf RNA- und Proteinebene beobachtet werden.

siRNA-Moleküle mit einer Länge von 19-21 Nukleotiden und symmetrischen zwei bis drei Nukleotidüberhängen (U oder T) haben sich als Effektormoleküle bewährt. Die kurzen Überhänge an beiden Strängen erhöhen die Nukleaseresistenz dieser Moleküle innerhalb der Zelle.

In dieser Arbeit wurde ein Gemisch aus vier verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen den Transkriptionsfaktor c-JUN eingesetzt (siRNA SMARTpool c-JUN). Sequenzinformationen zu den siRNA-Molekülen sind von der Herstellerfirma Dharmacon nur gegen einen Aufpreis zu erhalten und lagen deshalb nicht vor. Das Lyophilisat wurde in einer Konzentration von 20µmol/l in 1x Universalpuffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Etablierung eines transienten c-JUN *knock downs* erfolgte sowohl in der Zelllinie HeLa als auch in den primären Zahnfleischfibroblasten HuGi. Die Transfektion wurde dabei mit speziell für kleine RNA-Moleküle geeigneten liposomalen Transfektionsreagenzien durchgeführt. Die finale Konzentration der siRNA-Moleküle im Medium betrug 5-200nmol/l.

2.12.6.3.1 Transfektion von siRNA-Molekülen mit TransIT-TKO

Am Vortag der Transfektion wurden 5×10^5 -Zellen/24-Loch ausgesät. Pro 24-Loch wurden am Versuchstag (Zellen ca. zu 70% konfluent) 50µl DMEM ohne Zusätze mit den entsprechenden Volumina des Transfektionsreagenzes TransIT-TKO der Firma Mirus sowie der siRNA-Stammlösung gemischt und zur Komplexbildung für 20min bei RT inkubiert. Vorverdünnungen der siRNA-Stammlösung wurden, wenn nötig, in 1x Universalpuffer angesetzt. Anschließend wurde die Komplexlösung aus Transfektionsreagenz und siRNA-Molekülen auf die Zellen gegeben und diese für die gewünschte Zeit im Brutschrank kultiviert (üblicherweise 48h). Das finale Volumen an Medium auf den Zellen betrug 300µl/24-Loch.

2.12.6.3.2 Transfektion von siRNA-Molekülen mit Oligofectamine

Das Aussäen der Zellen erfolgte wie für die Transfektion mit TransIT-TKO beschrieben. Am Versuchstag wurde das gewünschte Volumen an Oligofectamine (Invitrogen) in DMEM ohne Zusätze verdünnt und für 10min bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde ein bestimmtes Volumen an siRNA-Stammlösung oder -Verdünnung in DMEM pipettiert (finales Volumen 42,5µl). Beide Ansätze wurden gemischt und im Anschluß für mindestens 15min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen, mit 200µl DMEM ohne Zusätze/24-Loch versehen, und die Komplexlösung wurde zu den Zellen gegeben, welche in der Folge für mindestens 4h in Brutschrank inkubiert wurden (finales Volumen auf den Zellen 250µl/24-Loch). Zum Abstoppen der Transfektion wurden 50µl DMEM mit der dreifachen Serum-Konzentration/24-Loch hinzupipettiert und die Zellen für die gewünschte Zeit weiterkultiviert (üblicherweise 48h).

Falls die Zellen in größeren Kulturgefäßen transfiziert wurden, wurden sämtliche Volumina entsprechend der Fläche neu berechnet.

2.13 Arbeiten mit Bakterienkulturen

Alle verwendeten Bakterienstämme leiten sich von dem *E. coli* Sicherheitsstamm K12 ab. Die Aufzucht der Bakterien erfolgte in Flüssigkulturen mit LB-Medium bei 37°C und 200rpm in einem Schüttelinkubator (Certomat H, B. Braun Biotech int.). Antibiotika wurden entsprechend den plasmidcodierten Resistenzen zugesetzt. Ampicilin wurde mit einer finalen Konzentration von 100µg/ml und Kanamycin mit einer finalen Konzentration von 50µg/ml verwendet.

2.13.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Flüssigkultur (5ml LB-Medium) des entsprechenden Leerstammes angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann eine größere Flüssigkultur angesetzt (50-150ml LB-Medium) und so lange inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,3-0,5 erreicht war. Die Zellen wurden pelletiert (4°C, 3000rpm, 10min) und in 1/10 Volumen TSS (*transformation and storage solution*) bei 4°C resuspendiert. Die Suspension wurde sofort auf Eis in 200µl Portionen aliquotiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C. Die Transformation der kompetenten Bakterien wurde wie unter 3.14.4.5 beschrieben durchgeführt.

2.13.2 Herstellung von Dauerkulturen

Die Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen erfolgte bei -80°C als Glycerin-Dauerkultur. Die Herstellung der Glycerinkulturen erfolgte durch das Mischen von einem Teil Bakterienkultur (OD ca. 0,8) und einem Teil Glycerin.

2.14 Molekularbiologische Techniken

2.14.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

2.14.1.1 Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen lässt sich in vier Schritte unterteilen:

- Anzüchten und Ernten einer Bakterienkultur
- Aufbrechen der Zellen und Freisetzung des Zellinhaltes
- Entfernung aller Bestandteile aus dem Zellextrakt außer der DNA
- Anreicherung der entstandenen DNA-Lösung

Für die Lyse der Bakterien zur Gewinnung niedermolekularer DNA stehen verschiedenste Methoden zur Verfügung, von denen die alkalische Lyse die gebräuchlichste ist. Die hier verwendeten Protokolle der Firmen Amersham Biosciences und Qiagen stellen eine Abwandlung dieser Prozedur dar, wobei die weitere Aufarbeitung der DNA über Anionen-Austauscher-Säulen erfolgt.

Die Aufarbeitung erfolgte exakt nach Herstellerangaben (Amersham Biosciences), wobei je nach Plasmid und Bakterienstamm aus 2ml Bakterienkultur ca. 40µg Plasmid-DNA isoliert wurden. Die Elution der DNA von den Anionen-Austauscher-Säulchen erfolgte in der Regel in 30-50µl ddH₂O, und die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.14.1.2 Maxipräparation

Die Aufarbeitung erfolgte exakt nach Herstellerangaben (Qiagen), wobei je nach Plasmid und Bakterienstamm aus 500ml Bakterienkultur ca. 600µg Plasmid-DNA isoliert wurden. Die Aufnahme der getrockneten DNA erfolgte dabei in 200µl ddH₂O, und die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.14.1.3 Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen vom Typ HeLa und HuGi erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *RNeasy Mini-Kits* und des *QLAshredder Kits* der Firma Qiagen. Je nach Zellmenge wurden die Zellen in verschiedenen Volumina an Lysepuffer aufgenommen und über eine *QLAshredder*-Säule aufgebrochen. Nach der Aufreinigung über Silica-Gel-Säulchen erfolgte die Elution der RNA in 30-50µl RNase-freiem Wasser. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.14.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung für RNA und DNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm. Um etwaige Verunreinigungen von Proteinen detektieren zu können, erfolgte die Aufnahme der Spektren stets in einem Bereich von 220-330nm, wobei das Verhältnis der Absorption bei 260nm und 280nm ermittelt wurde. Diese Ratio sollte für DNA zwischen 1,75 und 1,9 liegen, da die DNA bei Werten <1,75 zu stark mit Proteinen und bei Werten >1,9 mit RNA verunreinigt ist. Für RNA sollte die Ratio idealerweise 2,0 betragen. Der Berechnung der Konzentration wurden folgende Verhältnisse zugrunde gelegt:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \cong 40\mu\text{g RNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} \cong 50\mu\text{g DNA/ml}$$

2.14.2 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA

Zur Trennung von DNA-Fragmenten mittels Elektrophorese im Bereich zwischen 200-20000 bp verwendet man in der Regel Gele aus 1-2%igen (w/v) Agaroselösungen, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit annähernd proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts der DNA ist.

Um die Ergebnisse der Gelelektrophoresexperimente sichtbar zu machen, werden die Gele mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt. Dieses schiebt sich zwischen benachbarte Basen (bevorzugt G/C-Paare) einer DNA-Helix, so dass einzelne Banden unter UV-Licht bei 312nm durch das interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden können.

Zur Durchführung wurde die benötigte Agarosemenge in 1x TAE unter Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und nach Abkühlung auf 50°C in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE, wobei die Elektrophorese bei 50-100V für ca. 45-90min stattfand. Das EtBr zur Detektion wurde dem Gel dabei direkt zugesetzt, wobei für 100ml Agaroselösung 10µl der EtBr-Stammlösung (10mg/ml) zugegeben wurden.

Zur Größenbestimmung wurden auf jedem Gel 5-10µl eines geeigneten DNA-Standards aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte durch Aufnahme der Fluoreszenz am *Bio-Doc-Analyser* der Firma Biometra.

2.14.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* der Firma Qiagen durchgeführt.

Zur Extraktion der DNA wurde das gewünschte DNA-Fragment nach der Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und dann genau nach Herstellerangaben weiterverarbeitet. Um die Menge an Agarose gering zu halten, wurden Taschen mit größerem Fassungsvermögen als für analytische Agarosegele gegossen. Im letzten Schritt wurde die DNA, abhängig von der Stärke der Bande im Gel, mit 30-50µl ddH₂O von den Säulchen eluiert.

2.14.4 Herstellung pro- und eukaryotischer Expressionsplasmide

In dieser Arbeit wurden Vektoren sowohl für die Expression von Proteinen in Bakterien als auch in humanen Zelllinien konstruiert. Die Strategien bei der Herstellung dieser Plasmide ist dem Ergebnisteil zu entnehmen.

2.14.4.1 Polymerasekettenreaktion zur Generierung linearer DNA-Fragmente

Bei der PCR-Technik (*polymerase chain reaction*) werden DNA-Abschnitte von einer thermostabilen DNA-Polymerase durch zyklisches Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge und Neusynthese der komplementären DNA-Stränge durch die Polymerase amplifiziert, ausgehend von sich an den 3'-Enden der Einzelstränge anlagernden komplementären Oligonukleotiden (Primer). Dabei ist theoretisch eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erreichbar, der von den zwei eingesetzten Primern flankiert wird.

Neben der RT-PCR zur Amplifikation spezifischer mRNA-Sequenzen (vgl. 3.14.6) wurde die PCR zur Generierung von DNA-Fragmenten für die nachfolgende Klonierung in bestimmte Zielvektoren eingesetzt.

Das standardmäßig verwendete Temperaturprofil zeigt das folgende Schema (20-30 Zyklen):

95°C	1-5min (initiale Denaturierung)
95°C	1min (Denaturierung)
55-70°C	1min (Anlagerung der Primer/Annealing)
72°C	1-2min/kB (Taq-Polymerase); 0,5min/kB (Pfu-Polymerase) (Elongation)
72°C	6-12min (finale Elongation)

Die optimale Annealingtemperatur der Primer hängt von deren Sequenz ab und muss experimentell bestimmt werden. Zur Orientierung kann sie einfach mit der 2+4-Formel abgeschätzt werden: 4°C pro C oder G und 2°C pro A oder T.

Die PCR-Reaktionen wurden unter den folgenden Standardbedingungen durchgeführt.

DNA-Matrize/Template (Plasmide)	50-100ng
Primer <i>sense</i>	0,5mmol/l
Primer <i>antisense</i>	0,5mmol/l
10x Puffer	1x
dNTP	0,2mmol/l pro Nukleotid
MgCl ₂	1,5-5mmol/l
Pfu- oder Taq-Polymerase	2,5U
ddH ₂ O	ad. 50µl

Die zur Zwischenklonierung in den Vektor pCR®II-Blunt amplifizierte PCR-Produkte wurden mit der Pfu-Polymerase hergestellt, alle anderen verwendeten PCR-Produkte mit der Taq-Polymerase. Die Pfu-Polymerase hat aufgrund einer 3'-5' *Proofreading*-Aktivität eine deutlich geringere Fehlerrate, aber auch eine geringere Prozessivität bei der Synthese als die Taq-Polymerase.

Material:

Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) 5U/μl

Pfu DNA-Polymerase (Stratagene) 2,5U/μl

2.14.4.2 Präparation des PCR-Produktes: Restriktionsverdau und Aufreinigung

Vor dem Restriktionsverdau wurde das PCR-Produkt eines präparativen Ansatzes (400-600μl) zunächst einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen und mit 1-Butanol auf ca. 80μl eingengt. Der gesamte Ansatz wurde in der Folge auf einem Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* extrahiert und in 30-50μl ddH₂O eluiert. Das PCR-Produkt wurde nun vollständig zur Erzeugung der passenden Enden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut, wobei ein 50-facher Überverdau für 16h bei 37°C durchgeführt wurde und der Verdau am nächsten Tag über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt wurde. Die DNA wurde in 30-50μl ddH₂O eluiert und für die nachfolgende Ligation eingesetzt.

2.14.4.3 Präparation des Zielvektors: Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Aufreinigung

Zur Vorbereitung des Vektors für die Klonierung, wurde dieser zunächst mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen verdaut, um überhängende Enden zu erzeugen. Dabei wurden in der Regel 40μg DNA unter Überverdau-Bedingungen (50-fach) für 16h bei 37°C verdaut.

Um während der Ligation eine Religation des Vektors zu verhindern und damit die Anzahl an negativen Einzelklonen zu vermindern, wurde der Zielvektor vor der Ligation an den 5'-Enden mit einer Phosphatase (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Zu diesem Zweck wurde dem Restriktionsverdau-Ansatz des Zielvektors am Ende der Inkubation 1μl CIAP (1U/μl) zugesetzt und dieser für weitere 30min bei 37°C inkubiert.

Für den Fall, dass der Vektor beim Restriktionsverdau lediglich linearisiert wurde, wurde der Ansatz im Anschluß über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt, in 50μl H₂O eluiert und bei -20°C gelagert bzw. direkt zur Ligation eingesetzt. Wurde der Zielvektor beim Restriktionsverdau in mehrere Fragmente gespalten, wurde das gewünschte Fragment nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion des Spaltansatzes über ein Agarosegel abgetrennt und wie unter 3.14.3 beschrieben mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* extrahiert.

Material:

Restriktionsendonukleasen (mit entsprechenden Puffern, MBI Fermentas)	10-20U/ μ l
CIAP (MBI Fermentas)	1U/ μ l

2.14.4.4 Ligation

Zur Ligation wurden die linearisierten, gereinigten Zielvektoren und die mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdauten und aufgereinigten PCR-Fragmente eingesetzt, wobei die Verknüpfung der DNA-Fragmente durch die DNA-Ligase aus dem T4-Phagen katalysiert wurde.

Es wurden in der Regel ein äquimolares Verhältnis sowie verschiedene Überschüsse des Inserts über den Zielvektor eingesetzt (1:3, 1:6 und 1:9), wobei die Bestimmung der Konzentrationen des Vektors und des Inserts photometrisch erfolgte. Ein üblicher T4-Ligationsansatz wurde wie folgt hergestellt:

5 μ l	verdauter Zielvektor (200-300ng)
x μ l	verdautes Insert (molares Verhältnis 1:1-1:9)
1,5 μ l	ATP (10mmol/l)
3 μ l	10x Ligase-Puffer
1,5 μ l	T4-DNA-Ligase
ad. 30 μ l ddH ₂ O	

Der Ansatz wurde über Nacht bei 15°C inkubiert und am Folgetag direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Material:

T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)	5U/ μ l
-------------------------------	-------------

2.14.4.5 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* Stämme eingesetzt, die unter 3.9 gesondert aufgeführt sind.

Ein Aliquot der kompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit der gewünschten Menge DNA gemischt. In der Regel wurden 2/3 eines Ligationsansatzes bzw. 10-100ng eines zirkulären Plasmides transformiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, während der sich die DNA an die Bakterienmembran anlagert, wurden die Zellen für 45s einem 42°C-Hitzeschock ausgesetzt und für 5min sofort wieder auf Eis transferriert. Schließlich wurden 800 μ l LB-Medium/200 μ l Bakteriensuspension zugefügt und diese Vorkultur für ca. 1h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Je nach Verwendungszweck wurden mit der Vorkultur direkt antibiotikahaltige Flüssigkulturen beimpft, oder der Transformationsansatz wurde zur Selektion von Einzelklonen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.14.4.6 Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten mittels der TOPO-Technologie

Zur Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten wurde das *Zero Blunt*[®] *TOPO*[®] *PCR Cloning Kit* der Firma Invitrogen verwendet. Der Vektor pCR[®]II-Blunt wird dabei in geöffneter Form geliefert, wobei die Enden kovalent mit dem Enzym Topoisomerase I besetzt sind. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass das PCR-Produkt ohne vorherige Behandlung mit Restriktionsenzymen ligiert werden kann, da die Ligation nach Mischung des PCR-Produktes und des Vektors spontan innerhalb von Minuten durch Abspaltung der Topoisomerase I stattfindet.

Klonierungsreaktion:

PCR-Fragmente wurden wie unter 3.14.4.1 beschrieben mit der Pfu-Polymerase generiert, da diese glatte Enden produziert, die genau in den pCR[®]II-Blunt-Vektor passen. Um ein angemessenes Verhältnis von Vektor zur Insert zu gewährleisten, wurden je nach Ausbeute der PCR 0,5-2µl frisches PCR-Produkt mit 1µl Salzlösung gemischt und mit sterilem Wasser auf 5µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1µl Vektor wurde der Ansatz für 30min bei Raumtemperatur inkubiert, auf Eis transferiert und direkt für die weitere Transformation eingesetzt. Um eine Kontamination mit dem *Template* der PCR zu verhindern, wurden die PCR-Produkte vor dem Einsatz über ein Agarosegel aufgereinigt.

Transformation:

Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente One Shot[™] TOP10 Zellen nach Herstellerangaben. Zur Selektion wurde der gesamte Transformationsansatz über Nacht auf ampicillinhaltigen Platten ausgebracht und bei 37°C inkubiert.

2.14.4.7 Identifikation positiver bakterieller Einzelklone

Um zu prüfen, welche der bakteriellen Einzelklone tatsächlich ein PCR-Insert trug, wurden von den gewachsenen Einzelkolonien antibiotikahaltige 5ml-Flüssigkulturen angelegt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Je nach Konstrukt wurden nach Isolation der Plasmide zur Identifikation positiver Einzelklone verschiedene Strategien gewählt. Zum einen wurde ein analytischer Restriktionsverdau mit den Enzymen der Klonierung durchgeführt, wobei ca. 6µl Plasmid-DNA aus einer Minipräparation (ca. 250ng DNA) in einem 20µl Ansatz mit 0,5µl Restriktionsenzym für mindestens 2h bei 37°C verdaut wurden. Zum anderen wurden PCR-Reaktionen der Plasmid-DNA der Minipräparation unter Verwendung der Klonierungsprimer durchgeführt. Üblicherweise wurden ca. 0,5µl der Plasmid-Präparation (ca. 50ng) in einem 25µl Ansatz wie unter 3.14.4.1 beschrieben eingesetzt. Die Bestimmung der Orientierung der klonierten PCR-Fragmente erfolgte auf die gleiche Weise durch wechselnde Kombinationen an Restriktionsenzymen bzw. PCR-Primern.

2.14.5 Fluoreszenzsequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Methode (Sanger et al., 1977). Die hier durchgeführte Variante stellt eine Kombination aus PCR und Sequenzierreaktion dar (*Taq-cycle-sequencing*), wobei der Ansatz zusätzlich zu den vier Desoxynukleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP die vier Didesoxynukleotide ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP enthält, die jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Der Einbau eines Didesoxynukleotides blockiert das weitere Wachstum der Kette, weil ihm ein 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Auf diese Weise entstehen Fragmente verschiedener Länge, statistisch erfolgen bei genügend langer Reaktionszeit Kettenabbrüche an jeder Position. Das Reaktionsgemisch wird schließlich elektrophoretisch aufgetrennt, wobei aus der Reihenfolge der Farben beim Verlassen des Gels auf die Sequenz des Templates geschlossen werden kann.

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

4µl	RR-Mix	96°C	30s (Denaturierung)
200-500ng	Plasmid-DNA	50-60°C	15s (Annealing)
2,5µl	Sequenzierprimer (2pmol/l)	60°C	240s (Extension)
ad. 20µl	HPLC-H ₂ O	4°C	

Es wurden 25 Zyklen durchlaufen. Anschließend wurden 80µl ddH₂O zugefügt und der gesamte Ansatz in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum Fällen der DNA wurden 10µl einer 3mol/l NaAc-Lösung und 250µl 100% Ethanol hinzugegeben und die DNA abzentrifugiert (20-30min, 13000rpm, RT). Der Überstand wurde abgezogen, die DNA mit 200µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10min, 13000rpm, RT). Das DNA-Pellet wurde schließlich bei 37°C vollständig getrocknet, in 20µl TSR aufgenommen und erhitzt (2min, 95°C). Das Erstellen der Sequenz erfolgte durch den 310 *Abi Prism™ Genetic Analyzer*.

Material:

DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction:

ready reaction mix (RR-Mix enthält alle dNTPs, ddNTPs, PCR-Reaktionspuffer, Mg²⁺-Ionen und Polymerease)

template supression reagent (TSR)

2.14.6 RT-PCR zur Amplifikation spezifischer mRNA-Sequenzen

Zur Amplifikation von mRNA muss diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, wozu als Reverse Transkriptasen bzw. RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnete Enzyme verwendet werden. Zur Reversen Transkription der gesamten Zell-mRNA werden Oligo-(dT)-Primer (12-20 Basen Länge), die an den Poly(A)-Schwanz der

mRNA binden oder Gemische aus Zufalls-Hexamer-Primern verwendet. Die Gesamtreaktion aus Reverser Transkription und Amplifikation der cDNA durch PCR wird entsprechend als RT-PCR bezeichnet.

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

Probenmix:	RT-Mix:
1µl p(N)6 DNA-Hexamere (200ng/µl)	0,5µl 5xRT-Puffer
1µl dNTP-Mix (10mmol/l pro Nukleotid)	1µl MMLV-Reverse Transkriptase
3,5µl 5xRT-Puffer	1µl ddH ₂ O
2µl DTT (0,1mol/l)	
10µl Gesamt-RNA (0,3-2µg)	

Die Reverse Transkription wurde wie folgt durchgeführt:

65°C 15min (Denaturierung)
Eis 1min
13000rpm, 4°C, 1min
23°C 10min (Annealing)
Zugabe des RT-Mixes
37°C 60min (Extension)
cDNA-Proben wurden im Anschluss bei -20°C gelagert.

Die nachfolgende PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

2-4µl RT-Ansatz (je nach Gen)
0,5µl dNTP-Mix (10mmol/l pro Nukleotid)
0,25µl Primer *sense* (100µmol/l)
0,25µl Primer *antisense* (100µmol/l)
2,5µl 10x PCR-Puffer
1µl MgCl₂ (50mmol/l)
0,5µl Taq-DNA-Polymerase
ad. 25µl ddH₂O

Die PCR wurde nach dem unter 3.14.4.1 beschriebenen Temperaturprofil durchgeführt.

Material:

MMLV-Reverse Transkriptase (Gibco BRL)	200U/µl
DTT (Gibco BRL)	0,1mol/l

Die für die PCR benötigten Materialien sind unter 3.14.4.1 gesondert aufgeführt.

2.14.7 DNA-Microarray-Analyse

Die DNA-Microarray-Analysen in dieser Arbeit wurden im Rahmen des Teilprojektes Z02 des Sonderforschungsbereiches 1765 von Herrn Dr. Oliver Dittrich-Breiholz und Frau Heike Schneider durchgeführt.

Der dort entwickelte *Array* enthält Oligonukleotide in einer Länge von jeweils 50 Basen. Diese sind komplementär zu 110 Genen, denen eine wichtige Funktion im Entzündungsprozeß zukommt und die durch eine intensive Literaturrecherche ausgewählt wurden. Zusätzlich sind verschiedene Haushaltsgene auf dem *Array* vertreten. Von einigen Ausnahmen abgesehen, wurden drei spezifische Oligonukleotide pro Gen durch ein Computerprogramm in Zusammenarbeit mit der Firma MWG Biotech ausgewählt, wobei zur Validierung der einzelnen Oligonukleotide eine Großzahl von Experimenten mit verschiedenen Stimuli und Zelllinien durchgeführt wurden.

Zur Detektion differentiell exprimierter Gene in zwei unterschiedlichen mRNA-Populationen wurde fluoreszenzmarkierte cRNA durch reverse Transkription von jeweils 5µg totaler RNA hergestellt. Die RNA wurde zu diesem Zweck nach Protokoll 3.14.1.3 gewonnen und mit DNaseI verdaut. Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mit einem System der Firma Roche, erfolgte die Generierung der markierten cRNA mit Hilfe des *MEGAscript T7 Kits* von Ambion aus 100ng doppelsträngiger cDNA mit 1,25mmol Cy3-UTP. Die markierte cRNA wurde über Nacht bei 42°C auf einen *Array* hybridisiert, welcher am folgenden Tag in einer SSC-Reihe absteigender Konzentration gewaschen, getrocknet und mit einem *Affymetrix 428 scanner* eingescannt wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte computergestützt mit speziellen Programmen der Firmen MWG Biotech und Biodiscovery.

Die Qualitätskontrolle der auf die *Arrays* hybridisierten cRNAs erfolgte durch einen LabChip® der Firma Agilent (RNA 6000 LabChip® *Kit*). Diese Methode zur Nukleinsäureanalytik beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, wobei die Detektion der RNA-Fragmente anhand eines in die RNA eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt. Hierfür wird ein sehr geringes Probenvolumen von 1µl bzw. eine Probenmenge von etwa 25-800ng benötigt. Die Proben bewegen sich aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch eine Mikrokapillare, und die RNA-Fragmente werden ihrer Größe entsprechend separiert und anhand der Fluoreszenz detektiert.

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

2.15 Proteinbiochemische Techniken

2.15.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen

Die Herstellung von Ganzzelllysaten erfolgte zur Messung von Reportergenaktivitäten und zur Immunodetektion im Westernblot. Zusätzlich wurden Ganzzellextrakte für die Generierung von 100000xg-Überständen eingesetzt. Die Präparation der Ganzzellextrakte wurde auf Eis

durchgeführt, um eine Degradation zellulärer Proteine und eine Dissoziation zellulärer Proteinkomplexe zu vermeiden. Das Zellmaterial wurde je nach Verwendungszweck mit unterschiedlichen Methoden in einem passenden Zellysepuffer aufgeschlossen, die im Folgenden aufgeführt sind.

2.15.1.1 Lysate zur Immunodetektion im Western-Blot

Durch Verwendung eines Lysepuffer mit einer relativ hohen Triton X-100-Konzentration von 1% sollte sichergestellt werden, dass die Zellen vollständig lysiert wurden und die Proteinkonzentration somit hoch war.

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, für 1min bei 13000rpm und 4°C pelletiert, in Lysepuffer resuspendiert und gevortext. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen abzentrifugiert (13000rpm, 15min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Je nach Zelltyp wurden für eine einem 6-Loch entsprechenden Zellmenge ca. 50µl Lysepuffer verwendet.

Material:

Lysepuffer 1

40mmol/l	Tris (pH 7,05)
120mmol/l	Natriumpyrophosphat
80mmol/l	β-Glycerophosphat
200mmol/l	NaCl
200mmol/l	NaF
8mmol/l	Na ₃ VO ₄
1% (v/v)	Triton X-100
0,5mmol/l	PMSF
0,5µg/ml	Leupeptin
0,5µg/ml	Pepstatin

2.15.1.2 Lysate zur Messung von Reportergenaktivitäten

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

Material:

Lysepuffer 2

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

2.15.1.3 Lysate zur Herstellung von 100000xg-Überständen

Die Herstellung von Ganzzellextrakten für 100000xg-Zentrifugationen erfolgte sehr schonend durch Osmolyse mit hypotonem Puffer mit geringer Detergenzkonzentration. Der Zellaufschluss wurde durch Scherkräfte mit Hilfe von Kanülen vervollständigt.

Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, in PBS abgescharbt und für 10min bei 4°C und 500xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Zellmenge in einem bestimmten Volumen 5mmol/l Tris pH 8,0 resuspendiert (für vier bis fünf 75cm²-Flaschen 200-300µl). Es erfolgte das Quellen der Zellen in diesem hypoosmolaren Puffer für 15min auf Eis und die Zugabe des entsprechenden Volumens 4x Lysepuffer. Nachdem die Zellen für weitere 20min auf Eis lysiert wurden, wurde das krude Lysat zum vollständigen Zellaufbruch viermal durch eine 20-Gauge und viermal durch eine 26-Gauge Nadel gepresst und schließlich für 30min bei 4°C und 100000xg in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet des 100000xg-Überstandes wurde in 1x Laemmli-puffer für 10min bei 95°C aufgeköcht.

Material:

Lysepuffer 3 (4x)

80mmol/l	HEPES (pH 7,7)
80mmol/l	β-Glycerophosphat
10mmol/l	MgCl ₂
0,4mmol/l	EDTA
0,4mmol/l	Na ₃ VO ₄
0,2% (v/v)	Triton X-100
1mmol/l	DTT
1mmol/l	PMSF

2.15.1.4 Direktlysate

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

Material:

Lysepuffer 4

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

2.15.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

Das Reagenz wurde aus einer Mischung des Farbstoffkonzentrats Roti Quant 40% (v/v) und ddH₂O 60% (v/v) hergestellt.

In einer 96-Loch-Platte wurden 100µl der zu messenden Probe und einer BSA-Eichreihenlösung als Dreifachwerte vorgelegt und mit 100µl der Farbstofflösung versetzt. Nach ca. 5min Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Extinktion bei 595nm in einem *Elisa Reader*. Die Konzentration der Probe wurde anhand der Eichreihe bestimmt.

Material:

BSA (*bovine serum albumin*) Eichreihe, 0- 35mg/ml in PBS Puffer

Farbstoffkonzentrat Roti Quant (Firma Roth GmbH), 1:2,5 in ddH₂O

2.15.3 Bestimmung der Aktivität von Enzymen

2.15.3.1 Reporter-gen-Versuche

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

2.15.3.1.1 **Luziferase-Messung**

Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch mit CoA den Farbstoff Luziferin um, wobei es durch Chemilumineszenz zur Aussendung von Licht kommt.

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte als Doppelwert. Dazu wurden 20µl Lysat in einem Messröhrchen vorgelegt und in das Luminometer gestellt. Nach Injektion von 100µl der Luziferase-Reagenzes durch das Gerät erfolgte 5s später die Messung der Chemilumineszenz für 10s.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Luziferase-Reporter-gen-plasmide verwendet. Bei dem Plasmid pUHD13.3-IL-8-Promotor-Luc-wt wird das Reporter-gen von einem minimalen humanen IL-8 Promotor kontrolliert, der unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B besitzt.

Bei dem Plasmid pNF- κ B-3-Luc wurde die Expression von Luziferase durch einen Promotor mit einer dreifachen Konsensus-Bindungsstelle für den dimeren Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert.

Das Reporterplasmid p(GAL4)₂-Luc besitzt Bindungsstellen für die DNA-bindende Domäne des Hefe-Transkriptionsaktivators GAL4, von dem in höheren eukaryotischen Zellen keine Bindungspartner bekannt sind. Bei der Expression von Fusionsproteinen aus Transkriptionsfaktoren und der DNA-bindenden GAL4-Domäne ist es daher möglich, durch den Reportergergenversuch das transaktivierende Potential dieses Fusionsproteins zu messen.

2.15.3.1.2 β -Galaktosidase-Messung

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

Zur Inaktivierung der endogenen β -Galaktosidase wurden 20 μ l Lysat 1h bei 50°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und wieder auf Raumtemperatur erwärmt.

Zur Messung wurden 7,5 μ l Lysat in ein Luminatorröhrchen vorgelegt und mit 25 μ l eines β -Galaktosidasepuffer-Substratgemisches (pro 7,5 μ l Lysat: 25 μ l Reaktionspuffer + 0,5 μ l Substratlösung) für 30min bei RT inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte direkt im Anschluss für 10s. Jede Probe wurde als Doppelwert gemessen.

Die Messung der vom Plasmid pIND-LacZTAPtag kodierten β -Galaktosidase erfolgte analog.

Material:

β -Galaktosidase-Kit der Firma Clontech bestehend aus Reaktionspuffer und Substrat (keine genaueren Informationen erhältlich)

2.15.3.2 *in vitro* Kinaseversuch zur Bestimmung der Aktivität von JNK

Zur Bestimmung der Aktivität der Proteinkinase JNK wurden *in vitro* Kinaseversuche in der Anwesenheit von radioaktiv markiertem γ -³²P-ATP durchgeführt.

2.15.3.2.1 Mit endogener JNK

Zur Bestimmung der Aktivität von endogenen JNK-Proteinen wurden die Zellen aus einer unstimulierten bzw. für 15min mit IL-1 (10ng/ml) stimulierten 75cm²-Flasche zunächst 2x in kaltem PBS gewaschen und geerntet. Die Zellpellets wurden in jeweils 150 μ l 5mmol/l Tris pH 8,0 resuspendiert, und es folgte das Quellen der Zellen in diesem hypoosmolaren Puffer für 15min auf Eis und die Zugabe des entsprechenden Volumens 4x Lysepuffer. Nachdem die Zellen für weitere 20min auf Eis lysiert wurden, wurde das krude Lysat zum vollständigen Zellaufbruch viermal durch eine 20-Gauge und viermal durch eine 26-Gauge Nadel gepresst und

schließlich für 30min bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Pro Ansatz wurden 40µl GSH-Beads dreimal mit 1x Lysepuffer gewaschen und mit 2,5µg GST-c-JUN (1-135) für 30min bei 30°C unter Durchmischung inkubiert. 500µg der Zellextrakte wurden zugegeben und für 1,5h bei 4°C mit den GSH-Beads inkubiert, wobei je nach Versuchsansatz 100µmol/l TAT-c-JUN (wt) zugesetzt wurden. Die Beads wurden anschließend dreimal mit 1x Lysepuffer gewaschen und mit 10µl ddH₂O und 10µl Kinase-Puffer versehen und für 30min bei 30°C unter Durchmischung inkubiert. Schließlich wurden die Ansätze in 1x Laemmli-Puffer aufgekocht und die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Phosphoryliertes GST-c-JUN (1-135) wurde nach Trocknung der Gele durch Autoradiographie detektiert.

Material:

4x Lysepuffer (pH 7,4)	
80mmol/l	HEPES
80mmol/l	β-Glycerophosphat
10mmol/l	MgCl ₂
0,4mmol/l	EDTA
0,4mmol/l	Na ₃ VO ₄
0,2% (v/v)	Triton X-100
1mmol/l	DTT
1mmol/l	PMSF

Kinase-Puffer (pH 7,4)

150mmol/l	Tris-Cl
30mmol/l	MgCl ₂
60µmol/l	ATP
4µCi/Ansatz	γ- ³² P-ATP

GSH-Sepharose (Pharmacia)

2.15.3.2.2 Mit überexprimierter JNK-TAPtag

Zur Bestimmung der Aktivität des Fusionsproteins JNK-TAPtag wurde zunächst eine TAP-Aufreinigung nach Protokoll 3.15.7.3.2 durchgeführt, wobei von jedem Aufreinigungsschritt ein Aliquot entnommen und bis zum Kinaseversuch auf Eis gelagert wurde.

2.15.3.2.2.1 Mit Substrat GST-c-JUN

Jeweils 1/10 jeder Fraktion wurde mit 1µg GST-c-JUN (1-135) gemischt und mit 13µl Kinase-Puffer versehen. Nach 30min Inkubation bei 30°C unter Durchmischung wurde der Ansatz mit

1x Laemmli-Puffer aufgekocht und gelektrophoretisch aufgetrennt. Phosphoryliertes GST-c-JUN (1-135) wurde nach Trocknung der Gele durch Autoradiographie detektiert.

Material:

vergleiche Kinase-Versuch mit endogenen JNK-Proteinen

2.15.3.2.2.2 Ohne Substrat GST-c-JUN

Die TAP-Aufreinigung wurde vollständig durchlaufen. Das Eluat wurde je nach Versuch aufgeteilt und mit 13µl Kinase-Puffer mit der doppelten Menge an γ -³²P-ATP (8µCi/Ansatz) versehen.

Nach 45min Inkubation bei 30°C unter Durchmischung bei 30°C wurde der Ansatz mit 1x Laemmli-Puffer aufgekocht und gelektrophoretisch aufgetrennt. Phosphorylierte Proteine wurden nach Trocknung der Gele durch Autoradiographie detektiert.

Material:

vergleiche Kinase-Versuch mit endogenen JNK-Proteinen

2.15.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

2.15.4.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

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

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

	Trenngel (10% PAA)	Sammelgel (5% PAA)
bidest. (µl)	2740	3255
Trenngelpuffer (µl)	4600	/
Sammelgelpuffer (µl)	/	630

AA/BA 30% (μl)	4000	840
SDS 2% (μl)	600	250
APS 40% (μl)	36	15
TEMED (μl)	24	10

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

Gele mit 7cm Trennstrecke: 35mA pro Gel

Gele mit 12cm Trennstrecke: 50mA pro Gel

Nach der Elektrophorese wurden die Gele je nach Anwendung gefärbt oder Western-Blot oder zur Exposition auf einen Röntgenfilm eingesetzt.

2.15.4.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schägger und Jagow

Da die SDS-PAGE nach Laemmli unterhalb von 20kD nur eine unzureichende Auftrennung von Proteinen zeigt, wurde auf die Methode von Schägger und Jagow zurückgegriffen, mit der Proteine zwischen 1-20kD mit sehr guter Trennleistung in einem Polyacrylamidgel dargestellt werden können. Die bessere Trennleistung beruht dabei auf einem verbesserten Sammeleffekt der Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel durch Verwendung eines zusätzlichen Geles (*spacer gel*) zwischen Sammel -und Trenngel und dem Einsatz von Tricin statt Glycin als Laufion.

Es wurden Gele mit einer 12cm Trennstrecke verwendet, wobei die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 100V durchgeführt wurde. Die Herstellung der Gele erfolgte nach folgendem Schema:

	Trenngel	<i>spacer gel</i>	Sammelgel
Lösung A (μl)	6000	/	/
Lösung B (μl)	/	1010	565
Gelpuffer (μl)	6000	1670	1750
Harnstoff (g)	6,48	/	/
APS 40% (μl)	6	2	6
TEMED (μl)	15	5	15
bidest.	ad. 18ml	ad. 5ml	ad 7ml

Zunächst wurde das Trenngel in die Elektrophoreseappatur gegossen und vorsichtig mit dem *spacer gel* überschichtet. Nach 1h der Polymerisation wurde das Sammelgel mit den Probenflaschen gegossen, die Proben mit 3x Probenpuffer versetzt und für 30min bei 40°C inkubiert. Nach Auftrag der Proben wurde die Elektrophorese wie beschrieben durchgeführt.

Material:

Lösung A

46,5% (w/v)	Acrylamid
3% (w/v)	Bisacrylamid

Lösung B

48% (w/v)	Acrylamid
1,5% (w/v)	Bisacrylamid

Gelpuffer

3mol/l	Tris-Cl
0,3% (w/v)	SDS
pH 8,45	

Kathodenpuffer

0,1mol/l	Tris
0,1mol/l	Tricin
0,1% (w/v)	SDS
pH 8,25 (pH nicht einstellen)	

Anodenpuffer

0,2mol/l	Tris-Cl
pH 8,9	

3x Probenpuffer

12% (w/v)	SDS
36% (w/v)	Glycerol
150mol/l	Tris-Cl
6% (v/v)	β -Mercaptoethanol
0,03% (w/v)	Serva Blue G
pH 6,8	

2.15.5 Färbemethoden zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.15.5.1 Färbung von Proteingelen mit *Coomassie*

Das Anfärben und Fixieren der Proteinbanden erfolgte mit einer *Coomassie Brilliant Blue G250*-Lösung. Zu diesem Zweck wurden die SDS-Polyacrylamidgele für 15-30 min bei RT mit der Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung für mindestens 2h oder über Nacht entfärbt, bis nur noch die gefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Zur Konservierung wurden die Gele schließlich auf einem Gelrockner in der Wärme unter Vakuum getrocknet. Die Nachweisgrenze einer *Coomassie*-Färbung liegt bei ca. 100ng Protein.

2.15.5.2 Färbung von Proteingelen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Fixierung der Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Ruby (Bio-Rad) erfolgte in Plastikschaalen in einer Lösung aus 10% (v/v) Methanol und 7% (v/v) Essigsäure für 30min. Das Färben der Gele wurde für ca. 3h bei RT und langsamen Schwenken unter Lichtabschluss durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Anregung mit ultraviolettem Licht (250nm) an der *Gel doc 1000* Apparatur der Firma Bio Rad, wobei die optimale Anregungswellenlängen für SYPRO Ruby 300nm und 618nm betragen.

2.15.5.3 Färbung von Proteingelen mit Silber

Falls hoch empfindliche Nachweismethoden für Proteine nötig waren, wurden die Polyacrylamidgele mit Silber angefärbt. Die Nachweisgrenze einer Silberfärbung liegt bei ca. 10ng Protein.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine zunächst für 1h mit 12,5% TCA-Lösung im Gel fixiert. Nach viermaligem Waschen des Gels mit ddH₂O für jeweils 10min wurde dieses für mindestens 1h mit der Natriumthiosulfat-haltigen Lösung inkubiert und anschließend sorgfältig sechsmal für 10min mit ddH₂O gewaschen. Zur Färbung wurde das Gel für 1h mit der AgNO₃-Lösung behandelt, zweimal kurz mit ddH₂O gewaschen, und schließlich wurden die Proteinbanden unter leichtem Schütteln mit der Entwicklerlösung (1-5min) dargestellt.

Material:

Fixierlösung

12,5% (w/v) TCA

Inkubationslösung

500mol/l Natriumacetat

2% (v/v) Glutaraldehyd

20mmol/l Natriumthiosulfat

Färbelösung

6mmol/l Silbernitrat
0,05% (v/v) Formaldehyd

Entwickler

235mmol/l Natriumcarbonat
0,01% (v/v) Formaldehyd
pH 11,3-11,8

Stopplösung

5% (v/v) Essigsäure

2.15.6 Transfer von Proteinen auf eine Membran (*Western-Blot*) und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion

Beim *Western-Blot* handelt es sich um eine analytisch, immunologische Methode, die zum spezifischen Nachweis geringer Proteinmengen aus einem komplexen Gemisch geeignet ist. Die gebräuchliche Trivialbezeichnung Western-Blotting geht dabei auf den Erfinder der *Blot*-Technik namens Southern zurück (Southern, 1975), der die Methode 1971 für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als *Southern-Blot* eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von RNA-Fragmenten *Nothern-Blot* genannt, die Technik für Proteine als *Western-Blot* bezeichnet.

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im *semi dry*-Verfahren. Dazu wurde eine auf das Gel zugeschnittene, nach Herstellerangaben voraktivierte PVDF-Membran luftblasefrei auf das Gel gelegt und von oben und unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2mm) luftblasenfrei eingelegt, welches zuvor in 1x Blot-Puffer mit 20% Methanol getränkt wurde. Die Elektrophorese erfolgte für 2h bei 0,75mA/cm², wobei der Transfer der Proteine im Anschluß durch Färbung der Membran mit *Coomassie*-Lösung überprüft wurde. Nach Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit 100% Methanol vollständig entfärbt und in TBST gewaschen.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese für 1h bei RT in 5% Magermilchpulver (in TBST) geschüttelt.

Anschließend wurde die Membran mit einer Verdünnung (1:500 bis 1:3000 je nach Antikörper) des Primärantikörpers in 5% Magermilch oder 5% BSA in TBST über Nacht unter Schwenken bei 4°C inkubiert, wonach überschüssiger Antikörper durch sechsmaliges Waschen mit TBST entfernt wurde. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte mit einer Verdünnung (1:2000 bis 1:3000) eines HRP-gekoppelten (*horseradish peroxidase*) Detektionsantikörpers in 5% Magermilch für 2-3h bei RT.

Überschüssiger Antikörper wurde erneut durch sechsmaliges Waschen mit TBST entfernt und die Immunodetektion erfolgte anhand der Chemilumineszenz, die durch die Enzym-Substrat Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz (*enhanced chemiluminescence*) entstand, das nach den Angaben des Herstellers eingesetzt wurde.

2.15.7 Expression und Aufreinigung von Histag-Fusionsproteinen

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene 6xHistag-Proteine -6xHIS-MYC-ANTP-TAB1C und 6xHIS-MYC-ANTP-GFP- bakteriell exprimiert und über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (Hochuli et al., 1987). Das Prinzip beruht auf den chelatisierenden Eigenschaften von NTA (*nitrilotriacetic acid*), wobei vier der sechs Ligandenbindungsstellen eines Ni²⁺-Ions durch NTA besetzt werden, während die verbleibenden zwei Stellen mit dem 6xHistag interagieren können.

Die Aufreinigung kann dabei sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von z.B. Harnstoff stattfinden.

2.15.7.1 Induktion der Expression

Zur Expression der beiden Proteine 6xHIS-MYC-ANTP-TAB1C und 6xHIS-MYC-ANTP-GFP wurden die Vektoren pThm3Ha4-TAB1C und pThm3Ha4-GFP kloniert, wobei es sich bei pThm3Ha4 um einen modifizierten pET-3a-Vektor handelt, bei dem die Expression über einen T7-Promotor reguliert wird. Die Transformation erfolgte in den Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS, ein spezieller Expressionsstamm, der defizient in den beiden Proteasen *lon* und *pmpT* ist, was zu einer erhöhten Stabilität und damit Ausbeute des exprimierten Proteins führt. Da in diesen Bakterien das Gen für die T7 RNA-Polymerase (λ DE3) unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht, ist die Induktion der T7-Polymerase-Expression - und damit des Zielproteins - durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thio-galactopyranose, ein Galaktose-Derivat) möglich. Zur Erhöhung der Stringenz im nicht induzierten Zustand tragen diese Bakterien das Plasmid pLysS, welches für T7-Lysozym kodiert, einen natürlich vorkommenden Inhibitor der T7 RNA-Polymerase.

Zur Expression wurden vier bis sechs Kolben mit 500ml LB bestückt, mit einer Vorkultur von transformierten BL21(DE3)pLysS angeimpft und auf eine optische Dichte von ca. 0,06 eingestellt. Im Inkubator wurden die Kulturen dann bei 37°C für ca. 3h bis zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 geschüttelt, und die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch Zugabe von 0,8mmol/l IPTG induziert. Nach 4h wurden die Zellen geerntet (15min, 3000rpm, 4°C), einmal mit kaltem PBS gewaschen und schließlich bei -80°C eingefroren.

2.15.7.2 Aufreinigung

2.15.7.2.1 Aufreinigung unter nativen Bedingungen

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden für 30min auf Eis aufgetaut und es wurden pro Gramm Zellmaterial 3ml Lysepuffer (mit Lysozym) zugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung vollständig aufgeschlossen (250W, 7x 30s,

jeweils 30s Pause) und für 30min bei 4°C und 20000xg abzentrifugiert. Zur Bindung an die Ni-NTA-Matrix, wurden 0,2ml Ni-NTA-Agarose/8ml Lysat dreimal mit jeweils 1ml Lysepuffer äquilibriert (2min, 700xg, 4°C) und anschließend für mindestens 1h bei 4°C unter Durchmischung mit dem Überstand der Zellyse inkubiert. Die abzentrifugierten Agarosekügelchen (20min, 700xg, 4°C) wurden fünfmal mit 2ml Waschpuffer gewaschen und zur Elution des 6xHis-tag-Proteins mit 0,5ml Elutionspuffer/ml Ni-NTA-Matrix für 10min unter starkem Schütteln bei RT inkubiert. Es wurden insgesamt 2ml Eluat/ml Ni-NTA-Matrix gewonnen und für 4h bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert, wobei der Schlauch zuvor für 30min ausgekocht wurde. Das dialysierte Eluat wurde je nach Verwendungszweck entweder direkt aliquotiert und bei -20°C gelagert oder vor dem Einfrieren zunächst mit Glycerol im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Material:

Dialyseschlauch (Spectrum Laboratories, USA); Ausschlussgrenze 6-8kD

Lysepuffer

50mmol/l NaH₂PO₄

300mmol/l NaCl

10mmol/l Imidazol

pH 8,0

1mg/ml Lysozym direkt vor Gebrauch

Waschpuffer

50mmol/l NaH₂PO₄

300mmol/l NaCl

25mmol/l Imidazol

pH 8,0

Elutionspuffer

50mmol/l NaH₂PO₄

300mmol/l NaCl

250mmol/l Imidazol

pH 8,0

Dialysepuffer

20mmol/l Tris-Cl

1mol/l NaCl
pH 7,4

Puffer zum Auskochen des Dialyseschlauches

10mmol/l EDTA
100mmol/l NaHCO₃

2.15.7.2.2 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden für 30min auf Eis aufgetaut, und es wurden pro Gramm Zellmaterial 3ml harnstoffhaltiger Lysepuffer zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Inkubation für 1h bei RT unter Durchmischung, gefolgt von einer Zentrifugation für 30min bei 4°C und 20000xg. Zur Bindung an die Ni-NTA-Matrix, wurden 0,4ml Ni-NTA-Agarose/2ml Lysat dreimal mit jeweils 2ml Lysepuffer äquilibriert (2min, 700xg, 4°C) und anschließend für mindestens 1h bei RT unter Durchmischung mit dem Überstand der Zellyse inkubiert. Die abzentrifugierten Agarosekügelchen (20min, 700xg, 4°C) wurden fünfmal mit 2ml Waschpuffer gewaschen und zur Elution des 6xHistag-Proteins zunächst dreimal mit jeweils 0,5ml Elutionspuffer 1/ml Ni-NTA-Matrix für 10min unter starkem Schütteln bei RT inkubiert. Ebenso wurden drei Eluate von 0,5ml mit dem Elutionspuffer 2 gewonnen. Es wurden somit insgesamt 3ml Eluat/ml Ni-NTA-Matrix erhalten und für 4h bei RT gegen Dialysepuffer dialysiert, wobei der Schlauch zuvor für 30min ausgekocht wurde. Das dialysierte Eluat wurde je nach Verwendungszweck entweder direkt aliquotiert und bei -20°C gelagert oder vor dem Einfrieren zunächst mit Glycerol im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Material:

Dialyseschlauch (Spectrum Laboratories, USA); Ausschlussgrenze 6-8kD

Der pH-Wert sämtlicher harnstoffhaltiger Puffer wurde vor Gebrauch kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert.

Lysepuffer

8mmol/l Harnstoff
100mmol/l NaH₂PO₄
10mmol/l Tris-Cl
pH 8,0

Waschpuffer

8mmol/l Harnstoff
100mmol/l NaH₂PO₄
10mmol/l Tris-Cl
pH 6,3

Elutionspuffer 1

8mmol/l Harnstoff

100mmol/l NaH₂PO₄

10mmol/l Tris-Cl

pH 6,3

Elutionspuffer 2

8mmol/l Harnstoff

100mmol/l NaH₂PO₄

10mmol/l Tris-Cl

pH 4,5

Dialysepuffer

wie unter nativen Bedingungen beschrieben

Puffer zum Auskochen des Dialyseschlauches

wie unter nativen Bedingungen beschrieben

2.15.8 Aufreinigung von TAPtag-Fusionsproteinen

2.15.8.1 Hintergrund

In der Regel sind die exprimierten Proteine einer Zelle in Multi-Proteinkomplexen angeordnet. Um diese Komplexe funktionell zu charakterisieren, ist die Identifikation der einzelnen Komponenten essentiell. Einen biochemischen Ansatz bietet hierbei die Methode der *tandem affinity purification* (TAP) (Rigaut et al., 1999b). Dabei wird die cDNA für ein bestimmtes Zielprotein an den sogenannten TAPtag fusioniert. Dieser besteht aus zwei Immunglobulinbindenden Domänen des Proteins A von *Staphylococcus aureus*, einer Spaltstelle für die TEV-Protease (*tobacco etch virus*) und dem Calmodulin-bindenden Peptid abgeleitet von der Myosinleichte-Kette Kinase. Das Fusionsprotein kann deshalb in drei Schritten aufgereinigt werden, wobei im ersten Schritt eine Affinitätschromatographie über eine IgG-Matrix erfolgt, die sehr stark an den Protein A-Bestandteil des TAPtags bindet. Im nächsten Schritt wird die Spaltung mit der TEV-Protease durchgeführt, gefolgt von einer zweiten Affinitätschromatographie über das Calmodulin-bindende Peptid an einer Calmodulin-Matrix. Proteine, die in der Zelle an die Zielstruktur binden, sollten dabei mitaufgereinigt werden, so dass die Methode die Darstellung von Proteinkomplexen zulässt. Nach elektrophoretischer Auftrennung können die einzelnen Proteinbanden dann durch Sequenzierung identifiziert werden. Zudem können die Proteine im letzten Schritt mit EGTA unter sehr milden Bedingungen von der Calmodulin-Matrix eluiert werden, was den Erhalt ihrer enzymatischen Aktivität verbessert. Die folgende Abbildung fasst die einzelnen Schritte einer TAP-Aufreinigung zusammen.

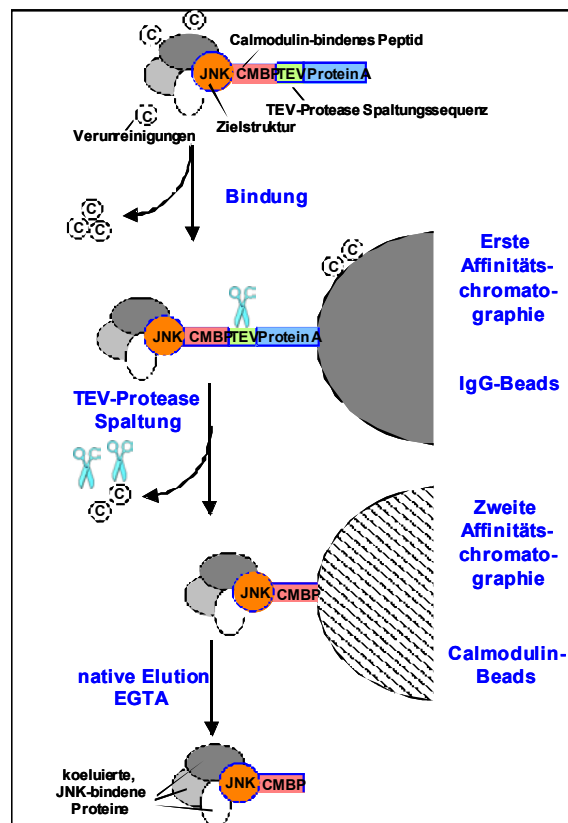


Abbildung 5: Aufreinigung von TAPtag-Fusionsproteinen

2.15.8.2 Aufreinigung

Diese Methode wurde ursprünglich für Hefen entwickelt, wobei der TAPtag dort durch homologe Rekombination an das endogene Zielprotein fusioniert wird, so dass das Fusionsprotein unter dem endogenen Genpromotor exprimiert wird. Für die erfolgreiche Verwendung dieser Technik in Säugerzellen gibt es noch verhältnismäßig wenige Arbeiten, obwohl gezeigt wurde, dass hiermit aus Hefen 200 Multiproteinkomplexe aufgereinigt werden konnte (Rigaut et al., 1999a; Gavin et al., 2002). Da es aber auch für Säugerzellen sehr wahrscheinlich ist, dass die stöchiometrischen Verhältnisse in einem Proteinkomplex wichtig sind, wurde das hier verwendete Fusionsprotein JNK2-TAPtag unter einen induzierbaren Promotor kloniert, der dessen variable Expression zulässt.

Die Expression des Proteins JNK2-TAPtag erfolgte nach Transfektion des Plasmides pIND-JNK2TAPtag in der Zelllinie HEK293 IL-1R/pVgRXR für 48h nach Ponasteroninduktion (4.3). Geerntete Zellen wurden in der Regel bei -80°C aufbewahrt und bei Bedarf zur Aufreinigung eingesetzt.

Entsprechend des Aufbaus des TAPtags wurde die Aufreinigung des JNK2-TAPtag-Fusionsproteins in drei Schritten durchgeführt, wobei sämtliche Arbeitsschritte an einem Tag erfolgten:

- Herstellung eines Lysates und Extraktion mit IgG-Agarose

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und je nach Zellmenge in einem bestimmten Volumen 5mmol/l Tris pH 8,0 resuspendiert (für vier bis fünf 75cm² Flaschen 200-300µl). Es erfolgte das Quellen der Zellen in diesem hypoosmolaren Puffer für 15min auf Eis und die Zugabe des entsprechenden Volumens 4x TAP-Lyse- und IgG-Binde-Puffer (pro ml 4x Puffer folgende Zusätze: 4µl DTT (1mol/l), 20µl PMSF (200mmol/l), 4µl Pepstatin (1mmol/l), 2µl Leupeptin (5mg/ml)). Nachdem die Zellen für weitere 20min auf Eis lysiert wurden, wurde das krude Lysat zum vollständigen Zellaufbruch viermal durch eine 20-Gauge und viermal durch eine 26-Gauge Nadel gepresst und schließlich für 20min bei 13000rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand (Ü0) wurde bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

Zur Bindung des TAP-Fusionsproteins über die Protein-A-Domäne an IgG-Agarose wurde die Matrix zunächst mit 1ml 1x TAP-Lyse- und IgG-Binde-Puffer äquilibriert (2min, 5000rpm, 4°C, Überstand abnehmen, zweimal wiederholen) und für 2h bei 4°C mit dem Lysat unter Durchmischung inkubiert. Für eine zehn 75cm²-Flaschen entsprechende Zellmenge wurden 50µl IgG-Agarose eingesetzt.

- Abspaltung des TAP-Fusionsproteins von der IgG-Agarose mit TEV-Protease

Die IgG-Kügelchen wurden abzentrifugiert (2min, 5000rpm, 4°C), zweimal mit 1ml IPP150-Puffer und zweimal mit TEV-Protease-Puffer gewaschen und in TEV-Spaltungs-Puffer resuspendiert (250µl/50µl IgG-Agarose). Diese Fraktion wurde als B1 bezeichnet. Zur Spaltung erfolgte die Zugabe der TEV-Protease (10U/µl) (2µl/50µl IgG-Agarose) und eine Inkubation von 1h bei RT unter ständiger Durchmischung.

- Bindung des TAPtag-Fusionsproteins an die Calmodulin-Matrix und Elution

Die IgG-Kügelchen wurden abzentrifugiert (2min, 5000rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen (Ü2). Dieser wurde mit dem dreifachen Volumen an IPP150-Calmodulin-Binde-Puffer verdünnt, und es wurden 3µl 1mol/l CaCl₂-Lösung/ml Ü2 zugegeben. Die Calmodulin-Agarose wurde schließlich zweimal mit 1ml IPP150-Calmodulin-Binde-Puffer äquilibriert (jeweils 2min, 5000rpm, 4°C) und für 2h bei 4°C mit dem verdünnten Ü2 unter ständiger Durchmischung inkubiert.

Zur Elution wurden die Calmodulin-Kügelchen zunächst dreimal mit IPP150-Calmodulin-Binde-Puffer gewaschen und zweimal für jeweils 30min mit Calmodulin-Elutions-Puffer (insgesamt 100µl/50µl Calmodulin-Matrix) geschüttelt. Die vereinigten Eluate wurden je nach Versuch entweder direkt auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt oder für weitere enzymatische Tests eingesetzt.

Material:

TAP-Binde -und IgG-Lyse-Puffer (4x)

40mmol/l	Tris-Cl pH 8,0
600mmol/l	NaCl
0,4% (v/v)	NP-40
80mmol/l	β -Glycerophosphat
0,4mmol/l	Natriumvanadat
0,4mmol/l	EDTA
40mmol/l	Natriumfluorid

IPP150-Puffer

10mmol/l	Tris-Cl pH 8,0
150mmol/l	NaCl
0,1% (v/v)	NP-40

TEV-Spaltungs-Puffer

10mmol/l	Tris-Cl pH 8,0
150mmol/l	NaCl
0,1% (v/v)	NP-40
0,5mmol/l	EDTA

1mmol/l DTT

IPP150-Calmodulin-Binde-Puffer

10mmol/l	β -Mercaptoethanol
10mmol/l	Tris-Cl pH 8,0
150mmol/l	NaCl
1mmol/l	Magnesiumacetat
1mmol/l	Imidazol
2mmol/l	CaCl ₂
0,1% (v/v)	NP-40

Calmodulin-Elutions-Puffer

10mmol/l	β -Mercaptoethanol
10mmol/l	Tris-Cl pH 8,0
150mmol/l	NaCl
1mmol/l	Magnesiumacetat

1mmol/l	Imidazol
4mmol/l	EGTA
0,1% (v/v)	NP-40

2.15.9 ELISA für das Chemokin IL-8

Die Bestimmung der Konzentration des Chemokins IL-8 (CCL-8) erfolgte mittels eines *sandwich* ELISAs der Firma R&D System exakt nach Herstellerangaben (*IL-8 duo set kit*). Zur Messung wurden Verdünnungen der Zellkulturüberstände in Medium angesetzt, wobei üblicherweise Verdünnungen von 1:50 bis 1:100 verwendet wurden. Als Standard diente eine aus acht Werten bestehende Eichreihe von humanem IL-8 mit Konzentrationen von 15,63-1000pg/ml.

2.16 Zellbiologische Techniken

2.16.1 Behandlung von Zellen mit zellpermeablen Peptiden und Visualisierung der Internalisierung durch Fluoreszenzmikroskopie

Um eine gleichmäßige Verteilung bei der Behandlung von Zellen mit zellpermeablen Peptiden zu gewährleisten, wurde die Hälfte des auf den Zellen befindlichen Mediums abgenommen, mit Peptid versehen und zurück auf die Zellen gegeben. Je nach Versuchsziel wurden diese dann für verschiedenen Zeiträume im Brutschrank inkubiert.

Zur Visualisierung der Internalisierung wurden N-terminal Fluorescein-markierte Peptide eingesetzt. 10^5 Zellen wurden am Vortag in 12-Loch-Platten ausgesät und am Versuchstag wie oben beschrieben mit den Peptiden behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit warmem (RT) PBS gewaschen, für 15min mit 4% PFA (in PBS pH 7,4) bei RT fixiert und nochmals dreimal mit PBS gewaschen. Während der Fluoreszenzmikroskopie wurde ein kleiner Flüssigkeitsspiegel an PBS auf den Zellen belassen.

2.16.2 Chromatinfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342

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

2.16.3 Messung der Zellproliferationsrate mittels Einbau von ^3H -Thymidin

Zur Messung der Proliferationsrate wurden 10^4 Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät und je nach Bedingung zusätzlich mit den zellpermeablen Peptiden behandelt. Für die letzten 4h der Kultivierung wurde dem Medium ^3H -Thymidin (in PBS; 0,5 μCi /96-Loch) zugesetzt. Die Zellen

wurden im Anschluss durch Zugabe von NaOH (final 0,05mol/l) lysiert und durch einen 12-Kanal-Sauger auf Glasfibernatten aufgebracht. Überschüssige Radioaktivität wurde durch drei Waschschrirte mit Wasser entfernt, und die jeweils einem 96-Loch entsprechenden Kreise wurden ausgestanzt und in Szintillationsröhrchen überführt. Die Messung der Menge an inkorporierter Radioaktivität erfolgte nach Zugabe von 1ml Szintillationsflüssigkeit/Röhrchen an einem Flüssigszintillationsmeßgerät der Firma Perkin Elmer.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung zellpermeabler TAB1-Proteine zur Manipulation TAK1-TAB1-abhängiger Prozesse

3.1.1 Bakterielle Expression eines ANTP-TAB1C-Proteins

Das erste Teilprojekt dieser Arbeit sollte der Evaluierung des Potentials der Methode der Proteintransduktion mittels Internalisierungssequenzen zur Manipulation von MAP-Kinase-Signalkaskaden dienen. Zu diesem Zweck wurde die gut charakterisierte Interaktion zwischen der MAP-3-Kinase TAK1 und deren Adaptorprotein TAB1 als Zielstruktur ausgewählt, da TAK1 für seine Aktivierung auf TAB1 angewiesen ist. Der Aufbau eines zellpermeablen Peptides, welches die Interaktion von TAK1 und TAB1 stören sollte, wurde dabei aus der Struktur des humanen TAB1 abgeleitet.

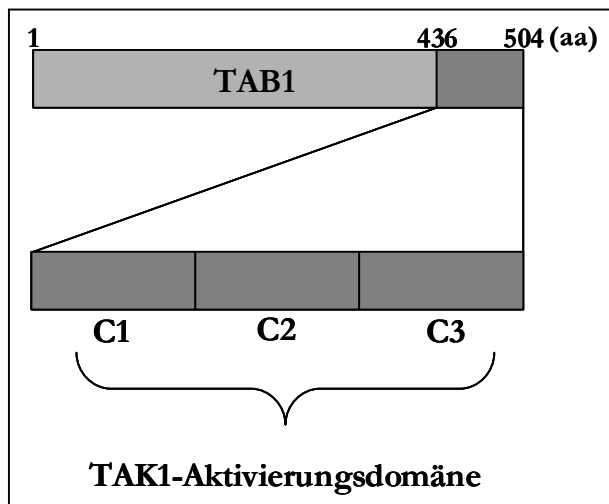


Abbildung 6: Schematische Struktur des humanen TAB1-Proteins

aa = Aminosäure

Anhand von Struktur-Funktionsanalysen wurde das humane TAB1-Protein in zwei Abschnitte aufgeteilt, den Bereich der N-terminalen Aminosäuren 1-436 und den die C-terminalen Aminosäuren 437-504 umfassenden Bereich. Die Funktion des N-terminalen Fragmentes (TAB1N) ist noch nicht aufgeklärt, es scheint jedoch für die Aktivierung der MAP3-Kinase TAK1 eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die letzten 68 Aminosäuren (TAB1C) hingegen sind absolut essentiell für die Interaktion mit und Aktivierung von TAK1. Eine weitere Unterteilung dieses Bereiches deckte auf, dass die äußersten Aminosäuren 480-504 (TAB1C3) hauptsächlich die Interaktion mit TAK1 vermitteln, während die Aminosäuren 437-482 (TAB1C1 und TAB1C2) wichtig für die TAK1-Aktivierung sind (Sakurai et al., 2000).

Um eine möglichst kleine Domäne für die Herstellung eines zellpermeablen TAB1-Peptides auszuwählen, wurde der Einfluss der Überexpression verschiedener TAB1-Konstrukte auf die

IL-1-induzierte Aktivierung eines NF- κ B-Reporterplasmides ausgetestet, bei dem die Expression von Luziferase durch einen Promotor mit einer dreifachen Konsensus-Bindestelle für den dimeren Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert wird.

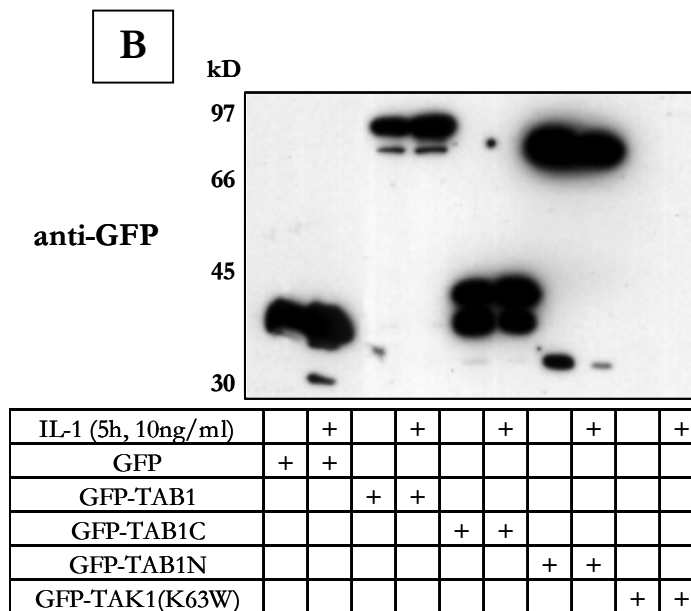
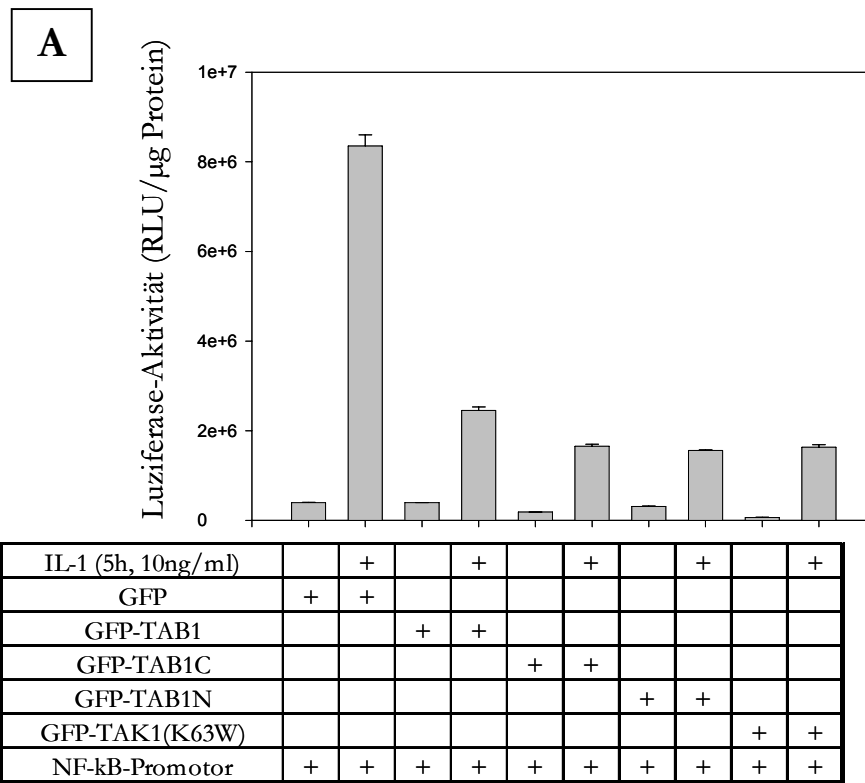


Abbildung 7: Die Überexpression von TAB1 und TAB1-Deletionsmutanten hemmt die IL-1-induzierte Aktivierung eines NF- κ B-Reporterplasmides

A: HEK293 IL-1R-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag transfiziert. Das Reportergenkonstrukt NF- κ B-3-Luc wurde durch Stimulation mit IL-1 aktiviert. Zusätzlich zu 0,25 μ g des Reportergenkonstruktes wurden 2,5 μ g der Expressionsplasmide für GFP (pEGFPc1), die GFP-TAB1-Proteine (pEGFP-TAB1; pEGFP-TAB1C; pEGFP-TAB1N) sowie für GFP-TAK1 (K63W) (pEGFP-TAK1 (K63W)) pro 6-

Loch kotransfiziert. Die Menge an Gesamt-DNA wurde für jedes Loch durch die Zugabe des Plasmides pGFPc1 auf 5µg eingestellt. Die Zellen wurden im Anschluss für weitere 48h kultiviert, lysiert, und die Aktivität der Luziferase wurde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2) (\pm S.E.M.)

B: Zur Kontrolle der Expression der GFP-markierten Proteine wurden die Lysate der transfizierten Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Detektion von GFP und der GFP-TAB1-Konstrukte erfolgte im Westernblot durch einen anti-GFP-Antikörper.

Wie durch den Anstieg der Luziferase-Aktivität gemessen (A), führt die Stimulation von HEK293 IL-1R-Zellen mit IL-1 zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Wird unter den gleichen Versuchsbedingungen GFP-TAB1 überexprimiert, so hat dieses eine Hemmung des Signalweges zur Folge, was darauf schließen lässt, dass das Vorliegen eines TAK1-TAB1-Komplexes mit festgelegten stöchiometrischen Verhältnissen für die Signalweiterleitung essentiell ist. Der gleiche Effekt lässt sich beobachten, wenn die TAB1-Deletionsmutanten GFP-TAB1N bzw. GFP-TAB1C kotransfiziert werden. Die erzielten Hemmeffekte lassen sich dabei mit dem einer katalytisch inaktiven Mutante von TAK1 - GFP-TAK1 (K63W) - vergleichen. Im Westernblot (B) konnte die Expression von GFP und der GFP-TAB1-Proteine nachgewiesen werden. GFP-TAK1 (K63W) ist auf der oben gezeigten Exposition nicht sichtbar, da sich diese Mutante häufig nur schlecht durch einen anti-GFP-Antikörper darstellen lässt.

Die Hemmung der Signaltransduktion durch GFP-TAB1C lässt sich durch die kompetitive Bindung von endogenem TAK1 erklären, welches zur Zerstörung des endogenen TAK1-TAB1-Komplexes führt. Diese Domäne von TAB1 wurde daher zur Planung der Synthese eines zellpermeablen TAB1-Peptides verwendet.

In der Folge wurde TAB1C daher in den bakteriellen Expressionsvektor pThm3Ha4 kloniert, bei dem es sich um einen modifizierten pET-3a-Vektor handelt, in dem die Expression über einen T7-Promotor reguliert wird. Das exprimierte Zielprotein enthält N-terminal ein zusammengesetztes tag, das aus sechs Histidinen, dem MYCtag sowie der dritten Helix des Antennapedia-Proteins (ANTP) aus *Drosophila*, welche als Internalisierungssequenz dient, besteht. Als Kontrolle erfolgte zusätzlich die Klonierung des Vektors pThm3Ha4-GFP.

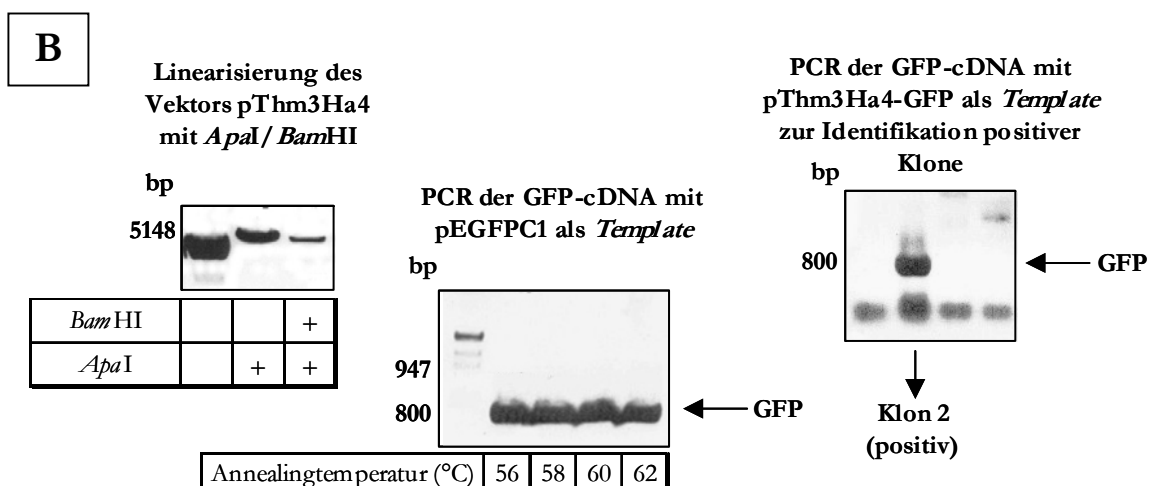
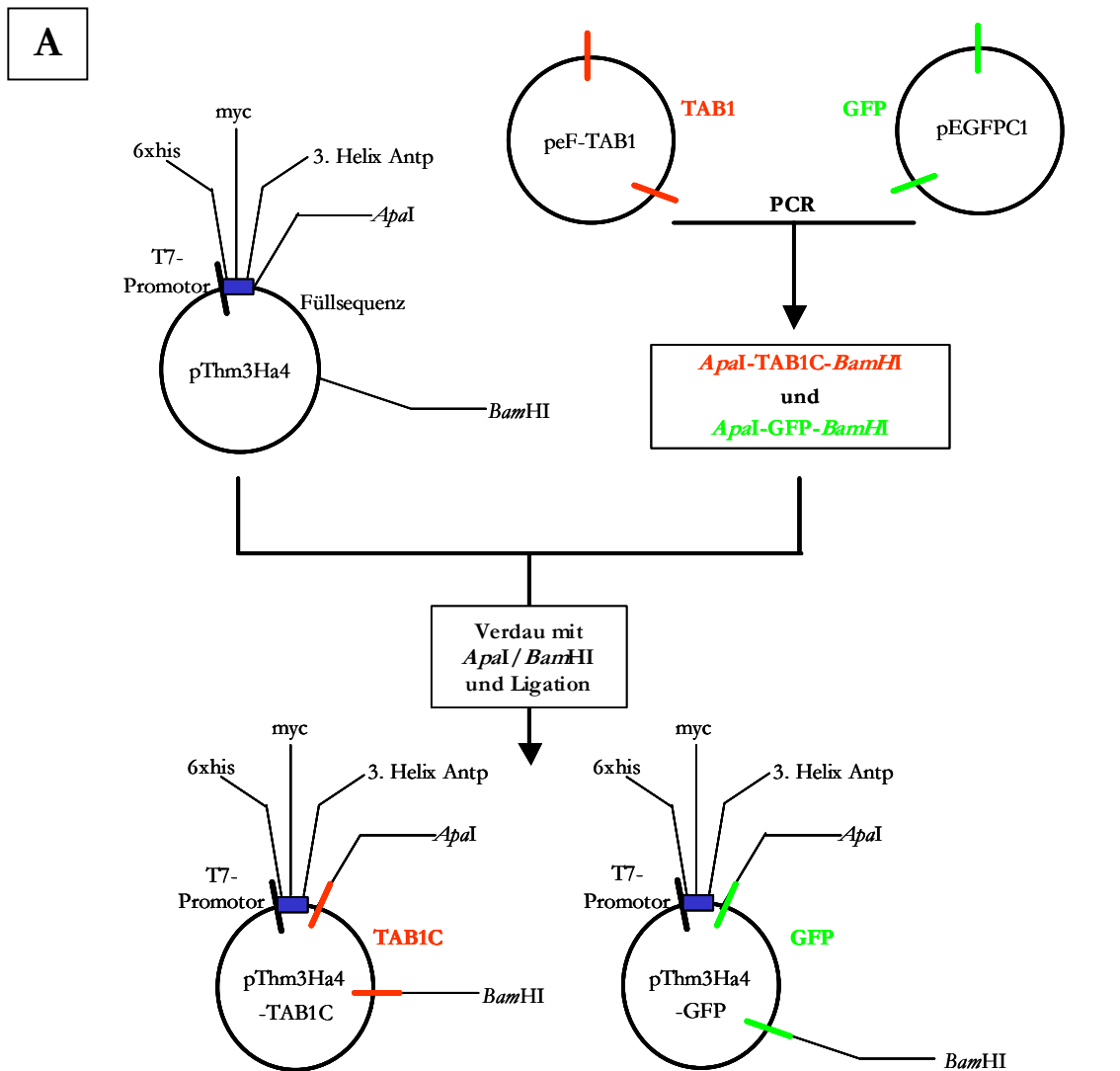


Abbildung 8: Strategie zur Klonierung der Vektoren pThm3Ha4-TAB1C und pThm3Ha4-GFP

A: Gezeigt ist das Vorgehen bei der Herstellung der Vektoren pThm3Ha4-TAB1C und pThm3Ha4-GFP. Zur Beschreibung siehe Text. Zur Analyse der Klonierung wurden bakterielle Einzelklone auf antibiotikahaltigen

Agarplatten über Nacht bei 37°C selektioniert und zum Beimpfen von 5ml Flüssigkulturen verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss durch PCR auf das Vorhandensein von TAB1C und GFP geprüft.

B: Exemplarisch sind die Ergebnisse für GFP gezeigt.

Zur Klonierung der Vektoren pThm3Ha4-TAB1C und pThm3Ha4-GFP wurden zunächst PCR-Fragmente mit den Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *BamHI* generiert. Der Vektor pThm3Ha4 sowie die PCR-Produkte wurden im Anschluss mit den entsprechenden Enzymen verdaut, ligiert und positive, bakterielle Einzelklone wurden durch PCR der *Inserts* aus der isolierten Plasmid-DNA identifiziert. Dieses Vorgehen ist beispielhaft für GFP dargestellt (B).

Nach der erfolgreichen Klonierung wurde zur Expression der Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS mit beiden Plasmiden transformiert. Da in der Arbeitsgruppe nur wenig Expertise mit der Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine über den HIS-tag vorlag, wurde HIS-MYC-ANTP-TAB1C zunächst im analytischen Maßstab exprimiert.

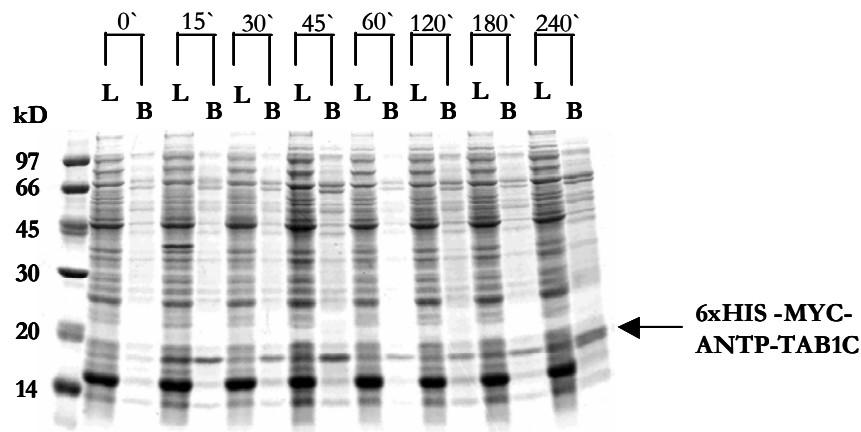


Abbildung 9: Etablierung der Bedingungen zur Expression und Aufreinigung von HIS-MYC-ANTP-TAB1C im analytischen Maßstab (native Bedingungen)

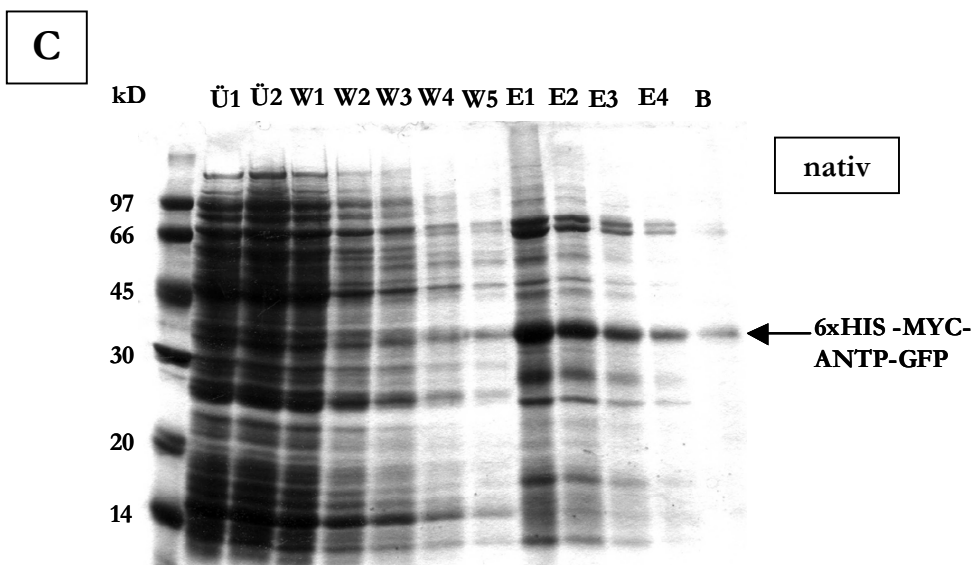
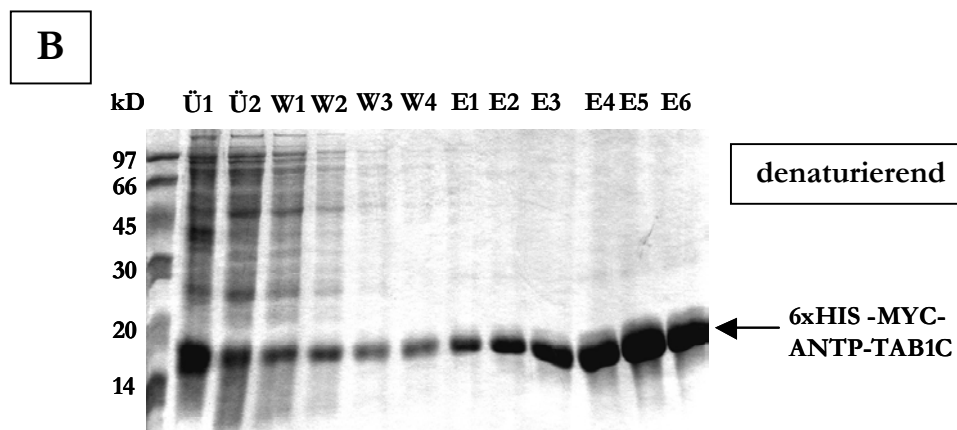
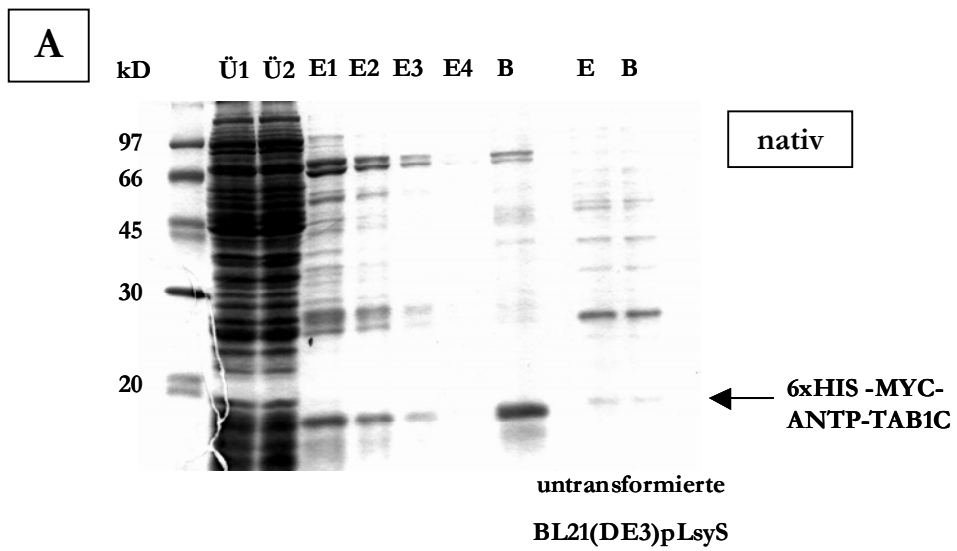
Eine 200ml-Kultur von mit dem Plasmid pThm3Ha4-TAB1C transformierten BL21(DE3)pLysS wurde bis zu einer OD von 0,7 bei 37°C inkubiert, und die Expression des Proteins HIS-MYC-ANTP-TAB1C wurde durch Zugabe von 0,8mmol/l IPTG induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme eines 5ml-Aliquots der Kultur. In Anschluss wurde die Aufreinigung von HIS-MYC-ANTP-TAB1C im analytischen Maßstab mit 20µl Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Zum Vergleich wurde für jeden Zeitpunkt das crude Ausgangslysat gemeinsam mit den extrahierten Proben aufgetragen.

L = Lysat, krudes Bakterienlysat

B = Beads, Ni-NTA-Agarose mit gebundenem Zielprotein

Unter den gewählten Bedingungen für Expression und Aufreinigung kann das rekombinante Protein extrahiert werden und ist bereits nach 15min nachweisbar, so dass die beiden Proteine HIS-MYC-ANTP-TAB1C und HIS-MYC-ANTP-GFP im präparativen Maßstab aus jeweils 3l Bakterienkultur aufgearbeitet wurden. Zusätzlich zur nativen Aufreinigungsmethode wurden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen extrahiert, da es Hinweise aus der Literatur gab,

dass denaturierte Proteine besser zur Zelltransduktion befähigt sind als native (Nagahara et al., 1998).



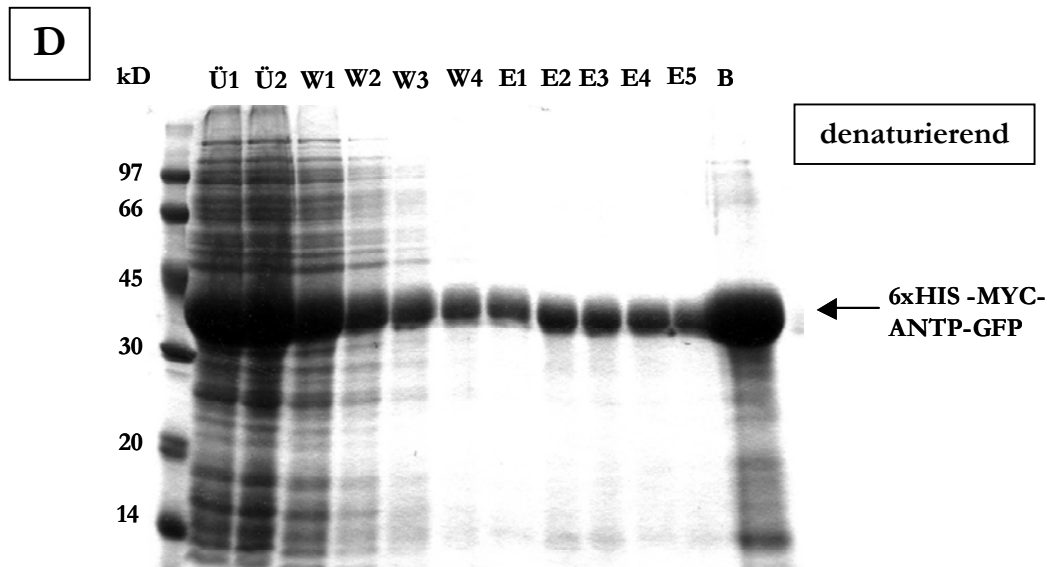


Abbildung 10: Aufreinigung von HIS-MYC-ANTP-TAB1C und HIS-MYC-ANTP-GFP im präparativen Maßstab unter nativen und denaturierenden Bedingungen

Jeweils 6l Bakterienkultur von BL21(DE3)pLysS, die mit dem Plasmid HIS-MYC-ANTP-TAB1C oder HIS-MYC-ANTP-GFP transfiziert wurden, wurden bei 37°C bis zu einer OD von 0,7 inkubiert und die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte für 4h nach Induktion durch 0,8mmol/l IPTG. In Anschluss wurde für jedes Protein jeweils die Hälfte des Kulturvolumens unter nativen (A und C), die andere Hälfte unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet (B und D).

Ü1 = Überstand 1, krudes Ausgangslysat

Ü2 = Überstand 2, Lysat nach Inkubation mit den Ni-NTA-Kügelchen

W1-5 = Waschschritte 1-4

E1-6 = Eluat 1-6

B = Beads, aufgekochte Ni-NTA-Kügelchen nach der Elution

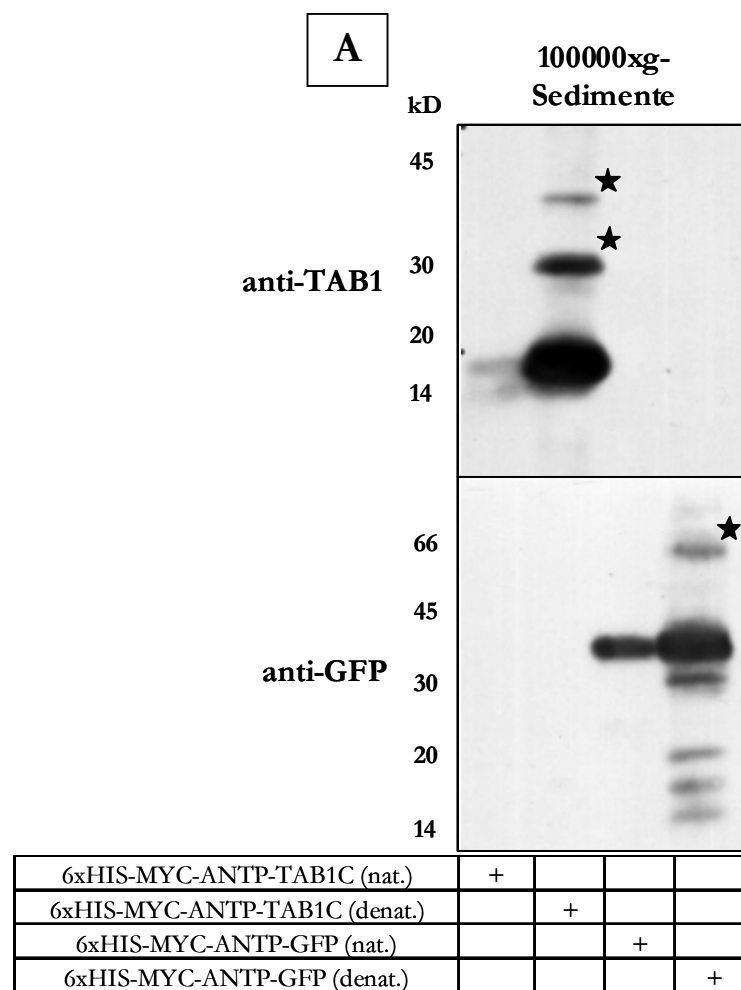
Sowohl das Protein HIS-MYC-ANTP-TAB1C als auch HIS-MYC-ANTP-GFP konnten unter nativen und denaturierenden Bedingungen gewonnen werden.

Unter nativen Bedingungen wurden für His-MYC-ANTP-TAB1C vier Eluate gewonnen, von denen die ersten drei vereinigt und wie beschrieben dialysiert wurden. Bei dieser Art der Aufarbeitung fällt jedoch auf, dass ein großer Teil des rekombinanten Proteins nicht von den Ni-NTA-Kügelchen eluiert werden konnte und an diesen haften blieb. Unter denaturierenden Bedingungen mit dem Einsatz harnstoffhaltiger Puffer konnte wesentlich mehr des rekombinanten HIS-MYC-ANTP-TAB1C extrahiert werden, wobei das Protein mit dem zweiten Elutionspuffer (E4-6), der einen niedrigeren pH-Wert hat, besser von der Ni-NTA-Agarose eluiert wurde als mit dem ersten Puffer (E1-3). Die bessere Ausbeute bei der denaturierenden Präparation hat im Wesentlichen zwei Ursachen. Zum einen werden schwer lösliche Proteine besser in Lösung gebracht, zum anderen ist der H1Stag in denaturierten Proteinen besser exponiert, was zu einer stärkeren Bindung an die Ni-NTA-Matrix führt. Es ist zudem auffällig, dass die Präparation von HIS-MYC-ANTP-TAB1C unter denaturierenden Bedingungen wesentlich weniger kontaminierende Proteine enthielt, da diese im denaturierten Zustand in nur

sehr geringem Maße unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose binden können. Zur Dialyse wurden daher sämtlich Eluate kombiniert und wie beschrieben dialysiert.

Für die Aufreinigung von HIS-MYC-ANTP-GFP lassen sich prinzipiell ähnliche Beobachtungen machen, jedoch ließ sich dieses Protein unter nativen Bedingungen besser eluieren als HIS-MYC-ANTP-TAB1C. Allerdings war auch diese Präparation stark durch andere Banden kontaminiert. Unter denaturierenden Bedingungen hingegen ließ sich auch HIS-MYC-ANTP-GFP sehr rein darstellen und in großen Mengen gewinnen, auch wenn hier die Elution von der Ni-NTA-Matrix nur unvollständig war. Für beide Bedingungen wurden jeweils alle Eluate kombiniert und dialysiert.

Um zu überprüfen, ob die rekombinant hergestellten Proteine über die ANTP-Sequenz in die Lage versetzt werden, in Zellen zu transduzieren, wurden HeLa-Zellen in Gegenwart der Proteine kultiviert, lysiert und anschließend zur Herstellung von 100000xg-Überständen und -Sedimenten genutzt.



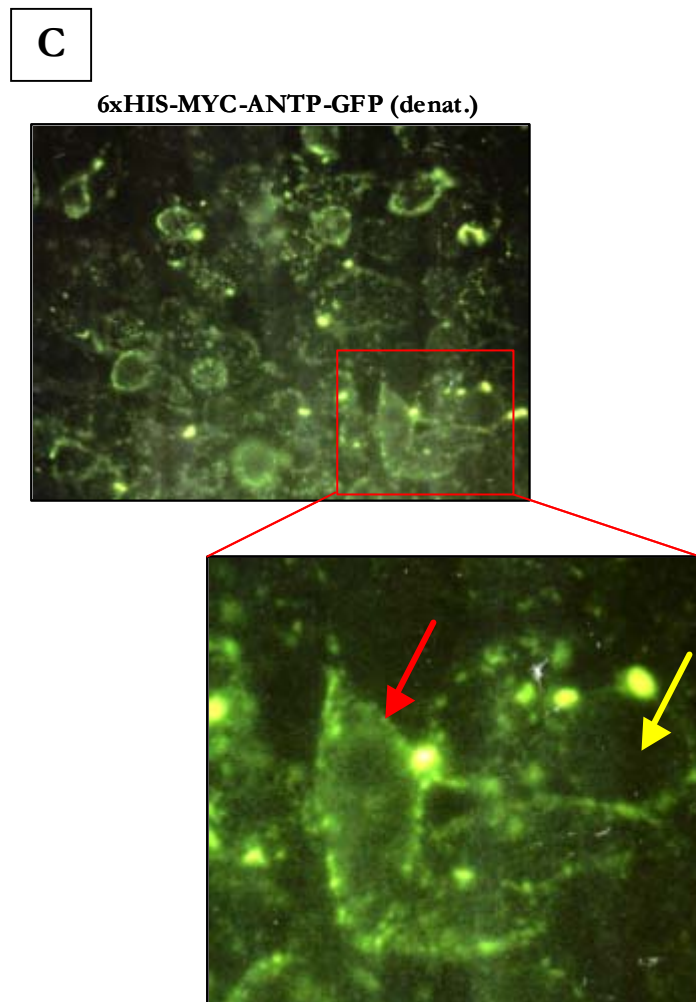
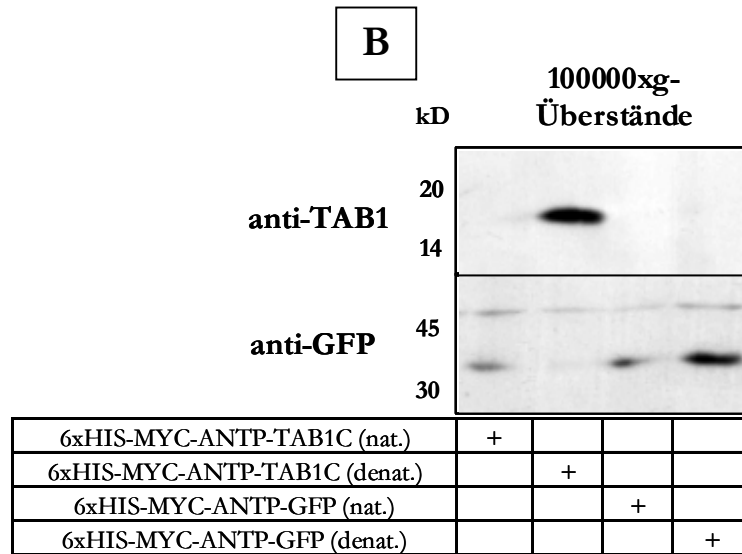


Abbildung 11: Nachweis der fehlenden Internalisierung der Proteine HIS-MYC-ANTP-TAB1C und HIS-MYC-ANTP-GFP

A/B: 2×10^5 HeLa-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und ab dem Folgetag für 24h mit jeweils ca. 200 μ g der jeweiligen Proteinpräparation (zwischen 10-20 μ g/ μ l) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wie im Material- und Methodenteil beschrieben lysiert, wobei unter schonenden Bedingungen mit wenig Detergenz (0,05%) und unter Anwendung von Scherkräften gearbeitet wurde. Das crude Lysat wurde bei 100000xg zentrifugiert, der Überstand

vorsichtig abgenommen und in der entsprechenden Menge 4x Laemmli-Auftragspuffer aufgeköcht. Das Sediment der Zentrifugation wurde direkt in 1x Laemmli-Auftragspuffer aufgeköcht, und die Detektion der Proteine HIS-MYC-ANTP-TAB1C und HIS-MYC-ANTP-GFP erfolgte im Westernblot durch anti-TAB1- bzw. anti-GFP-Antikörper. Die mit einem Stern markierten Banden stellen SDS-unlösliche Multimere dar.

C: Für die Detektion von HIS-MYC-ANTP-GFP (denat.) durch Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen analog behandelt.

Roter Pfeil: Zellmembran mit gebundenem HIS-MYC-ANTP-GFP (denat.)

Gelber Pfeil: Lumen einer Zelle

Aus der Westernblot-Analyse der 100000xg-Überstände (B) und der entsprechenden Sedimente (A) lässt sich schließen, dass weder HIS-MYC-ANTP-TAB1C noch HIS-MYC-ANTP-GFP in nennenswertem Maße von HeLa-Zellen aufgenommen werden. Durch die Inkubation der PVDF-Membran mit einem anti-TAB1-Antikörper lässt sich für HIS-MYC-ANTP-TAB1C (denat.) eine schwache Internalisierung detektieren, wobei jedoch beachtet werden sollte, dass das Signal einer über-Nacht-Exposition entspricht, während das Signal aus dem entsprechenden Sediment einer Exposition des ECL-Films von 10s entspricht. Der Anteil an internalisiertem HIS-MYC-ANTP-TAB1C (denat.) ist also sehr klein oder rührt aus einer leichten Kontamination des Überstandes durch das Sediment her.

HIS-MYC-ANTP-TAB1C (nat.) wird nicht internalisiert und, obwohl im Vergleich zu HIS-MYC-ANTP-TAB1C (denat.) vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden, auch nicht an die Zellmembran gebunden.

Ähnliches gilt für HIS-MYC-ANTP-GFP. Sowohl im denaturierten als auch im nativen Zustand ist dieses Protein kaum im Überstand der 100000xg-Zentrifugation zu detektieren. Hingegen sind sowohl die native als auch die denaturierte Form eindeutig im Sediment vorhanden, was darauf schließen lässt, dass sie an die Membran der Zelle binden.

Auffällig ist bei den jeweils denaturierend aufgearbeiteten Proteinen das Auftauchen SDS-unlöslicher Formen von HIS-MYC-ANTP-TAB1C und HIS-MYC-ANTP-GFP (markiert mit einem Stern), die bereits in der Literatur beschrieben wurden (Derossi et al., 1994; Derossi et al., 1996) und auf die Bildung von Micellen in der Gegenwart von SDS zurückgeführt werden.

Durch Fluoreszenzmikroskopie (C) konnten die Ergebnisse der Westernblot-Analyse bestätigt werden. Dabei zeigt sich, dass HIS-MYC-ANTP-GFP (denat.) fast ausschließlich in der Zellmembran von HeLa-Zellen lokalisiert ist und diese nicht passieren kann. Im Gegensatz dazu weist das Zytosol dieser Zellen eine nur schwache Grünfluoreszenz auf. In einer stärkeren Vergrößerung ist diese Verteilung eindeutig sichtbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder die Internalisierung von HIS-MYC-ANTP-TAB1C noch HIS-MYC-ANTP-GFP nachgewiesen werden konnte, unabhängig davon, ob diese unter nativen oder denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet wurden. Streng genommen konnte höchstens für das Protein MYC-ANTP-TAB1C (denat.) eine minimale Internalisierung detektiert werden. Vielmehr scheinen diese Proteine jedoch in der Zellmembran „hängenzubleiben“, was auf die starke Hydrophobizität der ANTP-Sequenz zurückgeführt werden kann.

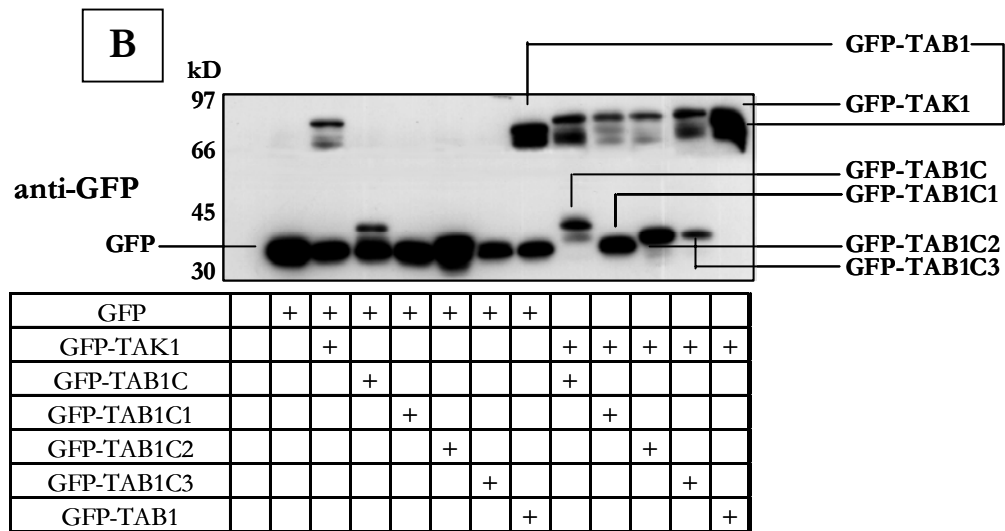


Abbildung 12: Aktivierung eines IL-8-Reporterplasmides durch verschiedene TAB1-Deletionsmutanten

A: HEK293 IL-1R-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag transfiziert. Das Reportergenkonstrukt pUHD13.3-IL-8-Promotor-Luc-wt wurde durch die Koexpression der Proteine GFP-TAK1 und GFP-TAB1 bzw. verschiedener TAB1-Deletionsmutanten aktiviert. Dabei wurden jeweils 0,25µg des Reportergenkonstruktes und 2,5µg der Expressionsplasmide für GFP-TAK1 (pEGFP-TAK1 wt) und die GFP-TAB1-Konstrukte (pEGFP-TAB1; pEGFP-TAB1C; pEGFP-TAB1C1; pEGFP-TAB1C2; pEGFP-TAB1C3) pro 6-Loch wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an Gesamt-DNA wurde für jedes Loch durch die Zugabe des Plasmides pEGFPc1 auf 7µg eingestellt. 24h nach Transfektion wurden die Zellen wie beschrieben lysiert und die Aktivität der Luziferase bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2) (\pm S.E.M.)

B: Zur Kontrolle der Expression der GFP-markierten Proteine wurden die Lysate der transfizierten Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Detektion erfolgte im Westernblot durch einen anti-GFP-Antikörper.

Der IL-8-Promotor lässt sich unter den gewählten Versuchsbedingungen nur durch Kotransfektion der MAP-3-Kinase TAK1 und des Adaptorproteins TAB1 aktivieren, die Überexpression nur eines Partners vermag dieses nicht (A). Es ist daher anzunehmen, dass der IL-8-Promotor für seine Aktivierung auf ein stöchiometrisches Verhältnis von ektopisch exprimierten TAK1- und TAB1-Proteinen angewiesen ist. Die N-terminale Deletionsmutante, die nur aus den Aminosäuren 437-504 besteht, kann den IL-8-Promotor dabei in ähnlicher Weise aktivieren wie das ganze TAB1-Protein. Eine weitere Aufteilung des C-Terminus offenbart, dass lediglich die äußersten Aminosäuren (TAB1C3, Aminosäuren 480-504) für diesen Effekt verantwortlich sind. Der Nachweis der Expression der einzelnen GFP-markierten Proteine erfolgte zur Kontrolle im Westernblot (B).

Da, wie bereits erwähnt, durch eine andere Arbeitsgruppe zuvor gezeigt werden konnte, dass dieser Teil von TAB1 hauptsächlich für die TAK1-Bindung verantwortlich ist (Sakurai et al., 2000), wurde die Synthese eines Peptides, welches die äußersten 24 Aminosäuren von TAB1 enthält, geplant.

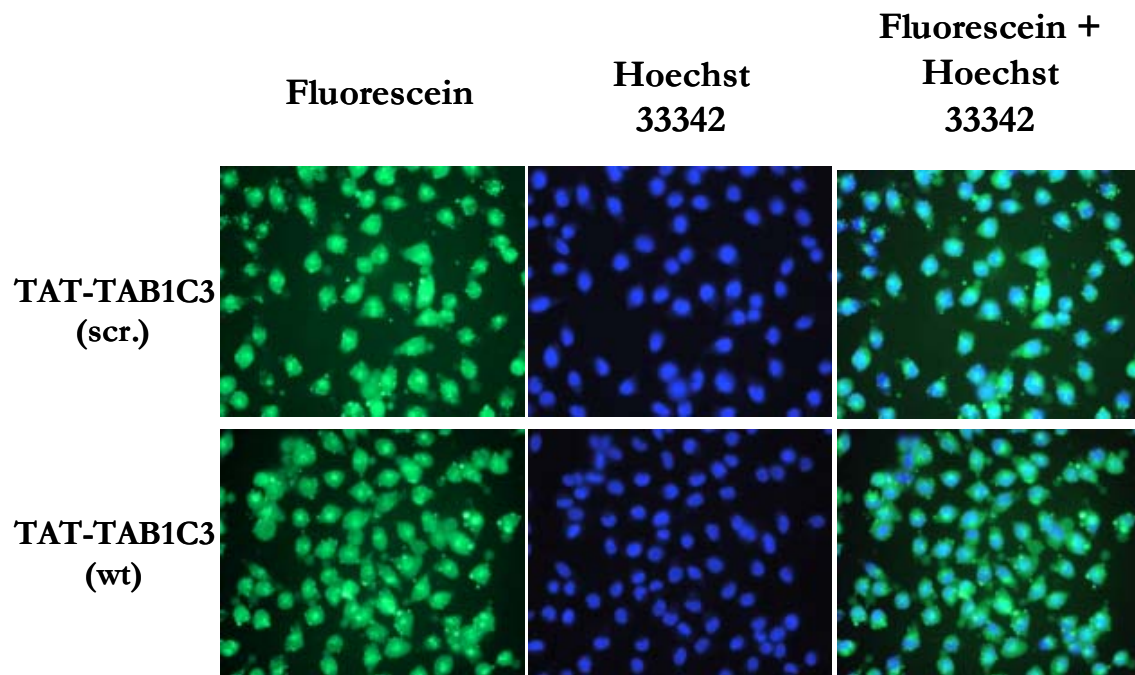


Abbildung 14: Internalisierung der Peptide TAT-TAB1C3 (wt) und TAT-TAB1C3 (scr.)

HeLa-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und für 30min mit den Peptiden TAT-TAB1C3 (wt) und TAT-TAB1C3 (scr.) in Medium inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Im Anschluss wurde die Internalisierung der Peptide wie beschrieben fluoreszenzmikroskopisch detektiert.

Im Gegensatz zu den in Bakterien exprimierten ANTP-Fusionsproteinen wurden die synthetisch hergestellten Peptide TAT-TAB1C3 (wt) und TAT-TAB1C3 (scr.) von 100% der Zellen aufgenommen. Die Peptide scheinen sich dabei gleichmäßig zwischen Zytosol und Zellkern zu verteilen, was für Cargos, die von der TAT-Sequenz in Zellen geschleust werden, charakteristisch ist.

In der Folge wurde daher untersucht, inwiefern das TAT-TAB1C3 (wt) Peptid das Potential besitzt, die von TAK1 bzw. dem TAK1-TAB1-Komplex vermittelte Signaltransduktion zu beeinflussen.

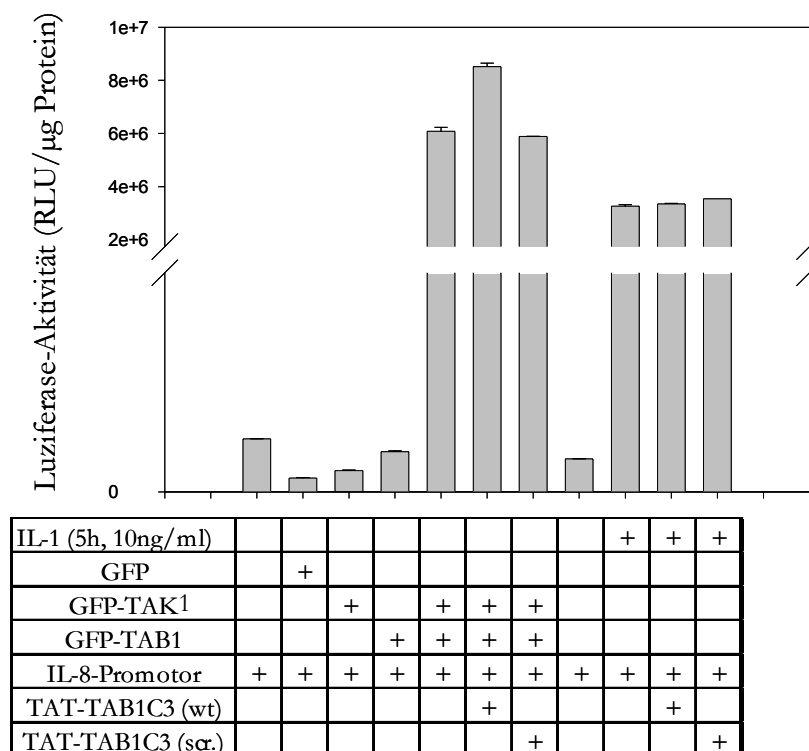


Abbildung 15: Fehlende Hemmung der Aktivierung eines IL-8-Reporterplasmids durch die Peptide TAT-TAB1C3 (wt) und TAT-TAB1C3 (scr.)

HEK293 IL-1R-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag transfiziert. Das Reportergenkonstrukt pUHD13.3-IL-8-Promotor-Luc-wt wurde zum einen durch die Koexpression von GFP-TAK1 und GFP-TAB1, zum anderen durch Stimulation mit IL-1 wie angegeben aktiviert. Dabei wurden jeweils 0,25µg des Reportergenkonstruktes und 2,5µg der Expressionsplasmide für GFP-TAK1 (pEGFP-TAK1 wt) und GFP-TAB1 (pEGFP-TAB1) pro 6-Loch kotransfiziert. Die Menge an Gesamt-DNA wurde für jedes Loch durch die Zugabe des Plasmides pcGFPc1 auf 7µg eingestellt. Die Zellen wurden im Anschluss für weitere 24h in Anwesenheit der Peptide bzw. ohne Peptide kultiviert, lysiert, und die Aktivität der Luziferase wurde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen ($n = 2$) (\pm S.E.M.)

Wie bereits in Abb.12 gezeigt, kann der IL-8-Promotor durch Überexpression von GFP-TAK1 und GFP-TAB1 aktiviert werden. Ebenso ist dies durch Stimulation mit IL-1 möglich, wobei die Signalkaskade dabei oberhalb des TAK1-TAB1-Komplexes aktiviert wird. In beiden Fällen gelang es jedoch nicht, die Signalweiterleitung durch das TAT-TAB1C3 (wt) Peptid zu manipulieren, da für Zellen, die nach der Transfektion in Anwesenheit des Peptides kultiviert wurden, keine signifikante Veränderung der Luziferase-Aktivität gemessen werden konnte.

Die Interpretation dieser Daten ist schwierig und nur begrenzt sinnvoll, da die Peptidpräparation aus den oben genannten Gründen nur mit Einschränkungen zu verwenden ist. Möglicherweise liegt die korrekte Spezies in dem eingesetzten Material in nur sehr geringer Konzentration vor, da die Präparation wie erwähnt zum größten Teil ein Produkt der falschen Größe enthält. Zudem ließ sich das Peptid nur partiell in PBS lösen, was die Konzentration an TAT-TAB1C3 (wt) potentiell weiter verringert. Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass ein Peptid mit der gewählten Struktur keinen Einfluss auf das hier gewählte Analysesystem hat.

Da diese Peptide erst gegen Ende der Doktorarbeit zur Verfügung standen, konnten keine weiteren Experimente mit einer neuen und besser charakterisierten Peptidpräparation durchgeführt werden, um diese Hypothesen zu überprüfen.

Stattdessen wurde ein anderer Ansatz mit zellpermeablen Peptiden verfolgt, bei dem die Signalweiterleitung durch eine MAP-Kinase-Signalkaskade auf der Ebene der Wechselwirkung einer Kinase mit einem Transkriptionsfaktor manipuliert wurde.

3.2 Charakterisierung und Einsatz eines zellpermeablen TAT-c-JUN Peptides

Das Ziel dieses Projektes war die Charakterisierung und der Einsatz eines kleinen, zellpermeablen Inhibitors, der spezifisch die Interaktion der Kinase JNK mit ihrem Substrat -dem Transkriptionsfaktor c-JUN- rupturiert. In weitergehenden Studien wurde dieser Inhibitor dazu verwendet, die Funktionen des c-JUN-JNK-Komplexes bei der Signaltransduktion ausgewählter Stimuli zu untersuchen.

3.2.1 Initiale Charakterisierung der Peptide TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.)

Das in dieser Arbeit eingesetzte c-JUN-Peptid wurde aus der Struktur des humanen c-JUN-Proteins und dessen Domänenaufteilung abgeleitet.

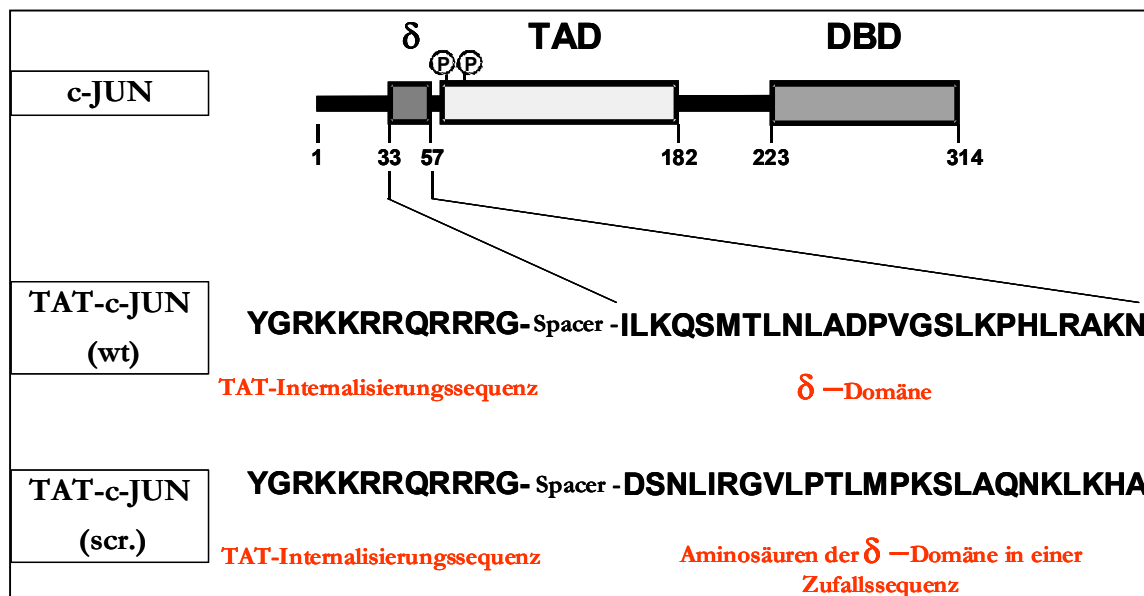


Abbildung 16: Schematische Struktur des humanen c-JUN-Proteins und der Peptide TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.)

Die obige Abbildung zeigt die vereinfachte Struktur des humanen c-JUN-Proteins, mit seiner C-terminalen DNA-bindenden Domäne (DBD) und seiner N-terminalen transaktivierenden Domäne (TAD). Letztere enthält die Aminosäuren Serin 63 und Serin 73, die neben anderen durch aktivierte JNK phosphoryliert werden. Unmittelbar N-terminal von der TAD liegt die sogenannte δ -Domäne, welche die *docking site* von c-JUN an JNK darstellt und daher unerlässlich für die c-JUN-Phosphorylierung und -Aktivierung ist.

Der in der Folge eingesetzte Inhibitor ist ein kleines, zellpermeables Peptid (TAT-c-JUN (wt)), das aus der Transduktions-Sequenz des HIV-Proteins TAT und der δ -Domäne von c-JUN besteht. Als Kontrolle wurde für die meisten Experimente ein Peptid verwendet, bei dem die Aminosäuren der δ -Domäne von c-JUN in einer Zufallssequenz an die TAT-Sequenz fusioniert wurden (TAT-c-JUN (scr.)). Die TAT-Sequenz wird jeweils durch einen aus vier C-Atomen bestehenden *spacer* (hier GABA= γ -Aminobuttersäure) von der δ -Domäne bzw. der Zufallssequenz getrennt. Zur Detektion der Internalisierung wurden diese Peptide N-terminal zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert.

Die Synthese erfolgte durch Dr. Graham Knight von der *University of Cambridge (Department of Biochemistry)* als C-terminale Amide nach Standardmethoden mit Fmoc als Schutzgruppe. Details zur Synthese sind der Referenz (Holzberg et al., 2003) zu entnehmen. Die aufgereinigten Peptide wurden im Anschluss durch HPLC und Massenspektrometrie durch Dr. Knight analysiert.

Das nachfolgende HPLC-Profil der Peptide zeigt lediglich einen Peak. Verunreinigungen durch Nebenprodukte der Synthese konnten daher ausgeschlossen werden. Desweiteren weist das Massenspektrum der beiden Peptide nur einen Hauptpeak mit der erwarteten Masse von 4,7kD auf, so dass TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.) als reine Peptide für die Folgeexperimente zur Verfügung standen.

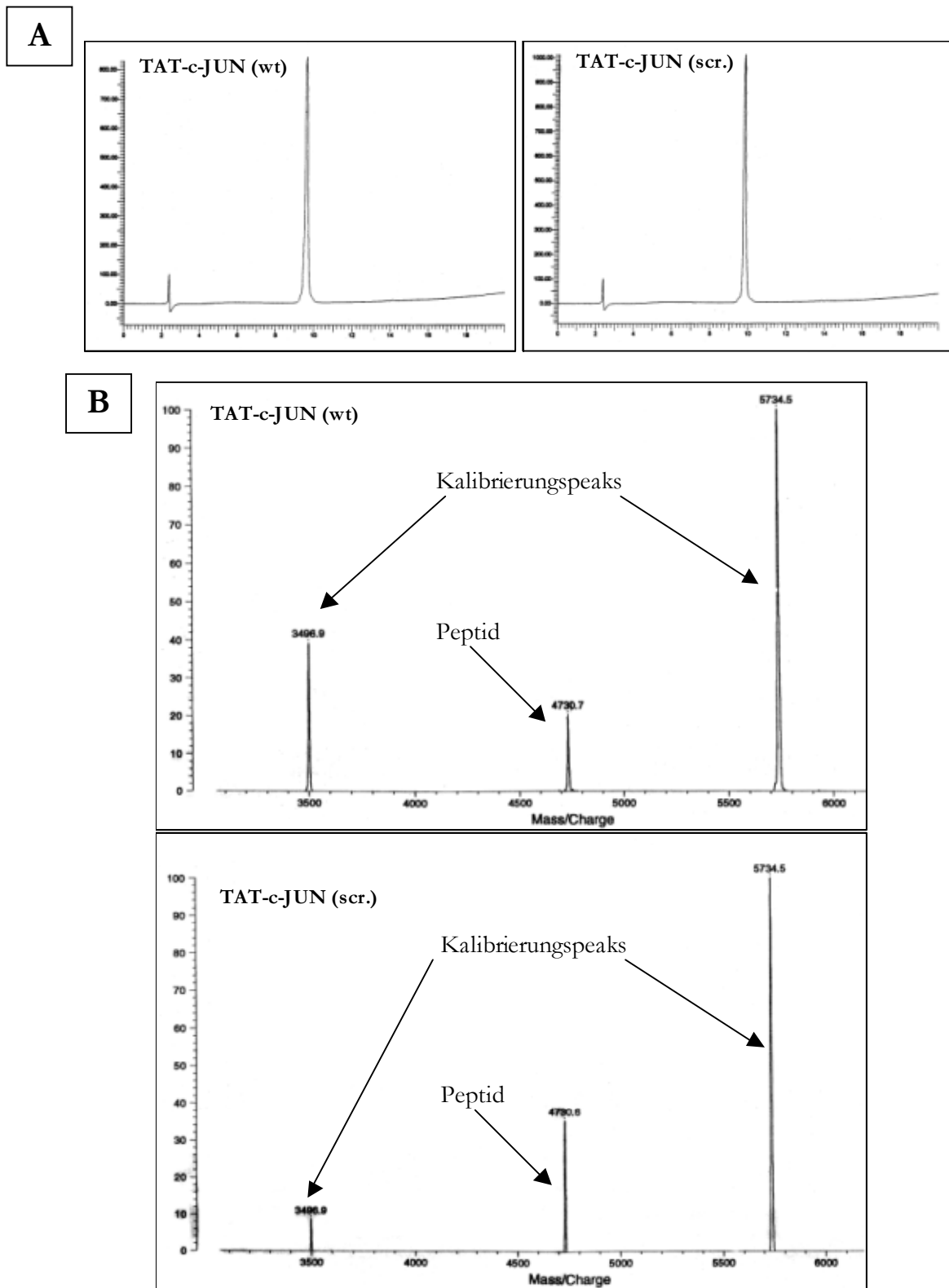
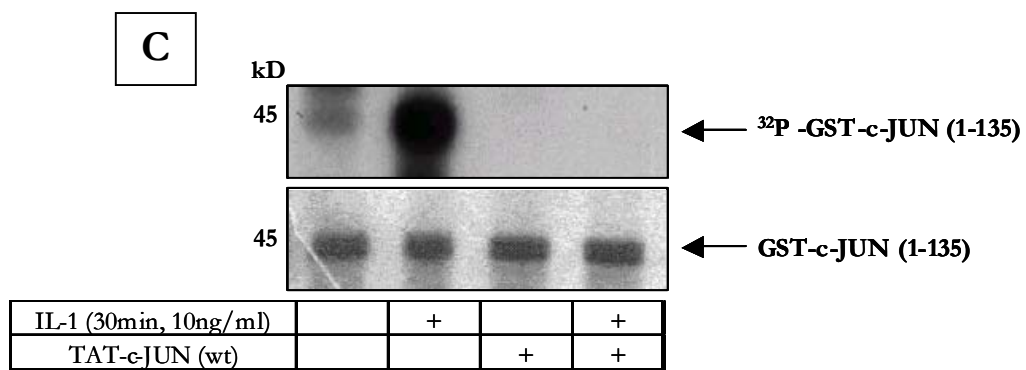
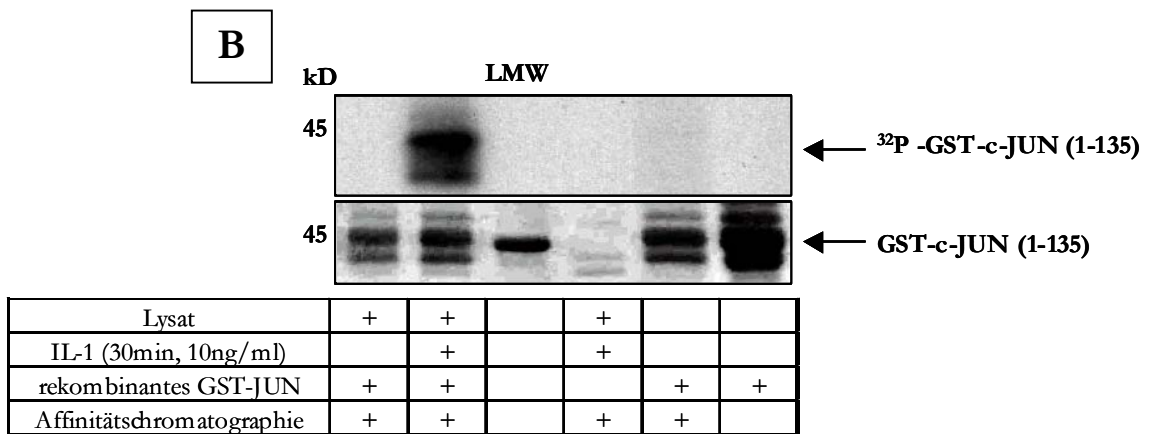
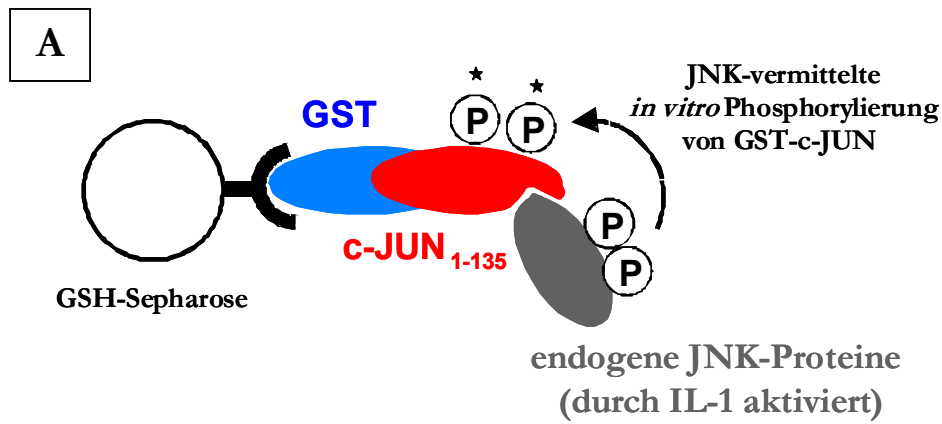


Abbildung 17: HPLC- und MS-Analyse der Peptide TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.)

A: HPLC-Profil

B: MS-Spektren

Es wurden zunächst wurden einige initiale *in vitro* und *in vivo* Experimente durchgeführt, um den Effekt von TAT-c-JUN (wt) auf die Funktionalität des c-JUN-JNK-Komplexes abzuschätzen. Zusätzlich wurden die Internalisierungseigenschaften in Zellen charakterisiert.



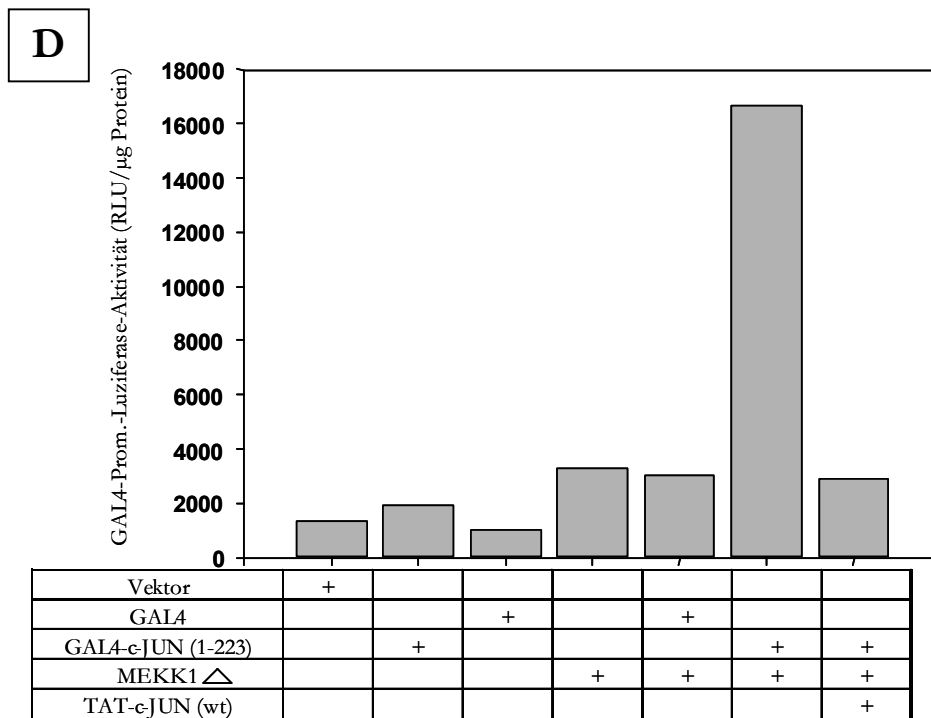


Abbildung 18: Inhibition der c-JUN-JNK Interaktion durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid *in vivo* und *in vitro*

A/B: Etablierung eines *in vitro* Kinase-Versuches zur Detektion JNK-abhängiger c-JUN-Phosphorylierung. Zur Erläuterung siehe Text.

C: Hemmung der JNK-abhängigen c-JUN-Phosphorylierung durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid. Zur Erläuterung siehe Text.

D: Hemmung der c-JUN-abhängigen Transaktivierung durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid. Zur Erläuterung siehe Text.

Zur Messung der JNK-abhängigen c-JUN-Phosphorylierung wurde ein *in vitro* Kinase-Versuch mit rekombinantem GST-c-JUN (1-135) etabliert. Dabei wird an GSH-Sepharose immobilisiertes GST-c-JUN (1-135) dazu verwendet, endogene JNK-Proteine aus IL-1-stimulierten Zellen bzw. unstimulierten Zellen zu isolieren (A). Nach Durchführung einer Kinase-Reaktion in Gegenwart von radioaktiv markiertem ^{32}P - γ -ATP wird die Phosphorylierung von c-JUN durch Autoradiographie detektiert. In Teilabbildung B ist die hohe Spezifität dieses Vorgehens sichtbar, da lediglich im Ansatz, der sowohl GST-c-JUN (1-135) und IL-1 stimuliertes Lysat enthält, eine *in vitro*-Phosphorylierung von c-JUN zu detektieren war. Der *Assay* nutzt also die hochaffine Interaktion von c-JUN mit endogenen JNKs aus, um diese Kinase zu isolieren, wobei deren Detektion nicht im Westernblot, sondern durch *in vitro*-Phosphorylierung von GST-c-JUN erfolgt.

Da dieser experimentelle Ansatz sehr sensitiv und spezifisch für die c-JUN-JNK-Interaktion ist, wurde der Versuch in Gegenwart des TAT-c-JUN (wt) Peptides wiederholt (C), welches zu der Bindereaktion der endogenen JNK-Proteine an GST-c-JUN (1-135) hinzugefügt wurde. Dieses

fürhte zur kompletten Hemmung der IL-1-abhängigen c-JUN-Phosphorylierung, was ein Hinweis auf eine effiziente Rupturierung des c-JUN-JNK-Komplexes ist.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit konnte durch eine zweite Art von Kinase-Versuch die hohe Spezifität des Hemmeffektes des TAT-c-JUN (wt) Peptides eindeutig bestätigt werden (vgl. Abb.42B).

Desweiteren wurde die Fähigkeit des TAT-c-JUN (wt) Peptides bei der Hemmung von c-JUN abhängiger Transaktivierung beurteilt, indem ein GAL4-Reportergenversuch durchgeführt wurde (D). Ein Fusionsprotein, bestehend aus der DNA-bindenden Domäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4, von dem es kein Homolog in Säugerzellen gibt, und der transaktivierenden Domäne von c-JUN, wurde durch Koexpression der MAP-3-Kinase MEKK1, einem starken Aktivator des JNK-Signalweges, aktiviert. Ein Anstieg im Transaktivierungspotential von c-JUN wurde anschließend durch Aktivierung eines Luziferase-Reportergen-Konstruktes, welches zwei GAL4-Bindungsstellen in seinem Promotor hat, detektiert.

Die Messung der Luziferase-Aktivität in transfizierten Hela Zellen zeigt die hohe Spezifität dieses Systems, da nur die Kotransfektion des Fusionsproteins GAL4-c-JUN mit MEKK1 zu einer erhöhten Luziferase-Aktivität führte. Wurden die Zellen nach der Transfektion in Anwesenheit von TAT-c-JUN (wt) kultiviert, war nur noch eine basale Luziferase-Aktivität messbar, was durch eine Hemmung der Interaktion von aktivierten, endogenen JNK-Proteinen mit GAL4-c-JUN erklärbar wird.

Es wurde daher davon ausgegangen, dass das Peptid TAT-c-JUN (wt) zur Funktionsanalyse des c-JUN-JNK-Komplexes in intakten Zellen verwendet werden konnte.

Zur Charakterisierung der Internalisierungseigenschaften wurden HeLa-Zellen für unterschiedliche Zeitspannen mit unterschiedlichen Mengen an Peptid inkubiert.

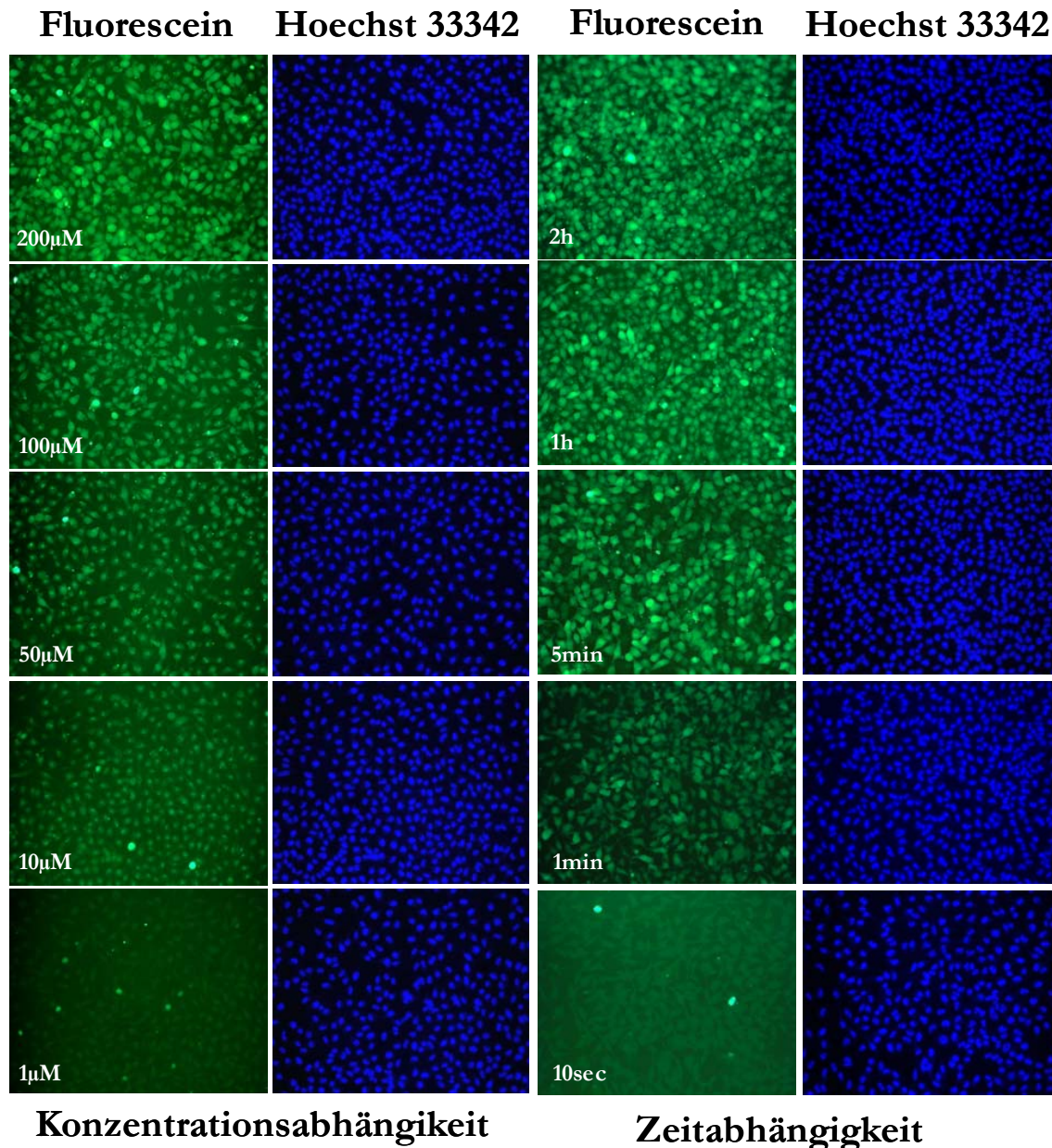


Abbildung 19: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Internalisierung von TAT-c-JUN (wt)

HeLa-Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag für 1h mit den angegebenen Konzentrationen bzw. mit 100μmol/l für die angegebenen Zeitpunkte mit dem Fluorescein-markierten Peptid TAT-c-JUN (wt) inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342, und die Fluoreszenzbilder wurden wie beschrieben aufgenommen (Vergrößerung: 10-fach). Eine analoge Versuchsreihe wurde für TAT-c-JUN (scr.) durchgeführt.

Die linke Seite der Abbildung zeigt eindeutig die Konzentrationsabhängigkeit der Internalisierung des Peptides TAT-c-JUN (wt), wobei die Menge an internalisiertem Peptid um so höher ist, desto höher die Konzentration im umgebenen Medium ist. Die Internalisierung ist darüberhinaus von der Zeit abhängig. Die Menge an aufgenommenen Peptid nimmt dabei innerhalb der ersten fünf Minuten stark zu, geht dann jedoch schnell in die Sättigung über. Das gleiche

Internalisierungsverhalten wurde für das TAT-c-JUN (scr.) Peptid in einer analogen Versuchsreihe gefunden.

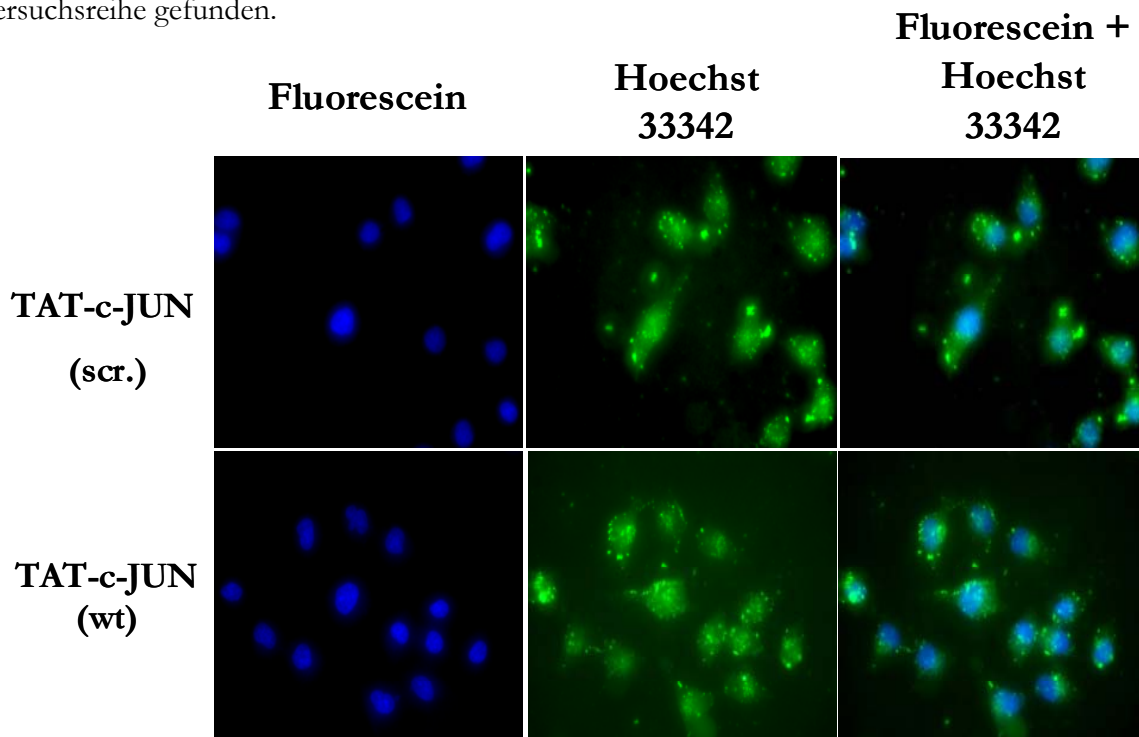


Abbildung 20: Intrazelluläre Lokalisation von TAT-c-JUN (scr.) und TAT-c-JUN (wt)

HeLa-Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag für 30min mit 100 μ mol/l der Fluorescein-markierten Peptide inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342, und die Fluoreszenzbilder wurden wie beschrieben aufgenommen (Vergrößerung: 64-fach).

Die intrazelluläre Lokalisation von TAT-c-JUN (scr.) und TAT-c-JUN (wt) wird bei einer stärkeren Vergrößerung deutlich. Durch die Überlagerung mit den Bildern der Kernfärbung konnte gezeigt werden, dass sich die Peptide, wie es für an die TAT-Sequenz fusionierte Cargos üblich ist, zwischen Zytosol und Kern verteilen. Dieses ist besonders wichtig, da dies der üblichen Lokalisation endogener JNK- und c-JUN-Proteine entspricht. Desweiteren sind einzelne Punkte starker Peptidkonzentration sichtbar, die vermutlich Lysosomen darstellen (vgl. "Einleitung).

3.2.2 Effekte des Peptides TAT-c-JUN (wt) auf das Überleben und Proliferationsverhalten von HeLa-Zellen

Während der oben beschriebenen, initialen Experimente zeigten Zellen, die für längere Zeitspannen mit TAT-c-JUN (wt) behandelt wurden, einen starken Anstieg der Anzahl toter Zellen, während dies für Zellen, die mit dem TAT-c-JUN (scr.) Peptid behandelt wurden, nicht beobachtet wurde.

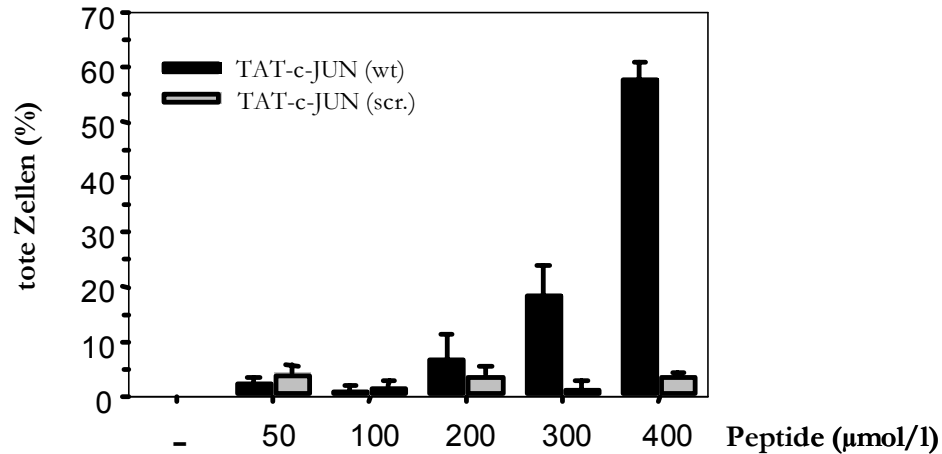
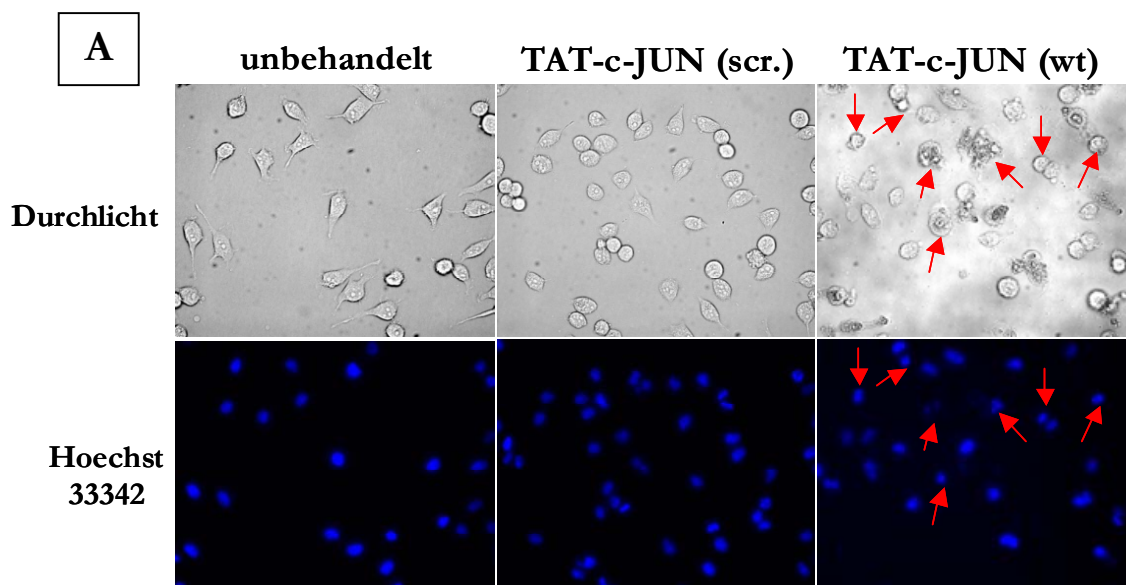


Abbildung 21: Zunahme der Anzahl toter Zellen nach der Behandlung von HeLa-Zellen mit TAT-c-JUN (wt)

HeLa-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und ab dem Folgetag für weitere 48h in Gegenwart der Peptide TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr) in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Ermittlung der Zahl toter Zellen durch Trypitanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$) (\pm S.E.M.)

Das verstärkte Zellsterben von HeLa-Zellen nach Behandlung mit TAT-c-JUN (wt) ist strikt konzentrationsabhängig, und bei einer Konzentration von $400\mu\text{mol/l}$ waren mehr als 60% der Zellen tot, während das TAT-c-JUN (scr.) Peptid keinen Einfluss hatte. Dieser Effekt wurde sowohl in HEK293 IL-1R-Zellen als auch in primären Zahnfleischfibroblasten beobachtet.

Zur Charakterisierung der Art dieses Zelltodes wurde das Chromatin der Zellen mit Hoechst 33342 angefärbt.



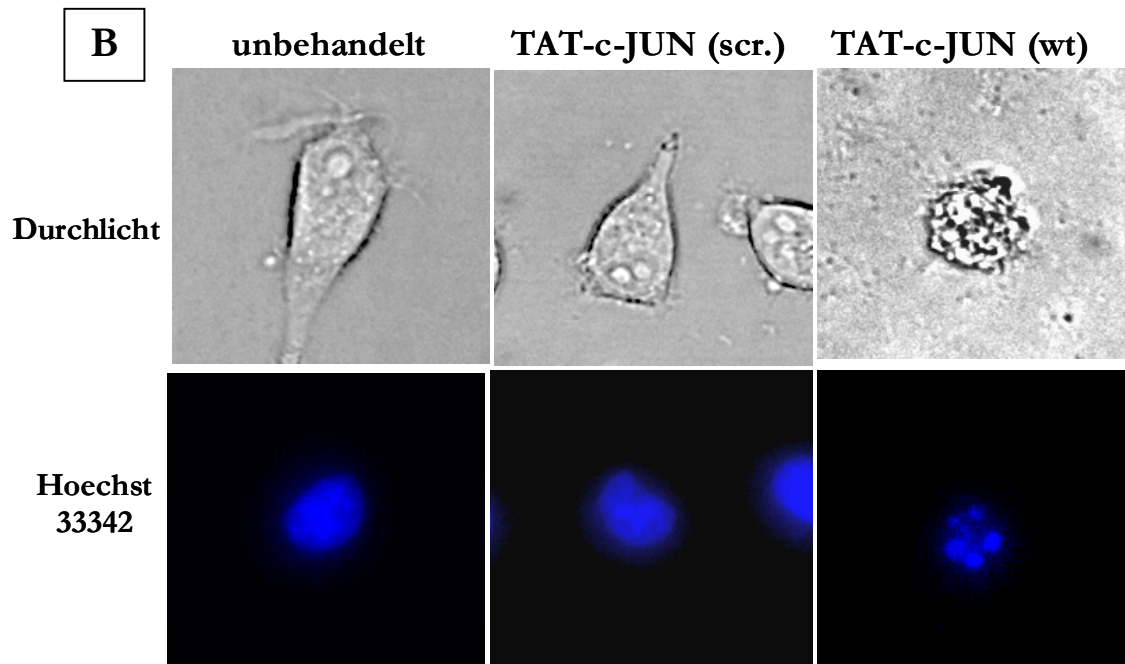


Abbildung 22: Das TAT-c-JUN (wt) Peptid induziert Apoptose

HeLa-Zellen wurden wie in Abb.21 beschrieben behandelt, und das Chromatin dieser Zellen wurde für 15min mit Hoechst 33342 angefärbt. Zellen mit apoptotischer Morphologie sind mit roten Pfeilen markiert.

A: Vergrößerung: 64-fach

B: Digitale Detailvergrößerung der oberen Teilabbildung

In den Durchlichtaufnahmen ist eindeutig die apoptische Morphologie der mit TAT-c-JUN (wt) behandelten Zellen sichtbar, die durch ein Zellschrumpfen, Blasenbildung in der Zellmembran (*membrane blebbing*) und ein Abrunden der Zellen charakterisiert ist. Die Anfärbung der Zellkerne offenbarte, dass das Chromatin in einer Vielzahl von Zellen stark kondensiert und fragmentiert ist, ein weiteres typisches Merkmal apoptischer Zellen. In der Detailvergrößerung lassen sich diese Apoptosemerkmale deutlich erkennen. Zellen die mit dem Kontrollpeptid behandelt wurden, zeigten in keiner Weise eine von den unbehandelten Zellen abweichende Morphologie.

Um die beobachtete Apoptose mit der Behandlung der Zellen mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid in Verbindung zu bringen, wurde die Phosphorylierung von endogenem c-JUN in HeLa-Zellen betrachtet. Da die Menge an endogenem phospho-c-JUN in spontan proliferierenden HeLa-Zellen in der Regel sehr gering ist, wurden die Zellen durch Kultivierung in Hungermedium zunächst synchronisiert und anschließend durch die Behandlung mit FKS restimuliert.

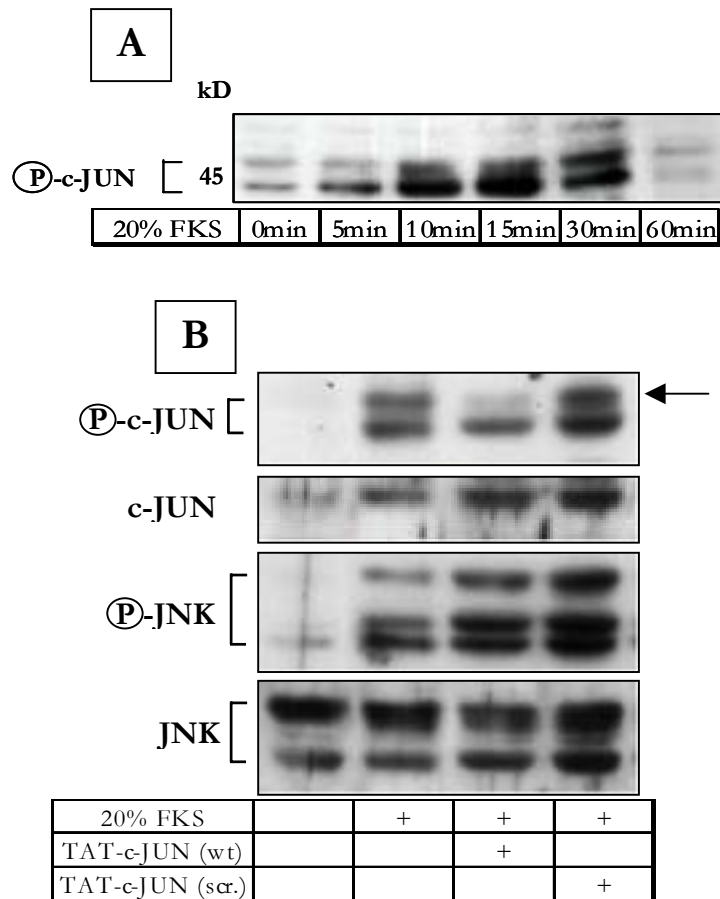


Abbildung 23: Das TAT-c-JUN (wt) Peptid hemmt die FKS-induzierte Phosphorylierung von endogenem c-JUN

A: HeLa-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und für 48h in Hungermedium (0,1% FKS) kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit 20% FKS für die angegebenen Zeitspannen und die Detektion von endogenem phospho-c-JUN im Westernblot.

B: HeLa-Zellen wurden analog zur oberen Teilabbildung behandelt, jedoch vor der 15minütigen Stimulation mit 20% FKS für 1h mit 400µmol/l der zellpermeablen Peptide inkubiert. Die Detektion endogener c-JUN und JNK-Proteine sowie ihrer phospho-Formen erfolgte im Westernblot.

Die Stimulation synchronisierter HeLa-Zellen mit FKS resultiert in der transienten Phosphorylierung von c-JUN, wobei diese nach 60min wieder vollständig verschwunden ist. Der untere Teil der Abbildung zeigt, dass die Vorbehandlung der Zellen mit TAT-c-JUN (wt) vor dem FKS-Schock fast vollständig zur Hemmung der hyperphosphorylierten und daher langsamer migrierenden c-JUN-Form führte (siehe Pfeilmarkierung). Hingegen hat das TAT-c-JUN (scr.) Peptid keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von c-JUN. Wichtig ist zu erwähnen, dass die Peptide weder mit der FKS-induzierten c-JUN-Expression noch mit der Phosphorylierung von JNK interferieren, was darauf hinweist, dass TAT-c-JUN (wt) unmittelbar unterhalb von JNK agiert.

Aus den oben vorgestellten Daten lässt sich ableiten, dass die Phosphorylierung von c-JUN als Antwort auf Wachstumsfaktoren eine entscheidene Rolle für das Überleben von Zellen in Kultur

spielt. Dafür kann es zwei mögliche Erklärungen geben. Zum einen könnte die Phosphorylierung von c-JUN wichtig für die Expression antiapoptischer Gene sein, die die Zelle davor bewahren, zu sterben. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Phosphorylierung von c-JUN als Antwort auf Wachstumsfaktoren ein wichtiger Schritt für den korrekten Ablauf des Zellzyklus darstellt und Zellen an einer bestimmten Stelle des Zellzyklus arretieren, falls dieses Signal ausbleibt. Im Folgeschritt könnten solche Zellen dann durch Apoptose „eliminiert“ werden. Da es für das zweite Szenario Hinweise aus der Literatur gab, wurde die Expression des Zellzyklusinhibitors p21, der über p53 unter indirekter Kontrolle durch den Transkriptionsfaktor c-JUN steht (vergl. „Einleitung“), analysiert. Da c-JUN inhibierend auf den p53-Promotor wirkt, p53 jedoch die Transkription vom p21-Promotor aktiviert (Shaulian et al., 2000; Schreiber et al., 1999), sollten Zellen, die mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid behandelt wurden, eine erhöhte Expression von p21 aufweisen.

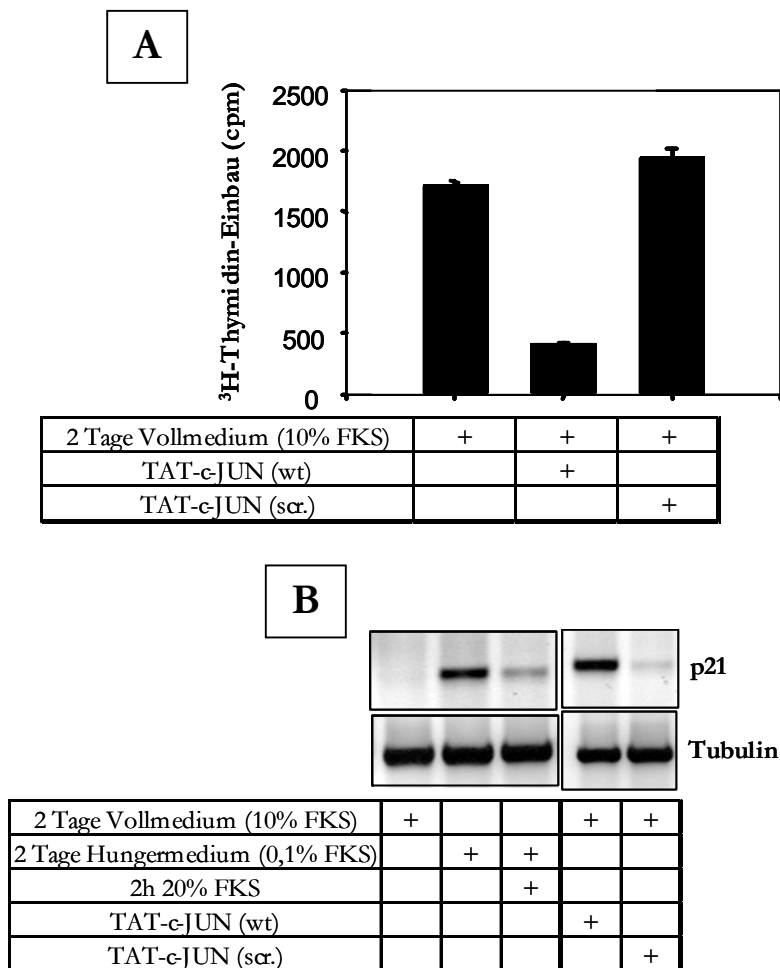


Abbildung 24: Das Peptid TAT-c-JUN (wt) hemmt die Proliferation von HeLa-Zellen

A: HeLa-Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät und ab dem Folgetag für 48h mit 400µmol/l der Peptide kultiviert. Die Messung an inkorporiertem ^3H -Thymidin erfolgte wie beschrieben.

B: HeLa-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und ab dem Folgetag für weitere 48h wie angegeben kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Isolierung der totalen RNA und die Detektion der p21- und Tubulin-mRNA mittels RT-PCR.

Der Einbau von ^3H -Thymidin in neusynthetisierte DNA zeigt eindeutig die verminderte Proliferation von TAT-c-JUN (wt) behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen oder solchen, die in analoger Weise mit dem Kontrollpeptid kultiviert wurden. Diese Beobachtung ist vermutlich eine Kombination aus der eintretenden Apoptose und einem tatsächlichen Proliferationsdefekt. Um weitere Einblicke in das Proliferationsverhalten dieser Zellen zu erhalten, wurde daher die Expression von p21 mittels RT-PCR untersucht.

In normal proliferierenden HeLa-Zellen, die in Vollmedium kultiviert werden, ist die Expression der p21-mRNA sehr gering und unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht detektierbar. Der Entzug von FKS und damit der Wachstumsfaktoren führte zu einer Hochregulation dieses Zellzyklusinhibitors und einem Proliferationsstop. Durch eine Restimulation der Zellen mit FKS konnte die Expression von p21 wieder abgesenkt werden. Werden die Zellen hingegen in Vollmedium aber gleichzeitig in der Anwesenheit von TAT-c-JUN (wt) kultiviert, so führte dieses ebenfalls zur verstärkten Expression von p21, während TAT-c-JUN (scr.) keinen Einfluss hatte. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass TAT-c-JUN (wt) eine von den Wachstumsfaktoren ausgelöste Signalkaskade in den Zellen unterbricht, worauf diese mit einem Proliferationsstop und der Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21 reagieren. Auf die Bedeutung dieser Daten wird in der Diskussion eingegangen.

3.2.3 Effekte des Peptides TAT-c-JUN (wt) auf die Expression IL-1-abhängiger entzündlicher Gene

Da die Rolle des Transkriptionsfaktors c-JUN als positiver Regulator von Zellüberleben mittlerweile gut etabliert ist und die im ersten Teil dieses Projektes erhaltenen Daten in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen aus transgenen c-JUN-Mäusen sowie c-JUN^{-/-}-Mäusen waren (vergl. „Einleitung“), wurde der Effekt des TAT-c-JUN (wt) Peptides auf die Signaltransduktion anderer Stimuli, für die der c-JUN-JNK-Komplex bekanntermaßen eine wichtige Rolle spielt, untersucht. Die folgenden Studien konzentrieren sich dabei auf das proinflammatorische Zytokin IL-1, einem starken Aktivator entzündlicher Genexpression. Die Effekte des TAT-c-JUN (wt) Peptides wurden mit denen eines niedermolekularen Inhibitors der enzymatischen JNK-Aktivität - SP600125 (Bennett et al., 2001)- verglichen.

Als Modellgen wurde dabei zunächst das chemotaktische Chemokin IL-8 untersucht, da dieses für seine Expression auf die Aktivierung von JNK und AP-1-Transkriptionsfaktoren angewiesen ist (Hoffmann et al., 2002) und seine Regulation von unserer Arbeitsgruppe bereits intensiv analysiert wurde.

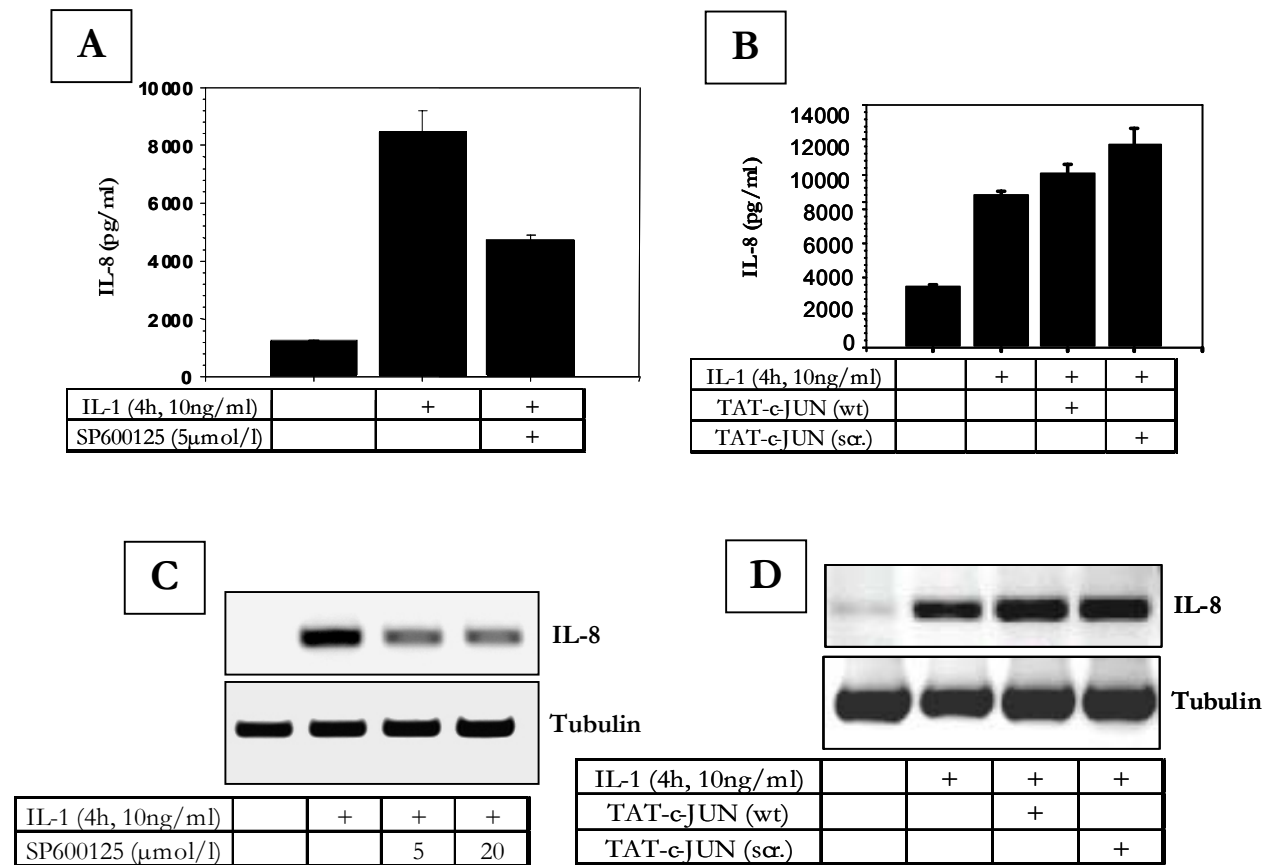


Abbildung 25: Vergleich der Effekte von SP600125 und TAT-c-JUN (wt) auf die IL-1-induzierte Expression von IL-8

A: HeLa-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag entweder direkt für 4h mit IL-1 stimuliert oder zunächst für 30min mit SP600125 vorbehandelt. Die Messung der IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte im ELISA wie beschrieben.

B: HeLa-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag entweder direkt für 4h mit IL-1 stimuliert oder für 1h mit 400µmol/l der Peptide vorinkubiert. Die Messung der IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand erfolgte im ELISA wie beschrieben.

C: HeLa-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und wie in A behandelt. Die Detektion der Mengen an IL-8- und Tubulin-mRNA erfolgte wie beschrieben durch RT-PCR.

D: HeLa-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und wie in B behandelt. Die Detektion der Mengen an IL-8- und Tubulin-mRNA erfolgte wie beschrieben durch RT-PCR.

Die Teilabbildungen A und C zeigen eine ca. 50%ige Reduktion der IL-1-induzierten IL-8-Sekretion und IL-8-mRNA-Bildung durch Hemmung von JNK mit der Substanz SP600125, wobei die Hemmung durch Erhöhung der SP-Konzentration nicht verstärkt werden kann. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung zu bereits publizierten Arbeiten (Krause et al., 1998), die dem JNK-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Expression des IL-8-Gens zuweisen. Im Gegensatz dazu konnte weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene eine Hemmung der IL-1-induzierten IL-8-Sekretion durch die Vorinkubation der Zellen mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid festgestellt werden, was ein Hinweis darauf ist, dass sich die Signaltransduktion durch inflammatorische Stimuli unterhalb von JNK aufzweigt.

Um eine größere Anzahl an Genen in einem Schritt untersuchen zu können, wurde auf einen in unserer Arbeitsgruppe entwickelten DNA-*Microarray* zurückgegriffen, der die gleichzeitige Messung von 110 Genen zulässt, denen eine wichtige Funktion in der Entzündungsreaktion zukommt. Dazu zählen verschiedene Chemokine, Rezeptoren oder auch Matrixmetallo-Proteinasen (Dittrich-Breiholz et al., 2003). Da in einer Vielzahl von Experimenten mit verschiedenen biologischen Stimuli und verschiedenen Zelltypen die Erfahrung gemacht wurde, dass primäre Zellen wesentlich besser auf proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF reagieren, wurden die folgenden Experimente mit primären Zahnfleischfibroblasten durchgeführt (HuGi = *human gingiva*).

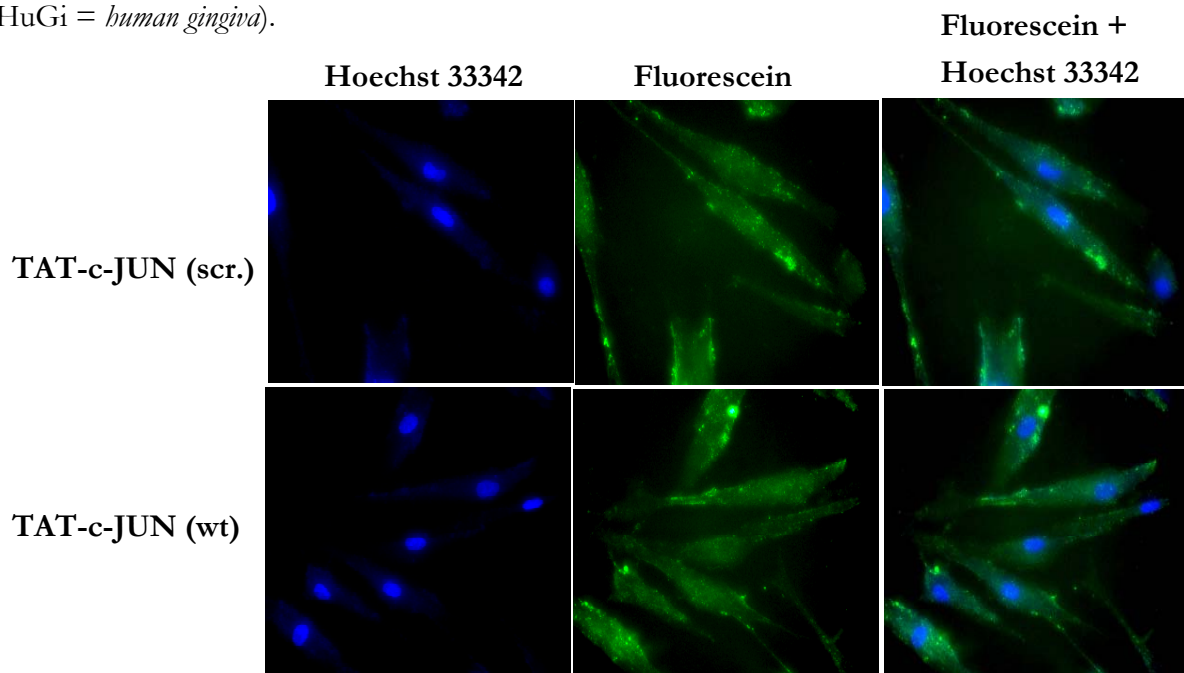


Abbildung 26: Transduktion zellpermeabler Peptide in primäre Zahnfleischfibroblasten (HuGi)

HuGi-Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag für 30min mit 100 μ mol/l der Fluorescein-markierten Peptide inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342, und die Fluoreszenzbilder wurden wie beschrieben aufgenommen (Vergrößerung: 64-fach).

Ähnlich wie bei der Zelllinie HeLa werden 100% der Zellen durch die zellpermeablen Peptide TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.) transduziert. Darüberhinaus verteilen sich diese gleichmäßig zwischen Zytosol und Kern, was durch die Kernfärbung gezeigt werden konnte. Diese Zellen wurden daher zu einer *Microarray*-Analyse, in der der Effekt dieser Peptide auf die IL-1-induzierte Expression entzündlicher Gene untersucht werden sollte, herangezogen. Da die Effekte dabei mit denen des JNK-Inhibitors SP600125 verglichen werden sollten, wurde zunächst in einem explorativen Experiment die Konzentration an SP600125 ermittelt, die zur Hemmung der JUN-Phosphorylierung in HuGi-Zellen nötig ist.

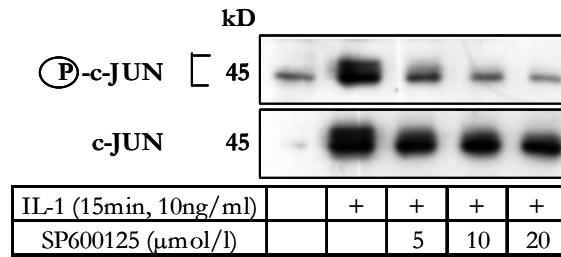


Abbildung 27: Hemmung der IL-1-induzierten c-JUN-Phosphorylierung mit SP600125 in HuGi-Zellen

HuGi-Zellen wurden in 12-Lochplatten ausgesät und am Folgetag für 30min mit den angegebenen Konzentrationen des JNK-Inhibitors SP600125 für 30min im Brutschrank inkubiert, anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-1. Die Detektion von phospho-c-JUN und c-JUN erfolgte im Westernblot.

Die Stimulation von HuGi-Zellen mit IL-1 führt zur Phosphorylierung von c-JUN. Diese wird durch Vorinkubation der Zellen mit SP600125 aufgehoben, wobei bereits bei einer Konzentration von 5μmol/l eine starke Hemmung auftritt, die durch höhere Konzentrationen des JNK-Inhibitors jedoch noch leicht verstärkt werden kann. Für die anschließende *Microarray* Analyse wurde daher eine Konzentration von 20μmol/l an SP600125 verwendet.

Der untere Teil der Abbildung zeigt darüberhinaus die IL-1-induzierte Expression von c-JUN. Allerdings ist dieses Ergebnis nur mit Vorbehalt auf diese Weise zu interpretieren, da die Membran zunächst mit einem Antikörper gegen phospho-c-JUN und erst im Anschluss gegen c-JUN inkubiert wurde und es sich bei dem c-JUN Signal auch um ein Restsignal des phospho-c-JUN-Antikörpers handeln könnte. Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse:

accession number	Gen- name	n = 4		n = 2		n = 2		n = 2	
		IL-1 / 0		IL-1 + wt-Peptid / 0		IL-1 + scr.-Peptid / 0		IL-1 + SP600125 / 0	
		Ratio	S.E.M (+/-)	Ratio	S.E.M. (+/-)	Ratio	S.E.M (+/-)	Ratio	S.E.M (+/-)
af385628	CXCL8	99,02	19,32	120,06	34,97	128,13	17,31	67,11	18,09
m14584	IL-6	78,35	30,35	100,39	11,05	95,78	12,52	57,94	16,84
nm000963	COX-2	48,78	16,45	205,35	178,53	83,50	44,61	20,09	13,73
nm002428	MMP-15	40,13	24,32	22,47	3,14	26,17	13,07	39,01	29,14
m28225	CCL-2	38,09	11,10	3,14	1,84	25,11	0,31	31,90	16,53
xm040712	hIAP-1	35,35	11,96	15,42	3,27	28,62	2,07	36,46	8,75
m36821	CXCL3	22,73	4,79	25,55	7,89	21,49	1,62	37,03	17,20
m36821	CXCL3	19,43	4,39	20,14	9,42	17,68	2,47	28,77	10,84
nm001565	CXCL10	13,77	9	1,76	0,89	3,27	0,29	3,43	2,02
ab037925	MAIL	11,57	1,05	18,28	5,80	12,48	1,65	9,64	1,48
j03603	PAI-2	11,04	2,10	10,18	0,51	13,37	4,64	4,87	0,36
xm018501	PTX3	10,59	2,06	7,90	2,53	13,86	7,65	6,47	0,84
xm033941	MnSOD	10,36	2,67	19,11	9,20	8,53	3,66	6,82	3,61
xm049516	ICAM-1	8,98	1,74	4,80	2,30	11,78	8,28	6,43	1,02
d10925	CCR1	8,31	3,09	10,01	1,71	11,09	4,17	7,01	2,00
ac004511	GM-CSF	7,98	1,95	11,75	0,17	9,52	3,12	7,03	0,80
ac007165	IL-1R (type II)	7,46	2,96	8,13	0,48	8,39	2,95	5,85	2,60
bc009483	IRF-1	7,23	1,95	11,53	4,19	11,25	4,99	6,50	1,53
bc004983	IkB- α	6,54	0,57	12,53	3,38	7,75	0,03	5,02	1,39
nm000161	GTP-Chl. 1	6,46	2,31	4,49	0,37	5,59	0,65	3,24	0,94
xm053443	uPA	4,89	0,61	5,87	0,95	6,95	1,30	4,77	0,33
bc009874	c-Jun	3,96	1,17	4,73	0,60	3,88	1,68	6,03	3,62
af186094	IL-1 δ	3,91	1,54	4,18	0,85	4,21	2,00	3,66	1,63
xm038956	CCL8	3,66	1,88	1,28	0,65	1,97	0,31	5,55	4,51
xm006270	MMP-1	3,45	0,98	3,10	1,44	2,98	0,03	1,56	0,57
nm002422	MMP-3	2,75	0,78	3,52	2,86	2,86	1,91	1,06	0,02
x02532	IL-1 β	2,62	0,69	0,86	0,75	2,28	0,53	1,10	0,44
bc007022	SAA 1	2,60	0,95	0,68	0,36	1,12	0,72	4,43	2,39
af027740	mPGES	2,59	0,77	1,57	0,11	2,54	0,84	2,95	1,26
m15329	IL-1 α	2,56	0,81	1,39	0,39	1,73	0,26	1,16	0,19
j04513	FGF	2,46	0,51	3,19	2,17	2,90	1,95	1,43	0,18
l49431	hIAP-2	2,32	0,29	1,72	0,05	2,97	0,52	3,92	0,13
ac006953	uPAR	1,87	0,24	2,38	0,48	1,37	0,12	1,04	0,25
nm020995	Haptoglobin	1,73	0,44	1,82	0,80	1,93	0,70	1,68	0,63
nm002427	MMP-13	1,70	0,60	1,40	0,21	1,13	0,06	1,44	0,42
x04429	PAI-1	1,64	0,32	1,62	0,33	1,63	0,64	1,32	0,79
af237762	Ex33	1,58	0,57	1,37	0,78	2,00	0,89	0,82	0,11
nm000222	c-kit	1,56	0,36	2,10	0,77	1,98	0,84	1,27	0,15
m10988	TNF α	1,52	0,51	1,59	0,91	1,76	0,79	0,85	0,17
xm009010	C3	1,51	0,26	0,97	0,43	1,27	0,34	1,14	0,38
xm043150	IL-2R α (p55)	1,42	0,45	1,45	0,64	1,43	0,32	0,91	0,25
xm044653	EGFR	1,33	0,38	0,83	0,06	0,77	0,02	1,29	0,49
nm002133	HO-1	1,30	0,31	2,98	1,57	1,36	1,05	1,37	0,29
af359939	IL-2	1,27	0,12	1,95	0,22	1,50	0,41	1,07	0,05
aj224869	CXCR4	1,24	0,36	1,66	0,29	1,50	0,17	0,82	0,11
j04130	CCL4	1,19	0,30	1,13	0,32	0,94	0,37	1,04	0,05
al009183	ILA	1,19	0,19	1,51	0,08	1,51	0,45	0,93	0,19
xm035775	V-CAM-1	1,11	0,36	1,49	0,85	1,27	0,74	1,00	0,17
xm003304	TLR 2	1,06	0,44	0,99	0,30	0,98	0,04	0,82	0,19
ab000676	SOCS-1	1,05	0,19	0,82	0,40	1,03	0,13	1,00	0,03
af088851	ferritin Hc.	1,04	0,07	0,89	0,06	0,76	0,05	0,75	0,24
ac002428	IL-9	1,03	0,18	1,35	0,53	1,50	0,30	0,75	0,12
nm000565	IL-6R	1,01	0,30	1,07	0,46	1,02	0,60	0,82	0,17
ab010445	CCL27	1,00	0,30	1,35	0,85	1,24	0,52	0,80	0,02
al162458	MMP-9	0,95	0,14	0,85	0,85	1,31	0,43	0,92	0,06
bc007007	IL-18	0,92	0,29	1,75	0,60	1,31	0,67	1,47	0,19
xm008912	TGF- β 1	0,91	0,08	0,96	0,05	0,97	0,08	0,88	0,00
d63785	CCL-3	0,90	0,21	1,06	0,19	0,90	0,25	0,65	0,17
u16306	Versican	0,84	0,28	0,67	0,14	0,67	0,08	0,82	0,39
al021940	E-selectin	0,83	0,13	1,27	0,21	1,07	0,16	0,77	0,06
nm004513	IL-16	0,66	0,08	0,69	0,04	0,54	0,02	0,47	0,06
x62468	IFN γ	0,64	0,14	1,11	0,00	0,98	0,06	0,64	0,08
al354866	CTGF	0,61	0,18	1,77	0,44	1,48	0,50	0,62	0,38
af060152	ADAMTS-1	0,51	0,10	1,18	0,36	0,55	0,17	0,48	0,12

Tabelle 4: Vergleich der Effekte des TAT-c-JUN (wt) Peptides und des JNK-Inhibitors SP600125 auf die IL-1-induzierte Expression entzündlicher Gene (Teil I)

Primäre Zahnfleischfibroblasten wurden in 25cm²-Flaschen ausgesät und nach drei Tagen für 4h mit IL1 stimuliert (10ng/ml) oder unbehandelt belassen. Zuvor wurden die Zellen für 1h mit 400µmol/l TAT-c-JUN (wt) bzw. TAT-c-JUN (scr.) oder für 30min mit 20µmol/l SP600125 vorinkubiert. In Anschluss wurde die totale RNA isoliert und zur Synthese doppelsträngiger cDNA sowie Cy-3-markierter cRNA verwendet, die getrennt auf DNA-*Microarrays* hybridisiert wurde. Diese enthielten Oligonukleotide in einer Länge von 50 Basen zur Detektion von 110 Genen, denen eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion zugewiesen wird, sowie einige Haushaltsgene zur Normalisierung der erhaltenen Daten. Die Fluoreszenzintensitäten der gebundenen, markierten cRNAs wurden durch einen Affimetrix 428 Scanner aufgenommen und normalisiert, wobei 61 exprimierte Gene identifiziert wurden, die in obiger Tabelle dargestellt sind. Die Darstellung der Werte erfolgte als Ratios, das heißt dem Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von jeweils IL-1-stimulierten und unstimulierten Proben (unstimuliert = 0). Zusätzlich wurde aus mindestens zwei biologisch unabhängigen Experimenten für jedes Verhältnis der Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M. = *standard error of the mean*) berechnet. Hierbei wurde jeweils eine komplette Versuchsreihe wiederholt, woraus sich vier bzw. zwei unabhängige Versuche ergeben.

Die Anordnung der Ergebnisse erfolgte nach der relativen Induktion der Gene durch IL-1, zu deren Identifikation sowohl der gebräuchliche Name sowie die Zugangsnummern (*accession number*) angegeben wurden.

Um eine ausreichende RNA-Menge für die *Microarray*-Analyse aus den primären Zahnfleischfibroblasten gewinnen zu können, ohne jedoch unnötig Peptid verschwenden zu müssen, wurden diese in 25cm²-Flaschen bis zu einem vollständig dichten Zellrasen kultiviert. Die Zellen wurden im Anschluss wie in der Legende zu Tab.4 beschrieben mit IL-1 stimuliert bzw. mit den zellpermeablen Peptiden TAT-c-JUN (wt) und dem Kontrollpeptid TAT-c-JUN (scr.) sowie dem JNK-Inhibitor SP600125 vorinkubiert. Für die nachfolgende Synthese Cy-3 markierter cRNA wurden 100ng doppelsträngiger cDNA eingesetzt, die aus jeweils 5µg totaler RNA hergestellt wurden. 22µg der cRNA pro Ansatz wurden schließlich über Nacht bei 42°C auf den *Arrays* hybridisiert. Das Waschen und Scannen erfolgte wie beschrieben.

Die Analyse der Daten ergab, dass 61 der 110 Gene auf dem Array in HuGi Zellen exprimiert werden, das heißt Fluoreszenzsignale oberhalb von 10% der durchschnittlichen Signalintensität im unstimulierten Kanal aufwiesen. 31 dieser 61 Gene wurden mindestens 2-fach durch IL-1 induziert. Um eine Gruppe von Genen zu identifizieren, deren Expression vom TAT-c-JUN (wt) Peptid beeinflusst wird, wurden die Zellen vor der IL-1-Stimulation entweder mit dem wt-Peptid oder dem Kontrollpeptid vorbehandelt. Diese Art des Versuchsansatzes ermöglicht es etwaige unspezifische Effekte, die durch die Behandlung der primären Zahnfleischfibroblasten mit zellpermeablen Peptide hervorgerufen werden könnten, aus der Betrachtung der Ergebnisse zu eliminieren und damit die Identifikation von Genen, die spezifisch durch das wt-Peptid gehemmt oder hochreguliert werden. Gleichzeitig wurden die Zellen in einem anderen Ansatz für 30min mit dem JNK-Inhibitor vorinkubiert, bevor sie mit IL-1 stimuliert wurden. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in einem Balkendiagramm dargestellt:

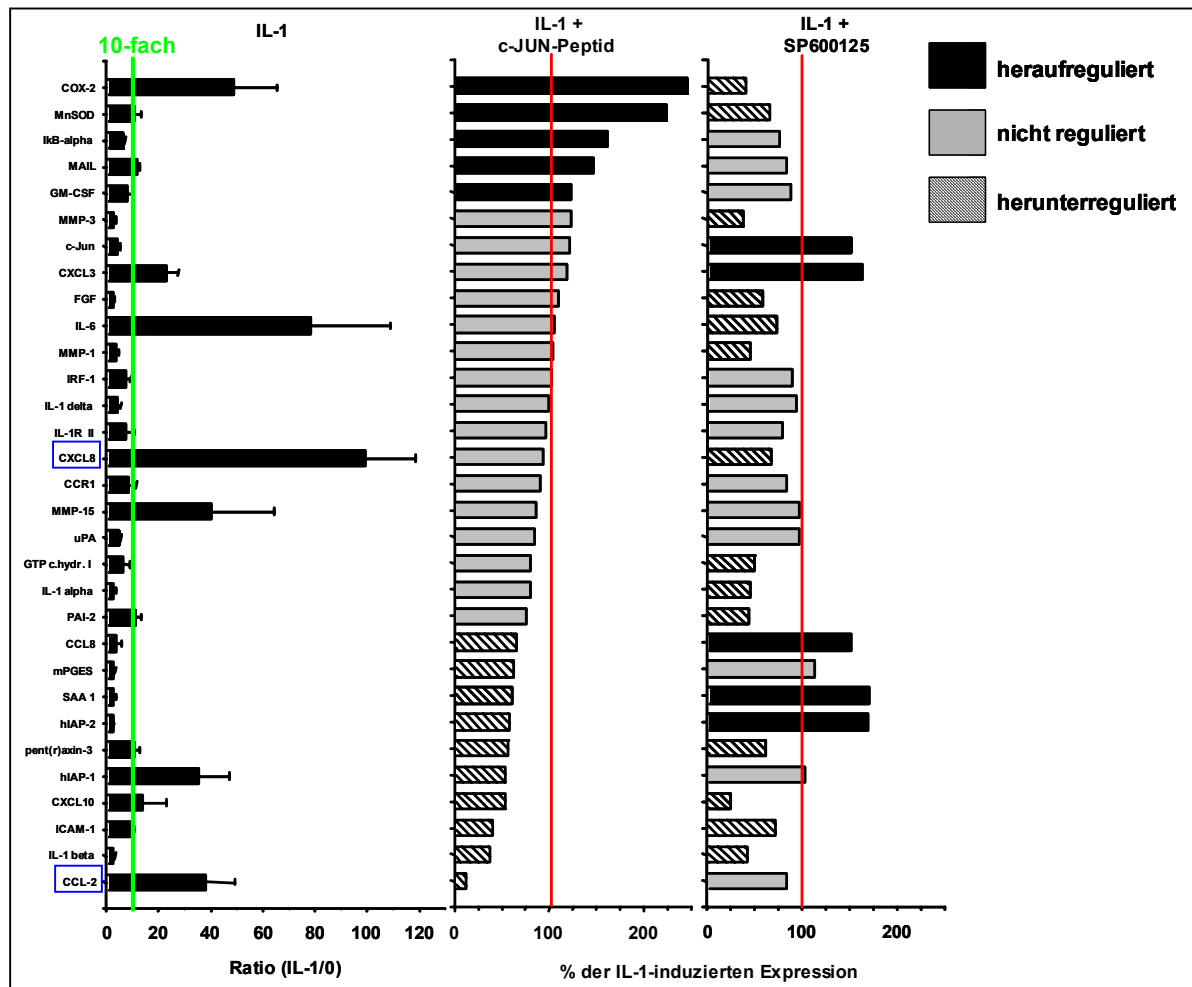


Abbildung 28: Vergleich der Effekte des TAT-c-JUN (wt) Peptides und des JNK-Inhibitors SP600125 auf die IL-1 induzierte Expression entzündlicher Gene (Teil II)

Es wurden nur solche Gene ausgewählt, deren Expression mindestens zweifach durch IL-1 induziert wurde; die Anordnung erfolgte dabei anhand des Hemmeffektes durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid. Das erste Balkendiagramm zeigt die gemessenen Ratio dieser 31 Gene als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten stimulierter (IL-1) und unstimulierter (unstimuliert = 0) Proben (IL-1/0). Die grüne Linie markiert eine 10-fache Induktion durch IL-1. Im zweiten und dritten Balkendiagramm sind keine absoluten Ratios dargestellt, sondern Prozente der IL-1-induzierten Expression. Spezifische Effekte von TAT-c-JUN (wt) wurden durch Vergleich der Ratios von IL-1 + TAT-c-JUN (wt)-behandelten Zellen mit IL-1 + TAT-c-JUN (scr.)-behandelten Zellen ermittelt (IL-1 + TAT-c-JUN (scr.) = 100%; IL-1 + TAT-c-JUN (wt) = X%). Für SP600125 wurden die Ratios von IL-1-behandelten Zellen mit denen von IL-1 + SP600125-behandelten-Zellen verglichen (IL-1 = 100%; IL-1 + SP600125 = X%). Die rote Linie markiert 100% (keine Hemmung). Die schraffierten Balken markieren Gene, deren IL-1-induzierte Expression zu mindestens 25% durch das c-JUN-Peptid gehemmt wurde, während die schwarzen Balken Gene markieren, deren IL-1-induzierte Expression durch das c-JUN-Peptid um mindestens 25% erhöht wurde. Die Expression der mit grauen Balken markierten Gene wird nicht durch das c-JUN-Peptid verändert. Der blaue Rahmen verweist auf die Gene CXCL8 (= IL-8) und CCL-2 (= MCP-1).

Das Gen, dessen IL-1-induzierte Expression am stärksten durch TAT-c-JUN (wt) gehemmt wurde, ist das chemotaktische Protein CCL-2 (= MCP-1). Während die Hemmung durch das wt-Peptid bei ca. 90% liegt, hat das scr.-Peptid keinen Einfluss. Interessanterweise wird die Expression von CCL-2 kaum durch Hemmung von JNK mit SP600125 beeinflusst.

Darüberhinaus war, wie schon zuvor in der Zelllinie HeLa beobachtet wurde, das TAT-c-JUN (wt) Peptid im Gegensatz zu SP600125 nicht dazu in der Lage, die IL-1 induzierte IL-8-Expression (IL-8 = CXCL-8) zu hemmen.

Um sicherzugehen, dass die beobachtete Hemmung von Genen kein Effekt einer eventuellen RNA-Degradation durch die eintretenden Apoptose von HuGi-Zellen durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid ist, wurde die durchschnittliche Fragmentgröße der auf den *Arrays* hybridisierten cRNAs mittels Agilentanalyse ermittelt.

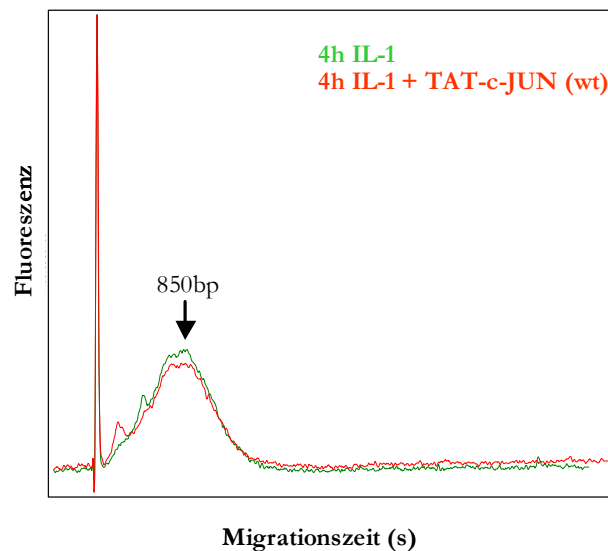


Abbildung 29: Agilentanalyse von cRNA aus IL-1-behandelten und IL-1/TAT-c-JUN (wt) behandelten HuGi-Zellen

Ca. 250ng cRNA aus Material von IL-1-behandelten HuGi-Zellen und solchen Zellen, die vor der IL-1-Stimulation für 1h mit 400 μ M TAT-c-JUN (wt) vorinkubiert wurden, wurde auf einem Agilent-Chip analysiert. Die durchschnittliche Fragmentgröße der markierten cRNA wurde computergestützt anhand der Migrationszeit bestimmt.

Sowohl die cRNA aus IL-1-behandelten Zellen als auch die aus IL-1/TAT-c-JUN (wt)-behandelten Zellen zeigt eine durchschnittliche Fragmentgröße von 850bp. Da dieses Material auf die *Arrays* hybridisiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die in der obigen Tabelle vorgestellten Daten und Effekte nicht auf etwaige Degradation der RNA in TAT-c-JUN (wt)-behandelten Zellen zurückzuführen sind.

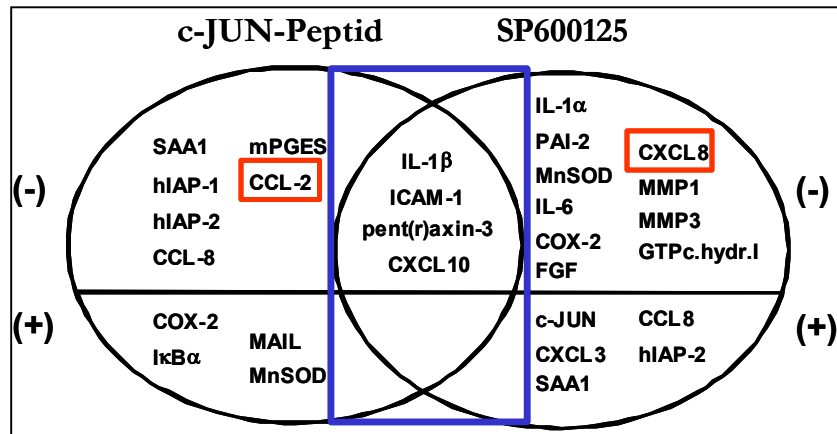


Abbildung 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der *Microarray*-Analyse in primären humanen Fibroblasten

Es wurden nur solche Gene ausgewählt, deren Expression mindestens 2-fach durch IL-1-Stimulation induziert wurde. Dargestellt sind drei Gruppen von Genen, deren Expression entweder nur durch TAT-c-JUN (wt), nur durch SP600125 oder durch beide Substanzen um mindestens 25% gehemmt (-) oder induziert (+) wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diesen Versuchsansatz drei Gruppen IL-1-induzierter entzündlicher Gene unterschieden werden konnten. Die erste Gruppe umfasst Gene, deren IL-1-induzierte Expression durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid um mindestens 25% gehemmt oder induziert wird und die deshalb für ihre Expression auf den Transkriptionsfaktor c-JUN angewiesen sind. Die IL-1-induzierte Expression der zweiten Gruppe hingegen ist nur SP-sensitiv, so dass diese Gene eindeutig durch JNK reguliert werden. Die dritte Gruppe (blaue Umrahmung) an Genen wiederum ist sowohl Peptid- als auch SP-sensitiv und wird deshalb vermutlich durch einen klassischen JNK-c-JUN-Signalweg reguliert.

Zur Bestätigung wurden ausgewählte Ergebnisse der obigen *Microarray*-Analyse durch RT-PCR-Experimente nachuntersucht.

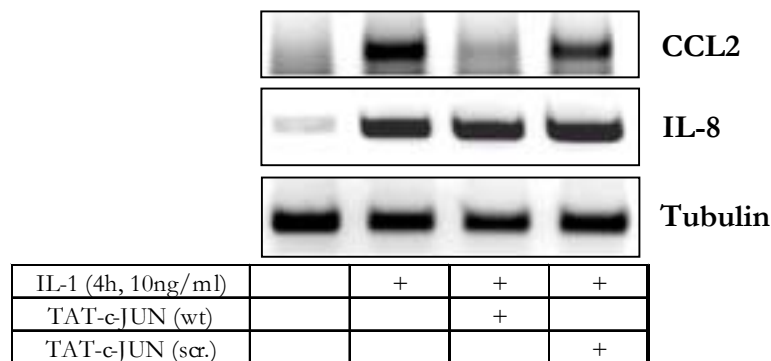


Abbildung 31: TAT-c-JUN (wt) hemmt die IL-1-induzierte mRNA-Expression von CCL-2 aber nicht von IL-8

Primäre Zahnfleischfibroblasten wurden, wie in der Legende zu den *Microarray*-Daten beschrieben (TAB.4), behandelt. Die Detektion der mRNA für CCL2, IL-8 und Tubulin in derselben RNA, die auch für die *Microarray*-Versuche eingesetzt wurde, erfolgte durch RT-PCR.

Ergänzend zu den Daten der *Microarrays* konnte die ca. 90%ige Hemmung der IL-1-induzierten CCL2-mRNA-Expression sowie die ausbleibende Hemmung der IL-8-mRNA-Expression durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid in der oben vorgestellten RT-PCR bestätigt werden. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um Artefakte aus der *Arrayanalyse* handelt. Auf die Bedeutung und eine mögliche Erklärungen für diesen Befund wird in der Diskussion eingegangen.

3.2.4 Bestätigung der durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid hervorgerufenen Phänotypen in HeLa- und HuGi-Zellen mittels siRNAs gegen c-JUN

Um die biologischen Funktionen von c-JUN, wie sie durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid offengelegt wurden, zu bestätigen, wurde ein alternativer experimenteller Ansatz gewählt. Zu diesem Zweck wurden durch siRNA-Moleküle in HeLa- und HuGi-Zellen transiente c-JUN-*knock downs* etabliert und der beobachtete Phänotyp mit dem nach TAT-c-JUN (wt)-Behandlung verglichen.

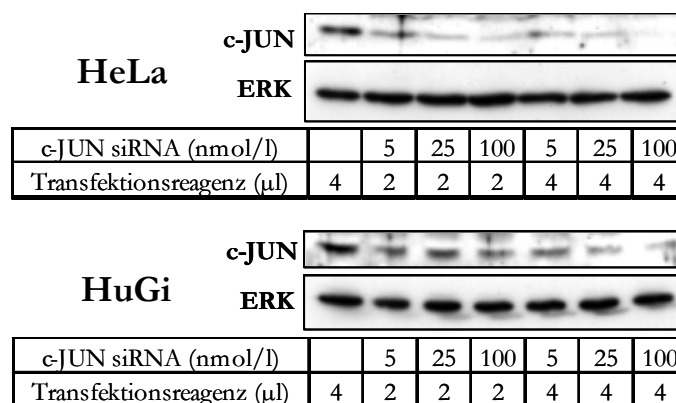


Abbildung 32: Optimierung der Transfektionsbedingungen zur Etablierung eines transienten c-JUN-*knock downs* in HeLa- und HuGi-Zellen

HeLa- und HuGi-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag mit den angegebenen Konzentrationen (final im Medium) an c-JUN-siRNA-Molekülen mit unterschiedlichen Mengen an TransIT-TKO transfiziert. Die Zellen wurden für weitere 48h kultiviert, und im Anschluss erfolgte die Detektion von c-JUN und ERK im Westernblot.

Es wurden c-JUN-siRNA-Moleküle der Firma Dharmacon eingesetzt (siRNA SMARTpool c-JUN). Sowohl in der Zelllinie HeLa als auch in den primären Zahnfleischfibroblasten HuGi konnten die endogenen Proteinmengen von c-JUN durch Transfektion von siRNA-Molekülen abgesenkt werden. Die densitometrische Auswertung der Expositionen der Westernblots ergab, dass bei der jeweils höchsten siRNA-Konzentration kombiniert mit dem höchsten Volumen an

Transfektionsreagenz in HeLa-Zellen ein ca. 80%iger *knock down*, in HuGi-Zellen ein ca. 70%iger *knock down* beobachtet wurde. Die Spezifität dieses Ansatzes zeigt sich in der Tatsache, dass die Expression der Proteinkinase ERK nicht herabgesetzt wurde. Es erfolgte daher die Analyse der Phänotypen dieser Zellen.

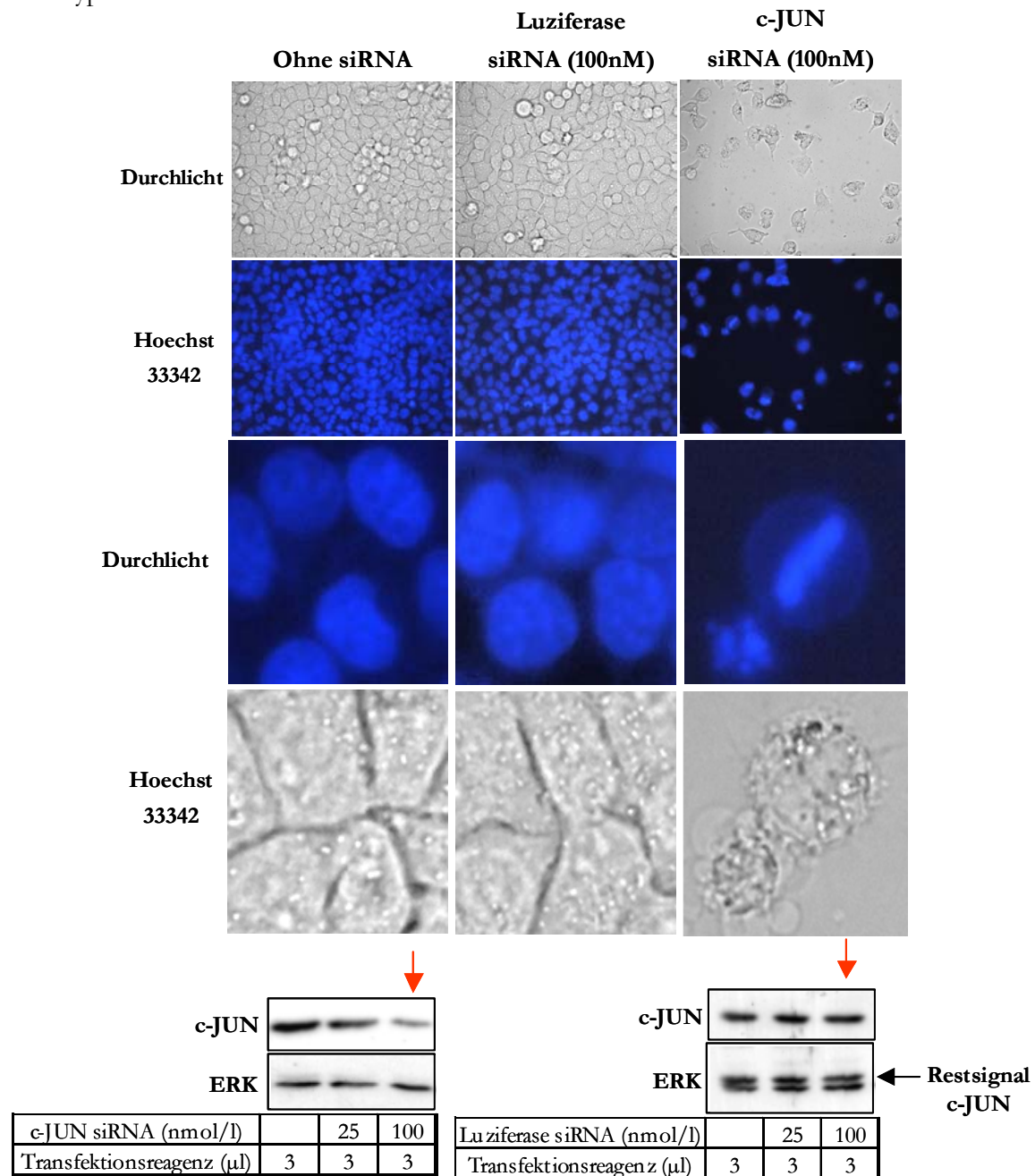


Abbildung 33: Die Absenkung endogener c-JUN-Proteinmengen in HeLa-Zellen durch siRNA-Moleküle induziert Apoptose

HeLa-Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag mit den angegebenen Konzentrationen an siRNA-Molekülen gegen c-JUN oder Luziferase mit 3µl Oligofectamine transfiziert. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Menge an Oligofectamine aber ohne siRNA-Moleküle behandelt. Nach 48h erfolgte die Dokumentation der Zellmorphologie und des Chromatinzustandes. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Menge an endogenem c-JUN und ERK im Westernblot analysiert.

Anmerkung: Die Doppelbande auf dem mit dem ERK-Antikörper entwickelten Westernblot der mit Luziferase-siRNA transfizierten Zellen resultiert aus dem Restsignal der Inkubation mit dem c-JUN-Antikörper auf der gleichen Membran.

Da in initialen Experimenten mit dem Transfektionsreagenz TransIT-TKO, wie es Abb.32 verwendet wurde, eine partielle Toxizität in HeLa-Zellen festgestellt wurde, wurde für die Folgeexperimente in HeLa-Zellen das Transfektionsreagenz Oligofectamine eingesetzt, welches keine toxischen Effekte aufweist. Ebenso hatte die Transfektion von Luziferase-siRNA-Molekülen keinen negativen Einfluss auf das Überleben von HeLa-Zellen. Wurden HeLa-Zellen hingegen mit c-Jun-siRNA-Molekülen transfiziert, so führte dieses bei einer Konzentration von 100nmol/l zu einer verlangsamten Proliferation und einem vermehrten Auftreten toter Zellen. Die Anfärbung des Chromatins dieser Zellen mit Hoechst 33342 zeigte, dass das Chromatin, wie es für apoptische Zellen charakteristisch ist, in einer Vielzahl der Zellen stark kondensiert und fragmentiert ist. Im Westernblot konnte dieses Zellsterben mit einer abgesenkten c-JUN-Menge in diesen Zellen in Zusammenhang gebracht werden, während Zellen, die mit den Luziferase-siRNA-Molekülen transfiziert wurden, keine veränderte c-JUN-Menge aufwiesen. Bei einer Konzentration von 25nmol/l der c-JUN-siRNA-Moleküle konnte kaum eine Absenkung der endogenen c-JUN-Proteinmenge im Westernblot detektiert werden. Entsprechend zeigten diese Zellen auch ein völlig normales Proliferationsverhalten (Fotos nicht gezeigt). Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass ein c-JUN-*knock down* in HeLa-Zellen den gleichen Phänotyp hervorruft, wie die Kultivierung dieser Zellen in Anwesenheit des TAT-c-JUN (wt) Peptides.

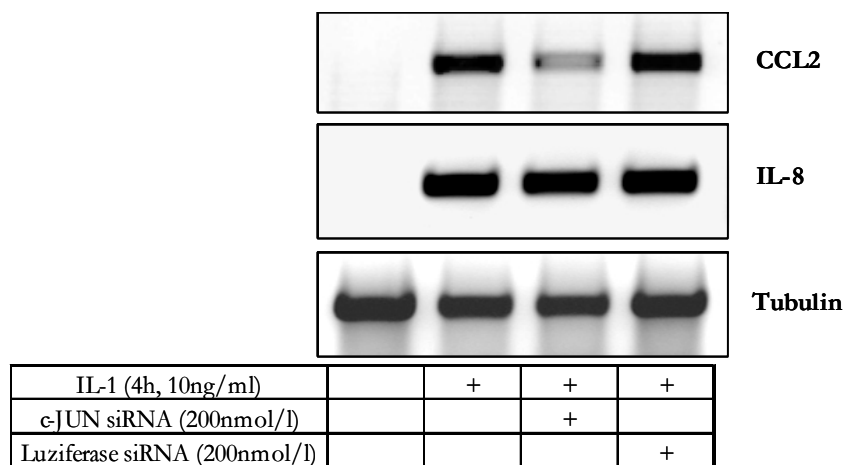


Abbildung 34: Die Absenkung endogener c-JUN-Proteinmengen in HuGi-Zellen durch siRNA-Moleküle hemmt die IL-1 induzierte CCL-2-mRNA-Expression

HuGi-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und am Folgetag mit 200nmol/l an siRNA-Molekülen gegen c-JUN oder Luziferase mit 4µl TransIT-TKO transfiziert. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Menge an TransIT-TKO aber ohne siRNA-Moleküle behandelt. Nach 48h erfolgte die Stimulation mit IL-1 wie angegeben und die Messung der CCL2-, IL-8- und Tubulin-mRNA durch RT-PCR.

HuGi-Zellen wurden mit den siRNA-Molekülen gegen c-JUN und als Kontrolle gegen Luziferase transfiziert. Die obige Abbildung zeigt, dass die Behandlung dieser Zellen mit den siRNA-

Molekülen gegen c-JUN zur Hemmung der IL-1-induzierten CCL-2-mRNA-Expression führt, die gleiche Beobachtung, die durch Vorinkubation von HuGi-Zellen mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid vor einer IL-1-Stimulation gemacht wurde.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass mit zwei komplementären Ansätzen, der Hemmung der c-JUN-JNK-Interaktion durch ein zellpermeables Peptid und Suppression von endogenem c-JUN durch RNAi, dem Transkriptionsfaktor c-JUN spezifische Funktionen bei der Zellproliferation und der Expression von entzündungsrelevanten Genen zugeordnet werden konnten.

3.3 Tandem affinity purification von JNK-TAPtag

Zur weiteren Aufklärung des JNK-Signalweges und zur Identifizierung JNK-bindener Proteine wurde ein alternativer experimenteller Ansatz gewählt. Zu diesem Zweck sollte ein Fusionsprotein aus JNK und dem TAPtag (*tandem affinity purification tag*) in Zellen exprimiert und über zwei aufeinanderfolgende Affinitätschromatographien aufgereinigt werden. Etwaige JNK-bindende Proteine können dann nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Hintergrundinformationen zur TAP-Methode sind dem "Material und Methoden"-Teil dieser Arbeit zu entnehmen.

Zunächst erfolgte die Klonierung der cDNA für die Isoform JNK2 α 2 in einen eukaryotischen Expressionsvektor. Dabei wurde ein regulierbares Expressionssystem (Wolter et al., 2002) gewählt, da dadurch die Möglichkeit gegeben ist, die Menge an überexprimiertem Protein zu kontrollieren. Dieses ist vor dem Hintergrund, dass stöchiometrische Verhältnisse einzelner Bindungspartner in einem Proteinkomplex wichtig sind, von besonderer Bedeutung. Das gewählte "pIND-System" erlaubt dabei die Expression eines Gens unter der Kontrolle eines Promotors, der nur nach Behandlung der Zellen mit einem Analogon eines Insektenhormons (hier Ponasteron) aktiviert wird. In Abwesenheit von Ponasteron findet dabei keine Transkription statt.

3.3.1 Klonierung des Vektors pIND-JNK2TAPtag

Im ersten Schritt wurde der Vektor pIND-LacZTAPtag, der als spätere Kontrolle und zur weiteren Klonierung des Vektors pIND-JNK2TAPtag diente, hergestellt. Die Strategien zur Generierung dieser beiden Vektoren ist den folgenden Abbildung zu entnehmen.

Zur Herstellung des Vektors pIND-LacZTAPtag wurde das TAPtag durch einen *EcoRI/XbaI*-Verdau aus pcDNA3C-TAPtag herausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pINDLacZ inseriert. Die Analyse bakterieller Einzelklone zeigt die erfolgreiche Klonierung, da bei einem *NheI*-Verdau der isolierten Plamid-DNA zwei Fragmente der erwarteten Größe erhalten wurden.

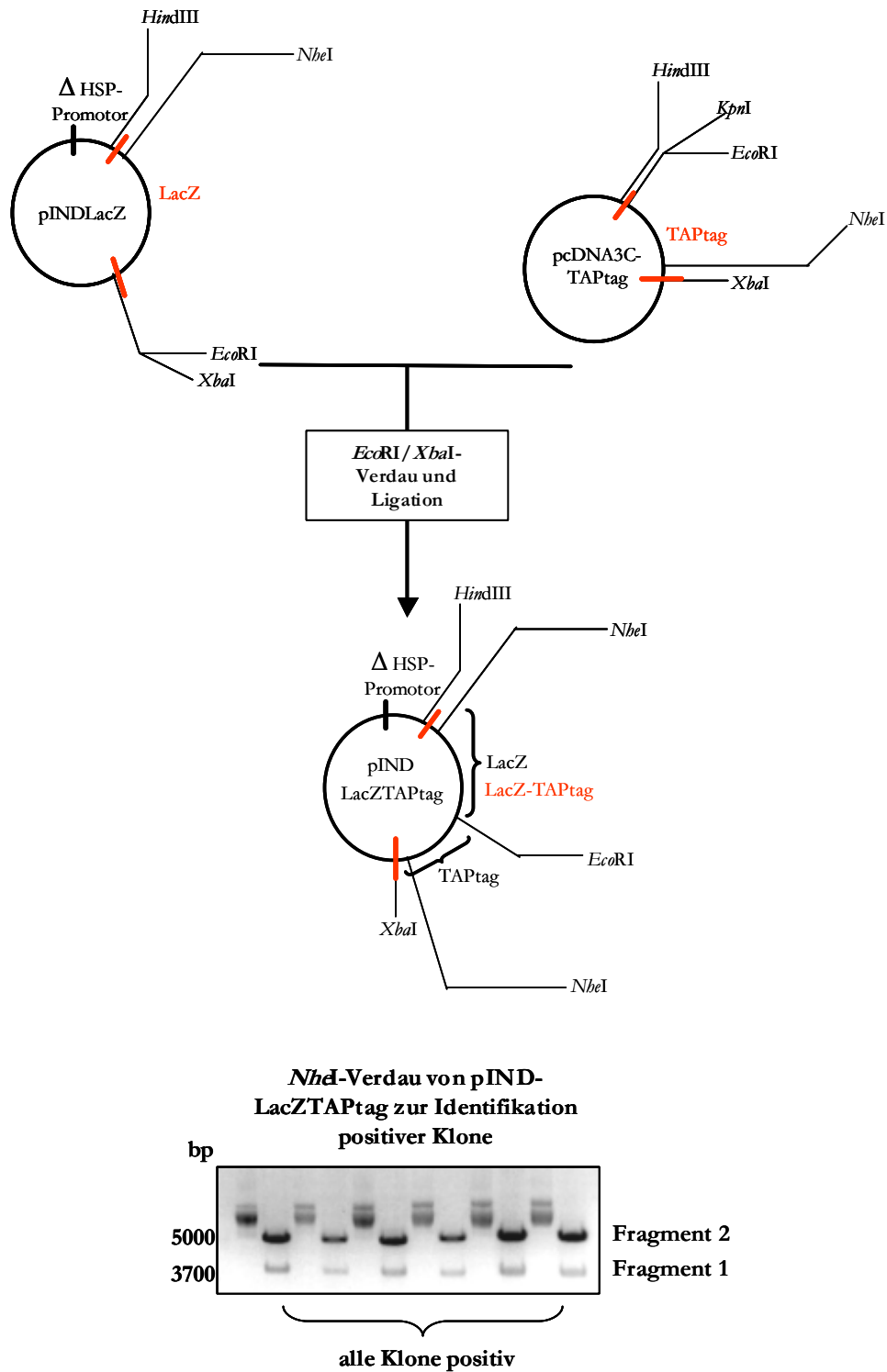


Abbildung 35: Umklonierung des TAPtag aus dem Vektor pcDNA3C-TAPtag in den Vektor pINDLacZ

Gezeigt ist die Strategie zur Herstellung des Vektors pIND-LacZTAPtag. Zur Beschreibung siehe Text. Zur Analyse der Klonierung wurden bakterielle Einzelklone auf antibiotikahaltigen Agarplatten über Nacht bei 37°C selektioniert und zum Beimpfen von 5ml Flüssigkulturen verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss mit *NheI* verdaut und auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt.

Zur Klonierung des Vektors pIND-JNK2TAPtag (vergl. folgende Seite) wurde die JNK2 α 2-Isoform zunächst durch PCR amplifiziert, wobei Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease

KpnI generiert wurden. Über eine Topo-Klonierung erfolgte die direkte Ligation in den Vektor pCR-Blunt II. pCR-Blunt II-JNK2 und pcDNA3C-TAPtag wurden mit *KpnI* verdaut und nach Ligation wurde der Vektor pcDNA3C-JNK2TAPtag erhalten. Erneuter Verdau dieses Konstruktes und des Vektors pIND-LacZTAPtag mit *HindIII/EcoRI* und Ligation führte schließlich zum Zielvektor pIND-JNK2TAPtag.

Die Konstruktion des Vektors pIND-LacZTAPtag war dabei nötig, da JNK2 eine *XbaI* Schnittstelle trägt und die cDNA für JNK2-TAPtag somit nicht direkt über einen *EcoRI/XbaI*-Verdau in pIND-LacZ hätte kloniert werden können.

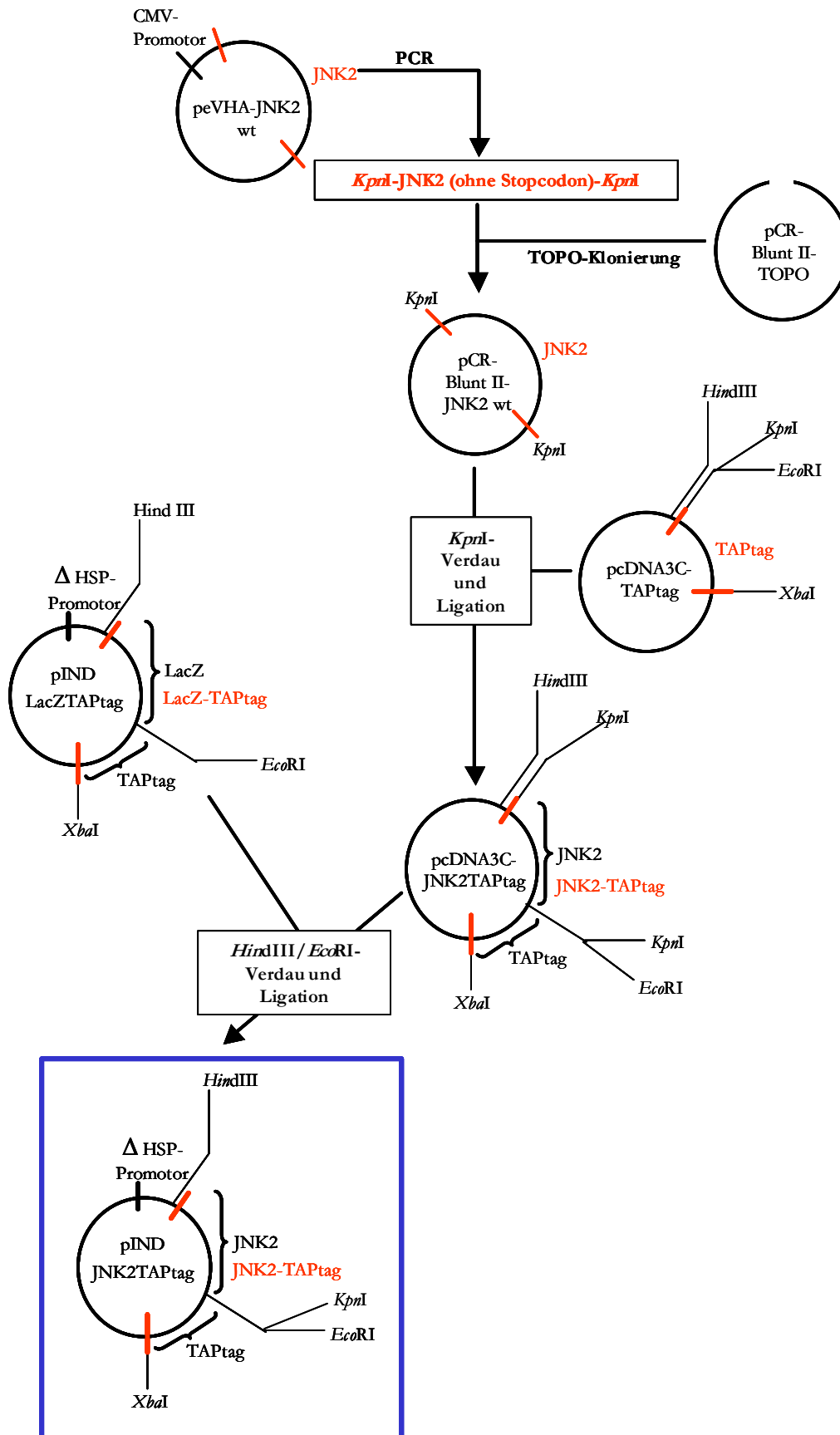


Abbildung 36: Strategie zur Klonierung des Vektors pIND-JNK2TAPtag

Gezeigt ist das Vorgehen bei der Herstellung des Vektors pIND-JNK2TAPtag. Zur Beschreibung siehe Text.

Die folgenden beiden Abbildungen fassen den Verlauf der Klonierung zusammen.

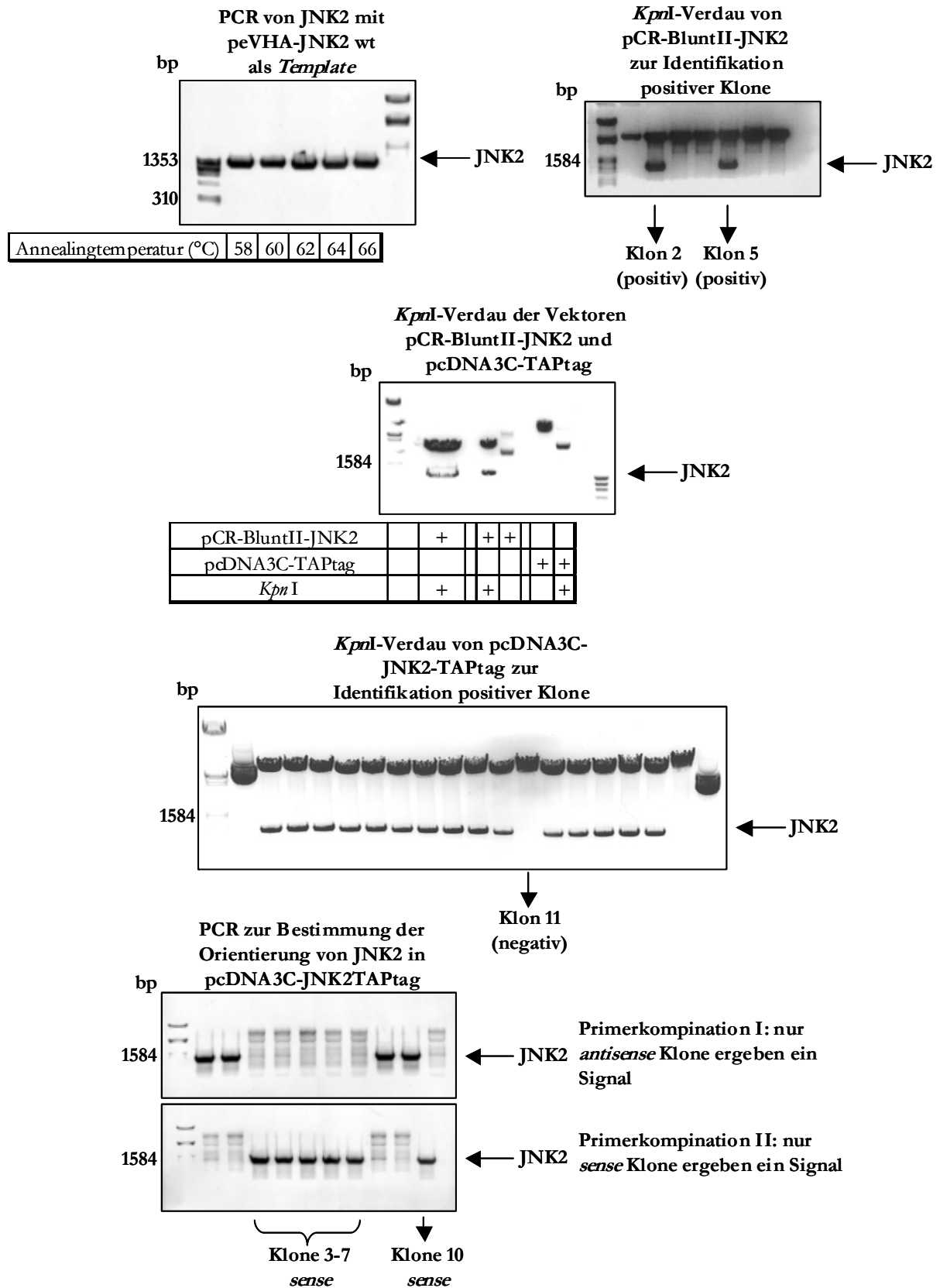


Abbildung 37: Herstellung des regulierbaren Expressionsvektors pIND-JNK2TAPtag (Teil I)

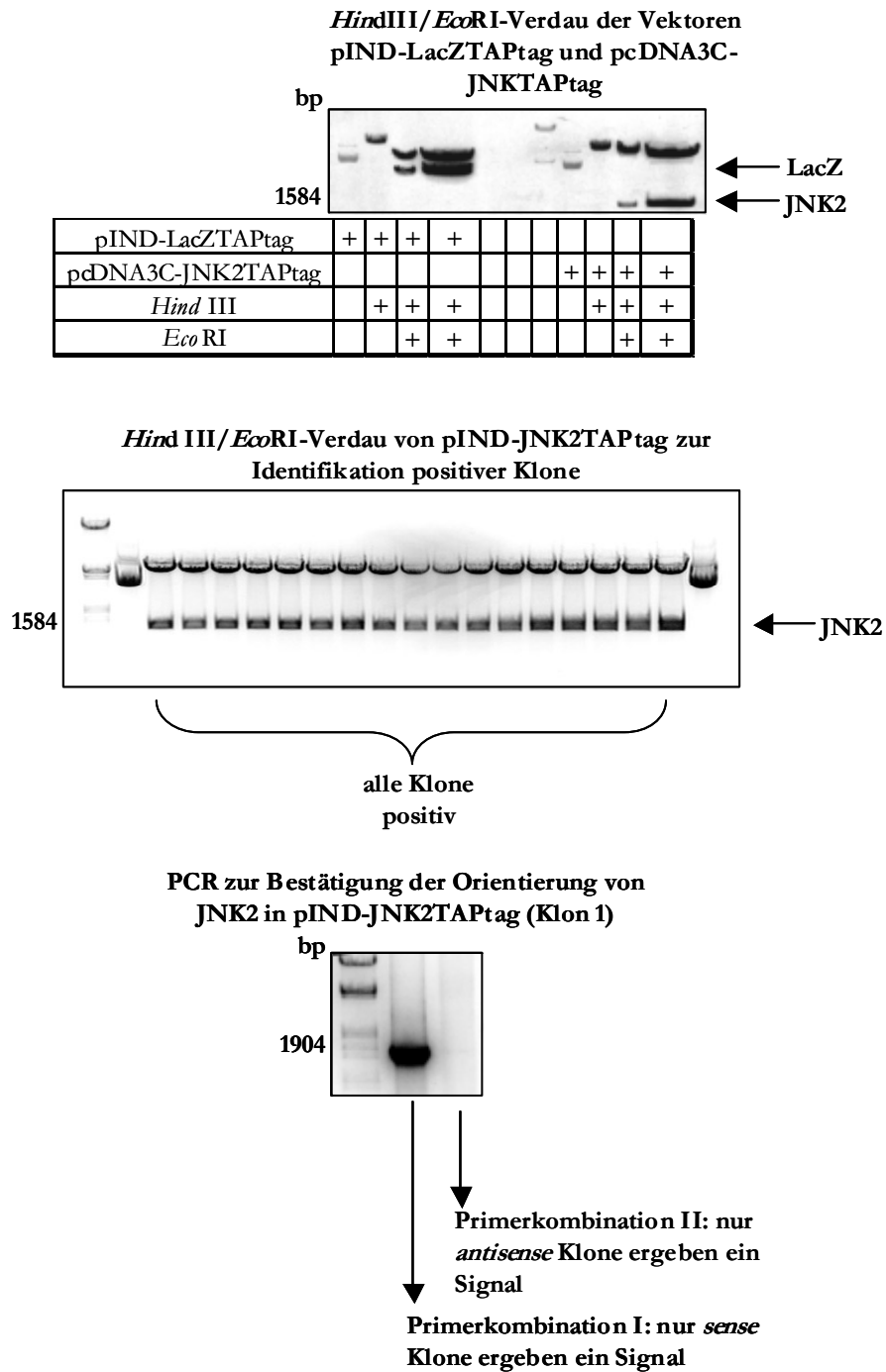


Abbildung 38: Herstellung des regulierbaren Expressionsvektors pIND-JNK2TAPtag (Teil II)

3.3.2 Ponasteron-induzierbare Expression des Fusionproteins JNK2-TAPtag

Ziel dieses Teilprojektes war die IL-1-abhängige Darstellung von JNK2-enhaltenen Proteinkomplexen. Für die Expression von JNK2-TAPtag war daher eine Zelllinie nötig, die den IL-1-Rezeptor exprimiert und zusätzlich als Antwort auf Ponasteron die Transkription vom minimalen Hitzeschock-Promotor (P Δ HSP) des pIND-Plasmides initiiert. Daher wurde die Zelllinie HEK293 IL-1R, welche stabil mit dem IL-1-Rezeptor transfiziert ist, zusätzlich stabil mit dem Plasmid pVgRXR transfiziert. Dieses trägt neben dem Gen für eine Variante des Ecdyson-Rezeptors (VgEcR) auch das Gen für das Säugerhomolog (RxR) des natürlichen Partners des Ecdyson-Rezeptors aus *Drosophila*. Durch Expression dieser beiden Proteine werden Zellen in die Lage versetzt, auf pIND-Plasmiden liegende Gene nach Ponasteroninduktion zu exprimieren.

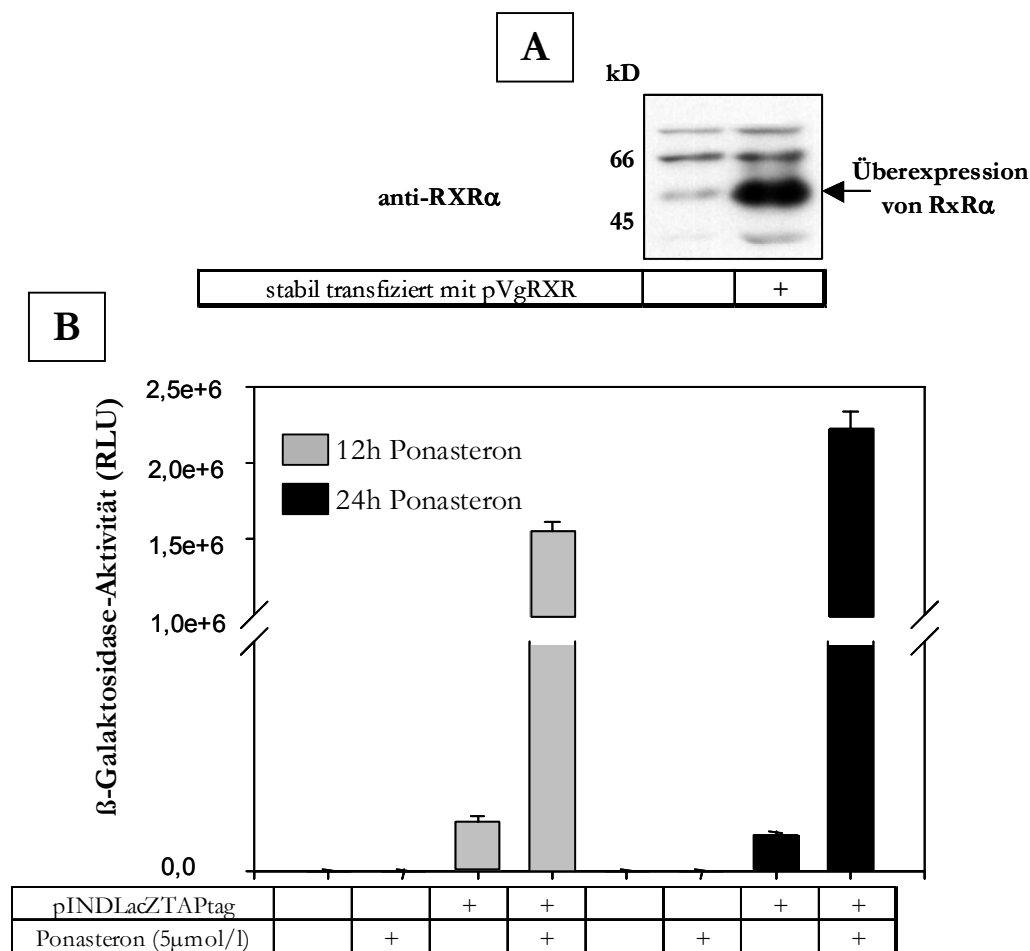


Abbildung 39: Stabile Transfektion der Zelllinie HEK293 IL-1R mit dem Plasmid pVgRXR

A: Die Zelllinie HEK293 IL-1R wurde wie beschrieben stabil mit dem Plasmid pVgRXR transfiziert. 100 μ g Zellextrakt wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und die RxxR α -Kette wurde im Westernblot detektiert.

B: Die Zelllinie HEK293 IL-1R/pVgRXR wurde transient mit 5 μ g/6-Loch mit dem Plasmid pIND-LacZTAPtag transfiziert und die Expression des Proteins β -Galaktosidase-TAPtag wurde durch 5 μ mol/l Ponasteron für 24h und

und 48h induziert. 100µg Zellextrakt wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, und die Detektion von JNK-TAPtag und endogenen JNK-Proteinen erfolgte im Westernblot.

B: Densitometrische Auswertung des Westernblots

Es ist eindeutig die Ponasteron-abhängige Expression des Proteins JNK-TAPtag sichtbar. Dabei ist die Expression nach 48h wie zu erwarten stärker als nach 24h, es konnte jedoch oberhalb von 2µmol/l keine Abhängigkeit der Expression von der Ponasteron-Konzentration festgestellt werden, so dass die folgenden Versuche zunächst mit 2µmol/l Ponasteron für 48h durchgeführt wurden. Die densitometrische Auswertung der Westernblot-Analyse ergab für diese Bedingung eine ca. 2,7fache Überexpression von JNK-TAPtag im Verhältnis zu den endogenen JNK-Proteinen, wobei die Signale für die beiden endogenen JNK-Formen aufsummiert wurden.

Da in der Arbeitsgruppe keine Erfahrungen mit der TAP-Methode vorlagen, wurde zunächst ein Protokoll zur Aufreinigung von JNK-TAPtag Fusionsproteinen etabliert. Dabei wurde das Zielprotein in den einzelnen Fraktionen mittels Westernblot über die Aufreinigung verfolgt.

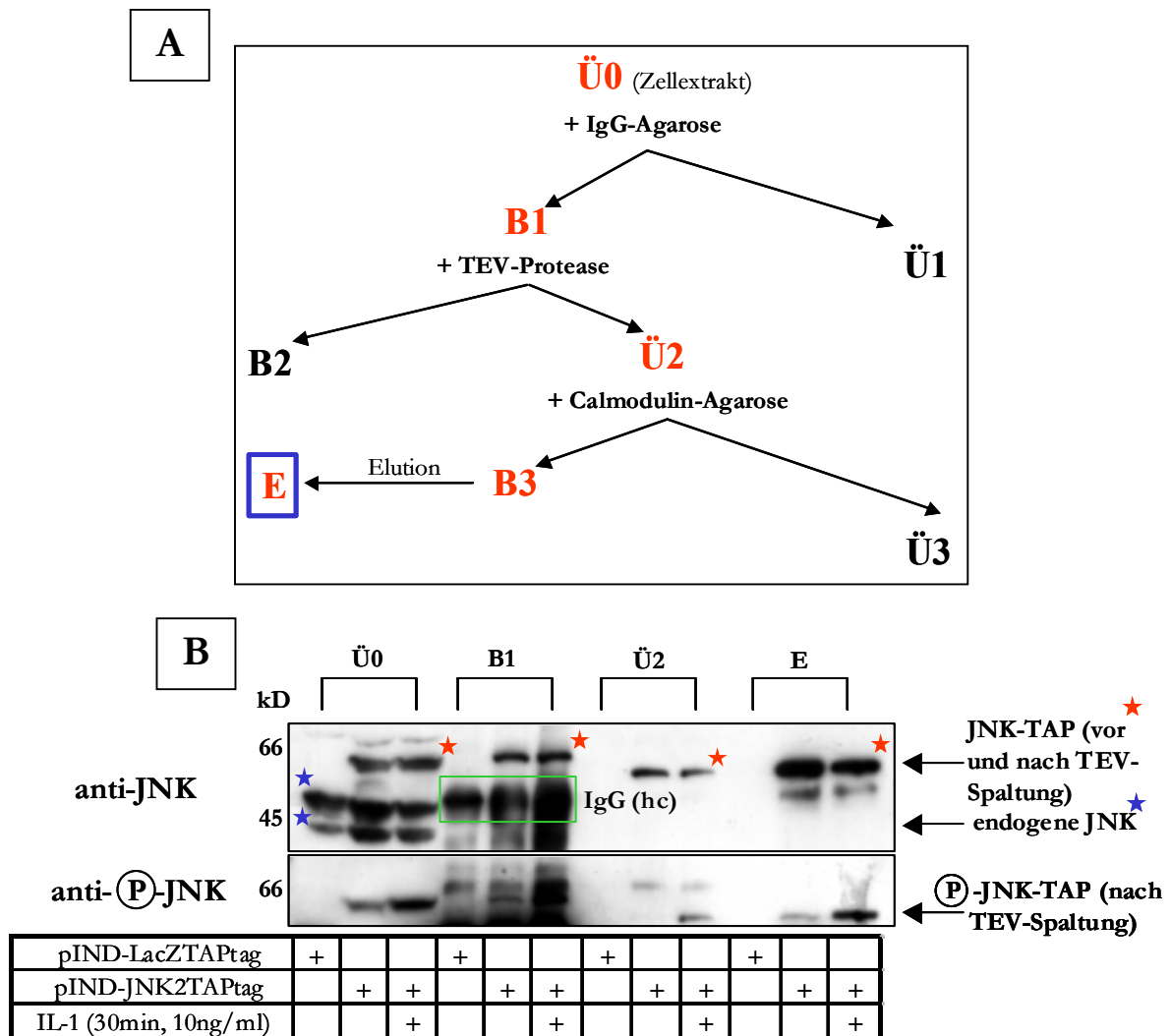


Abbildung 41: TAP-Aufreinigung des Fusionsproteins JNK-TAP

A: Vorgehensweise bei der Aufreinigung von TAPtag-Fusionsproteinen; Rot = Fraktionen, die das TAPtag-Fusionsprotein enthalten.

B: Je vier 75cm²-Flaschen wurden mit jeweils 35µg der Expressionsplasmide transfiziert und für 48h mit 2µmol/l Ponasteron kultiviert. Die Stimulation mit IL-1 erfolgte wie aufgeführt. Im Anschluss wurde die TAP-Aufreinigung vollständig durchlaufen und 1/10 jeder Fraktion wurde im Westernblot auf die Anwesenheit von JNK-TAPtag und phospho-JNK-TAPtag geprüft.

rote Sterne: JNK-TAP

blaue Sterne: endogene JNK-Proteine

grüner Rahmen: schwere Kette (hc = *heavy chain*) der Immunglobuline von der IgG-Agarose (vergl. Text)

Zur besseren Orientierung wurde die Aufreinigung in einem Fließdiagramm zusammengefaßt. Die Aufreinigung erfolgte auf der Basis veröffentlichter Arbeiten (Cox et al., 2002b), jedoch wurden einige Variationen vorgenommen. So wurde z.B. zum Erhalt von Proteinkomplexen ein Lysepuffer mit sehr geringen Detergenzkonzentrationen gewählt, und der Zellaufbruch wurde durch Scherkräfte vervollständigt. Die genaue Vorgehensweise ist im "Material und Methoden"-Teil dargestellt.

Das Zielprotein JNK-TAPtag lässt sich, wie die Westernblot-Analyse zeigt, über die gesamte Aufreinigung verfolgen, wobei die Kontrolle mit dem Konstrukt pIND-LacZTAPtag (kodiert für β-Galaktosidase-TAPtag) die Spezifität zeigt. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass sich selbst phosphoryliertes JNK-TAPtag aufreinigen lässt, die Phosphorylierung von JNK nach IL-1-Stimulation also konserviert werden kann. Dieses verdeutlicht den großen Vorteil des TAP-Ansatzes, da sich Proteinmodifikationen und enzymatische Aktivitäten durch diese Aufreinigung erhalten lassen und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, Bindungspartner eines bestimmten Proteins zu isolieren, deren Wechselwirkungen von eben solchen Modifikationen abhängen.

Die Betrachtung der einzelnen Fraktionen bei dieser Analyse zeigt das erwartete Bandenmuster, so wird das Protein JNK-TAPtag nach Abspaltung von den IgG-Kügelchen (von B1 zu Ü2) um ca. 7kD kleiner. Die starke unspezifische Bindung in den Bahnen, in denen B1 aufgetragen wurde, resultiert aus der Bindung des verwendeten anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers an die Immunglobuline der Kaninchen-IgG-Agarose. Da die Membran zunächst mit einem Antikörper gegen unphosphoryliertes JNK und erst im zweiten Schritt mit einem Antikörper gegen phospho-JNK inkubiert wurde, sind in Ü0 und E noch schwache Signale auch in den nicht IL-1-stimulierten Ansätzen sichtbar.

3.3.3 Identifikation JNK-TAPtag bindener Proteine

Um das Potential dieses Ansatzes abschätzen zu können, wurde nach Etablierung eines TAP-Aufreinigungsprotokolls im analytischen Maßstab nach koeludierenden Bindungspartnern von JNK-TAPtag gesucht. Zu diesem Zweck sollte die Kinase-Aktivität von JNK ausgenutzt werden. Da im letzten Schritt der Aufreinigung phosphoryliertes JNK-TAPtag isoliert werden konnte, wurde zunächst überprüft, ob dieses Protein tatsächlich noch enzymatische Aktivität besitzt.

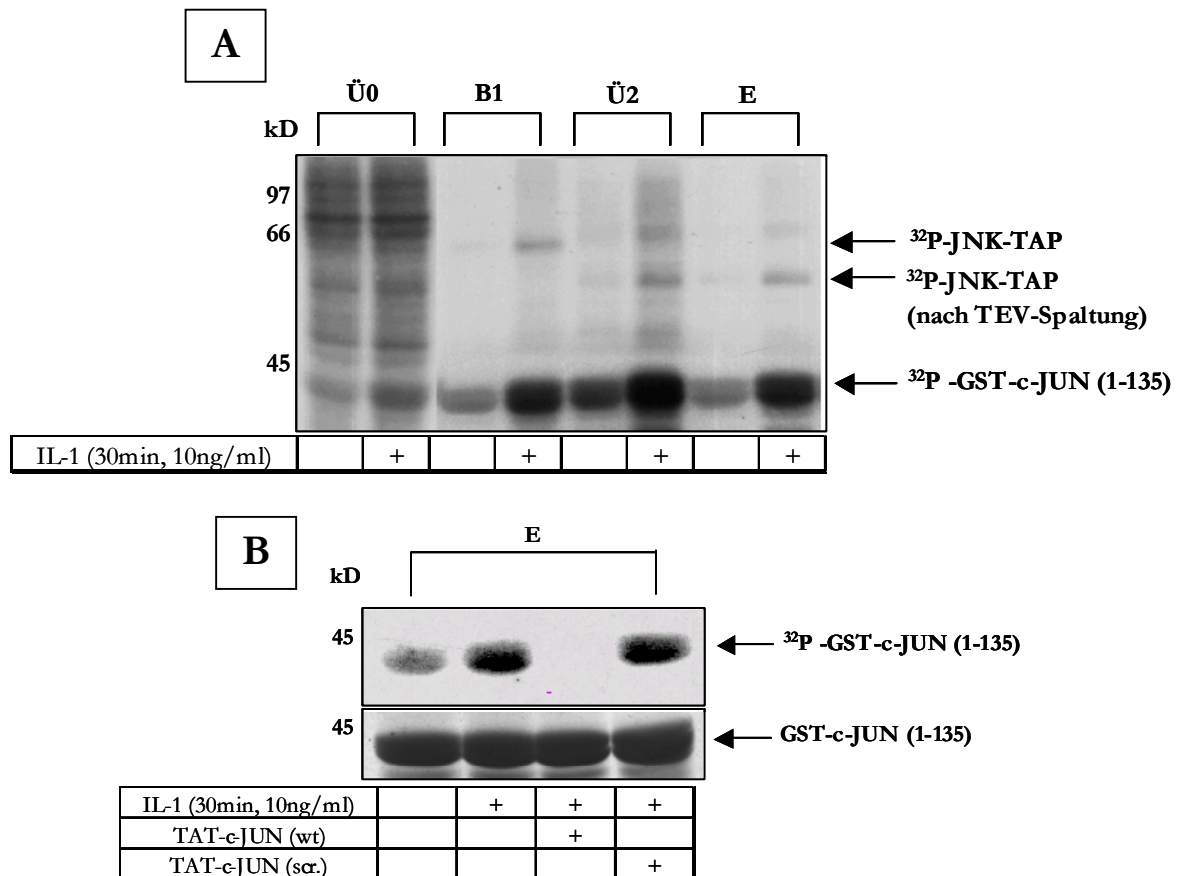


Abbildung 42: Phosphorylierung von GST-c-JUN (1-135) durch enzymatisch aktives JNK-TAPtag

A: Acht 75cm²-Flaschen wurden mit jeweils 35µg pIND-JNK2TAPtag transfiziert und für 48h mit 2µmol/l Ponasteron kultiviert. Vier Flaschen wurden mit IL-1 stimuliert. Im Anschluss wurde die TAP-Aufreinigung vollständig durchlaufen und 1/10 jeder Fraktion wurde für einen *in vitro* Kinase-Versuch mit exogen zugesetztem GST-c-JUN (1-135) eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Detektion von phosphoryliertem GST-c-JUN (1-135) mittels Autoradiographie des getrockneten Geles.

B: Es wurde analog zu A verfahren. Das Eluat wurde jedoch zunächst für 10min bei RT mit 66µmol/l der Peptide bzw. nur mit Lösungsmittel inkubiert und erst im Anschluss zum Kinase-Versuch eingesetzt.

Die TAP-Aufreinigung wurde mit Material von unstimulierten sowie für 30min mit IL-1 stimulierten Zellen wie beschrieben durchlaufen und von jeder Fraktion wurde 1/10 des Volumens für einen Kinase-Versuch mit rekombinant hergestellten GST-c-JUN (1-135) als Substrat eingesetzt (vgl. 3.15.3.2.2). Während im Ausgangslysat Ü0 nur eine schwache Phosphorylierung von GST-c-JUN (1-135) detektiert werden konnte, wird GST-c-JUN (1-135) nach Affinitätschromatographie von aktivierter JNK-TAPtag mit jeder der Fraktionen deutlich IL-1-abhängig phosphoryliert. Darüberhinaus lässt sich die JNK-Autophosphorylierung

erkennen, so dass gefolgert werden kann, dass die Aktivierung von JNK-TAPtag nach IL-1-Stimulation über das gesamte Aufreinigungsschema erhalten bleibt. Entsprechend lässt sich die Phosphorylierung von GST-c-JUN (1-135) durch das Eluat der TAP-Aufreinigung spezifisch zu 100% durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid hemmen, während das TAT-c-JUN (scr.) Peptid keinen Einfluss hat.

In der Folge wurden daher zwei Kriterien zur Evaluation des TAP-Systems erhoben. Falls es mit dieser Methode möglich ist, JNK-TAPtag-bindende Proteine zu identifizieren, sollten diese für den Fall, dass es sich um JNK-Substrate handelt, IL-1 abhängig phosphorylierbar sein und zweitens sollte ihre Phosphorylierung mit Hilfe des niedermolekularen JNK-Inhibitors SP600125 aufgehoben werden können.

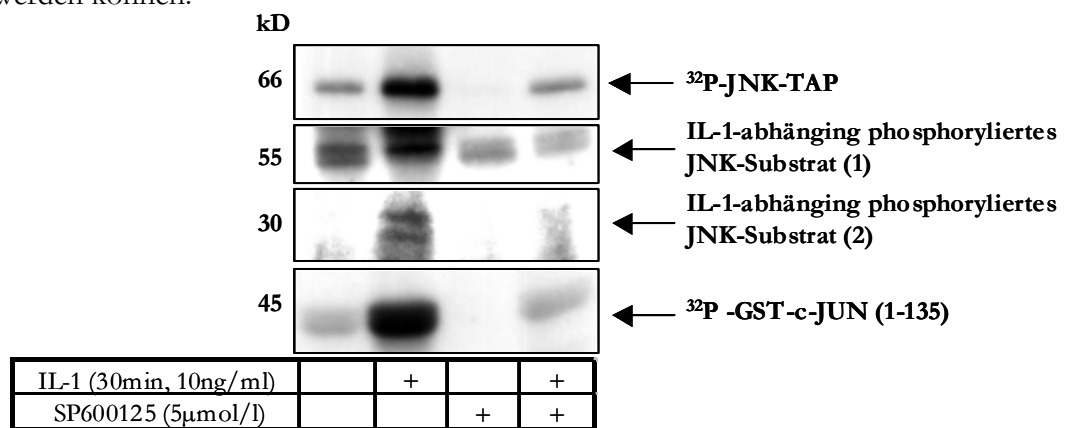


Abbildung 43: IL-1-abhängige Phosphorylierung koeluerter JNK-TAPtag Substrate

20 75cm²-Flaschen wurden mit jeweils 35µg pIND-JNK2TAPtag transfiziert und für 48h mit 2µmol/l Ponasteron kultiviert. 10 Flaschen wurden mit IL-1 stimuliert. Im Anschluss wurde die TAP-Aufreinigung vollständig durchlaufen, und 100µl Eluat/10 Flaschen wurden gewonnen. 50µl wurden jeweils für 10min bei RT mit 5µmol/l SP600125 oder nur mit Lösemittel inkubiert. 1µl wurde für die Kinase-Reaktion mit zugesetztem GST-c-JUN (1-135) verwendet, die restlichen 49µl wurden direkt ohne exogenes Substrat für den Kinase-Versuch eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Detektion phosphorylierter Proteine mittels Autoradiographie des getrockneten Geles.

Der oberste Teil der Abbildung zeigt die IL-1-abhängige Aktivierung von JNK-TAPtag im Eluat der TAP-Aufreinigung durch Autophosphorylierung, die durch den JNK-Inhibitor bis auf das unstimulierte Niveau abgesenkt werden kann. Auch die basale JNK-Autophosphorylierungsaktivität wird durch SP600125 gehemmt. Zwei Substrate von JNK-TAPtag konnten durch diese Methode im Eluat detektiert werden, das Erste mit einem Molekulargewicht von ca. 55kD, das Zweite mit einem Molekulargewicht von ca. 30kD. Das erste Substrat wird bereits im unstimulierten Zustand durch JNK-TAPtag phosphoryliert, zeigt jedoch nach Aktivierung von JNK-TAPtag durch IL-1 eine deutliche Verschiebung zu höheren Molekulargewichten, was ein Indiz für eine Hyperphosphorylierung darstellt. Sowohl die basale Phosphorylierung als auch die Hyperphosphorylierung sind durch SP600125 nahezu komplett hemmbar. Das zweite Substrat wird ausschließlich IL-1-abhängig durch JNK-TAPtag phosphoryliert, wobei zwei phospho-Formen auftreten. Auch diese sind vollständig durch den

JNK-Inhibitor hemmbar. Als Kontrolle diente die Phosphorylierung des exogen zugesetzten Substrates GST-c-JUN (1-135), die sich identisch zu den endogenen JNK-Substraten verhält. Ein weiteres Indiz dafür, dass diese Methode tatsächlich zur Isolierung JNK-bindener Proteine geeignet ist, wurde durch Bindung eines exogen zugesetzten Partners und dessen anschließende Koelution mit JNK-TAPtag erhalten.

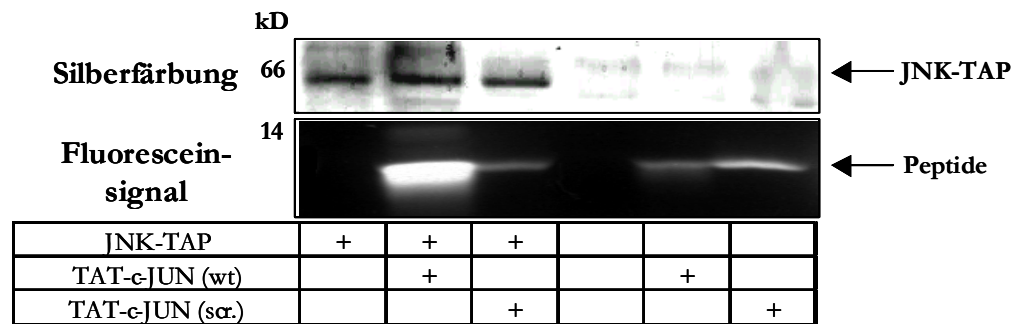


Abbildung 44: Nachweis der direkten Bindung des TAT-c-JUN (wt) Peptides an JNK-TAPtag

Vier 75cm²-Flaschen wurden mit jeweils 35µg pIND-JNK2TAPtag transfiziert und für 48h mit 2µmol/l Ponasteron kultiviert. Im Anschluss wurde die TAP-Aufreinigung vollständig durchlaufen, allerdings wurde die Calmodulin-Matrix vor der Elution in drei Aliquots aufgeteilt und für 30min bei RT mit 200µmol/l der Peptide bzw. nur mit Lösungsmittel inkubiert. Nachdem die Ansätze extensiv mit Calmodulin-Binde-Puffer gewaschen wurden, erfolgte die Elution nach Protokoll und die Eluate wurden auf einem Tricine-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Fluorescein-markierten Peptide erfolgte vor der Silberfärbung des Geles durch Aufnahme eines Fotos unter UV-Licht.

Durch eine Silberfärbung konnte im oberen Teil der Abbildung das aufgereinigte JNK-TAPtag eindeutig im Eluat der TAP-Aufreinigung detektiert werden. Da sich die TAT-c-JUN Peptide nur schlecht mit Silber anfärben lassen, wurden diese über ihre N-terminale Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein vor der Silberfärbung des Gels detektiert. Dieser experimentelle Ansatz verdeutlicht, dass das TAT-c-JUN (wt)-Peptid direkt an JNK bzw. JNK-TAPtag bindet und mit dieser von der Calmodulin-Matrix eluiert werden kann. TAT-c-JUN (scr.) bindet hingegen nur im geringen Maße unspezifisch an die Calmodulin-Agarosekügelchen, wie die Ansätze ohne JNK-TAPtag zeigen, nicht jedoch an JNK direkt.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass dieser experimentelle Ansatz aufgrund der oben vorgestellten Ergebnisse ein vielversprechendes Vorgehen zur Isolierung JNK-bindener Proteine bzw. von Proteinkomplexen allgemein darstellt. Nach diesen analytischen Versuchen wurde deshalb ein präparativer Ansatz vorgenommen, bei dem die 20-fache Zellmenge im Vergleich zu Abb.43 verwendet wurde, um sequenzierbare Proteinmengen isolieren zu können. Dazu wurden die Zellen aus 100 75cm²-Flasche wie beschrieben aufgearbeitet und das Eluat gelektrophoretisch aufgetrennt.

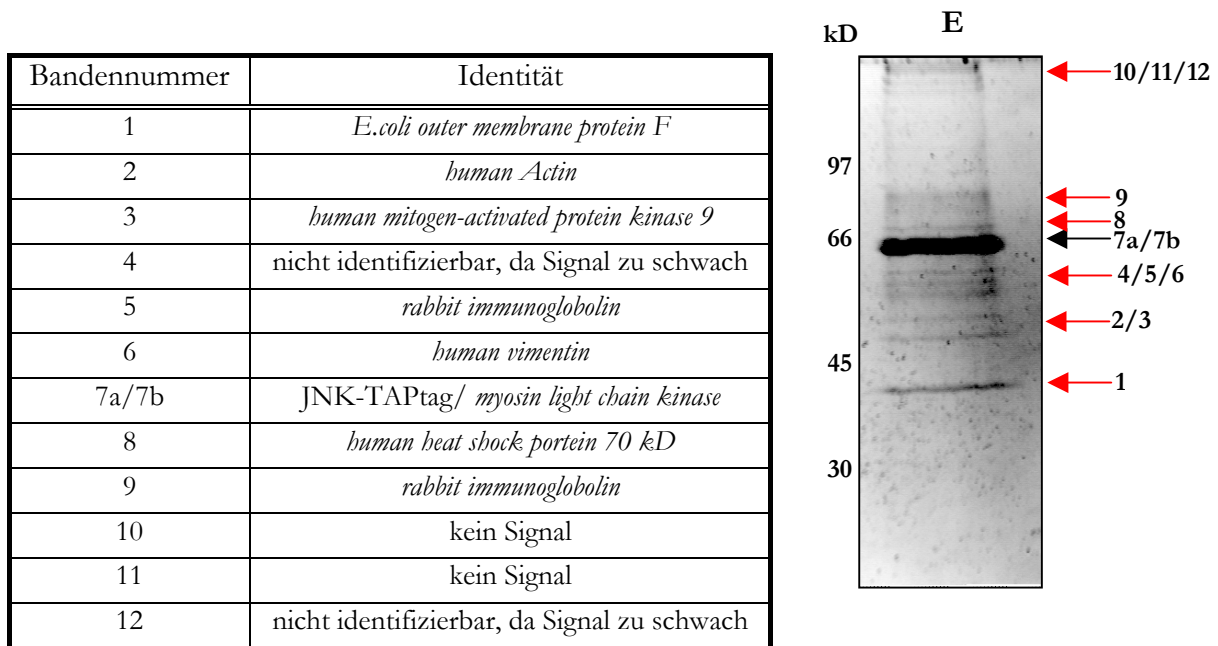


Abbildung 45: Präparativer JNK-TAP-Ansatz

100 75cm²-Flaschen wurden mit jeweils 35µg pIND-JNK2TAPtag transfiziert und für 48h mit 2µmol/l Ponasteron kultiviert. Die TAP-Aufreinigung wurde vollständig durchlaufen, und es wurden 500µl Eluat gewonnen, die in einer Vakuum-Zentrifuge auf ca. 90µl eingengt wurden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem 10% PAA-Gel wurde dieses mit SYPRO Ruby gefärbt, und unter UV-Licht sichtbare Proteinbanden wurden ausgeschnitten. Die restliche Gelbahn wurde in gleichgroße Gelstücke zerteilt.

Die Ermittlung der Peptidmassen und die Identifikation der Proteine erfolgte durch Dr. Robin Wait vom *Kennedy Institute of Rheumatology Division* in London. Zu diesem Zweck wurden die durch SYPRO Ruby anfärbbaren Proteinbanden ausgeschnitten und der Rest der Gelspur in Streifen geschnitten. Von den sichtbaren Proteinbanden konnten acht identifiziert werden, von zwei Banden wurde in der Massenspektrometrie kein Signal erhalten, zwei weitere Banden ergaben zu schwache Signale zur Identifikation. Die Gelstücke, die keine sichtbaren Proteinbanden enthielten, lieferten keine Sequenzinformation, lediglich aus vier Proteinbanden wurden Signale erhalten, die jedoch wiederum zu schwach waren, um zur Proteinidentifikation herangezogen werden zu werden.

Erwartungsgemäß entsprach die stärkste Bande bei ca. 60kD dem Fängerprotein JNK-TAPtag. Diese Proteinbande enthielt auch ein Peptid der *myosin light chain kinase*, welches eine Sequenz aus der TAP-Kassette repräsentiert, da das Calmodulin-bindene Peptid aus dieser Kinase abgeleitet wurde.

Desweiteren wurden Zytoskelettproteine wie Aktin und Vimentin identifiziert, die vermutlich lediglich Verunreinigungen darstellen. Auch die beiden nicht-humanen Proteine *E.coli outer membrane protein F* (Bande 1) und die Proteinfragmente von Immunglobolinen aus dem Kaninchen (Banden 5 und 9) stellen wahrscheinlich Kontaminationen aus der TEV-Präparation, die rekombinant hergestellt wurde und von der IgG-Agarose dar. Die zwei verbleibenden Proteine sind die *human mitogen-activated protein kinase 9* (Bande 3), bei der es sich um JNK handelt und das Hitzeshockprotein HSP 70 (Bande 8). Die Bindung von JNK-TAPtag an HSP70 könnte aus der Überexpression des Fusionsproteines herrühren, jedoch existieren auch Evidenzen für eine

biologische Funktion von HSP70 bei der Regulation von MAP-Kinasen. Bande 3 hingegen könnte ein Fragment von JNK-TAPtag sein oder eine endogene JNK-Isoform, die mit JNK-TAPtag interagiert. Auf die Bedeutung dieser Befunde wird in der Diskussion eingegangen.

4 Diskussion

Entsprechend den methodischen Ansätzen, die in dieser Arbeit zur Manipulation und Aufklärung JNK-vermittelter Signaltransduktion verfolgt wurden, wird sich die Diskussion in zwei Hauptabschnitte aufteilen. Der erste Teil wird sich mit der Bewertung der Technik der Zelltransduktion mittels kleiner Internalisierungssequenzen beschäftigen und deren Limitationen und Möglichkeiten vor dem Hintergrund der hier gewonnen Erkenntnisse mit dem rekombinant hergestellten TAB1-Peptid sowie dem synthetisch hergestellten c-JUN-Peptid aufzeigen. Der zweite Abschnitt wird der Bewertung der Ergebnisse der Methode der *tandem affinity purification* zur Darstellung von Proteinkomplexen dienen.

4.1 Erhöhung der Biopermeabilität geladener Makromoleküle mit Hilfe von Peptid-Internalisierungssequenzen

Geladene Makromoleküle wie z.B. DNA, RNA oder Peptide und größere Proteine können die Lipiddoppelschicht der Membran von Zellen nicht frei passieren. Für viele Fragestellungen in der Forschung aber auch bei der Verwendung dieser Moleküle als therapeutische Strukturen zur Behandlung von Erkrankungen stellt dieser Mangel an Biopermeabilität eine große Hürde dar. Daher wurden eine große Anzahl verschiedener Techniken entwickelt, um z.B. Nukleinsäuren in Zellen einzubringen, wie die Liposomen-vermittelte Transfektion von DNA oder die Elektroporation von Zellen. Eine Methode, die die direkte Aufnahme von Proteinen in Zellen ermöglicht, würde in diesem Zusammenhang einen großen Fortschritt darstellen und die Nutzbarkeit von Proteinen als molekulare Werkzeuge erheblich verbessern. Die Entdeckung kleiner, etwa 10 Aminosäuren langer Peptidsequenzen, die in der Lage sind, die Zellmembran praktisch frei zu passieren, hat deshalb großes Interesse geweckt. Besonders ihre Fähigkeit, nach Fusion an andere geladene Makromoleküle deren Translokation in Zellen zu vermitteln, ist besonders beeindruckend. In dieser Arbeit wurde diese Methode daher in zwei alternativen Ansätzen zur Manipulation von Signaltransduktionswegen verwendet. Zum einen wurde versucht, durch rekombinante Expression in Bakterien ein Protein herzustellen, welches mit TAK1-abhängiger Signalweiterleitung interferieren kann. Zum anderen wurde die Signalkaskade auf der Ebene der MAP-Kinase JNK mit Hilfe eines synthetischen c-JUN-Peptides unterbrochen. Dabei wurden solche Signalkomplexe ausgewählt, die zum einen gut charakterisiert und bei denen die Interaktionsdomänen der beteiligten Partner eingegrenzt und bekannt sind. Zudem sind beide Komplexe Bestandteile des gleichen Signalweges, wobei der TAK1-TAB1-Komplex oberhalb des c-JUN-JNK-Komplexes angeordnet ist.

4.1.1 Evaluierung der Internalisierung rekombinant hergestellter ANTP-Fusionsproteine

Die MAP-3-Kinase TAK1 ist für ihre Aktivierung auf das Adaptorprotein TAB1 angewiesen. Die *docking site* von TAB1 an TAK1 sollte daher dazu eingesetzt werden können, um die Bildung des endogenen TAK1-TAB1-Komplexes zu stören. Sakurai et al. konnten zeigen, dass der C-Terminus (Aminosäuren 437-504) für die Bindung und Aktivierung von TAK1 verantwortlich ist (Sakurai et al., 2000; Sakurai et al., 2002). Wie in Abb.7 sichtbar führt die ektopische Überexpression von TAB1 oder TAB1-Deletionsmutanten zur Hemmung TAK1-abhängiger Signaltransduktion, so dass die letzten 68 Aminosäuren von TAB1 zur Herstellung eines rekombinanten, zellpermeablen Proteins herangezogen wurden.

Dabei wurde ein bakterielles Expressionssystem gewählt, welches die Aufreinigung über ein HisTag-Fusionsprotein zuläßt, da dieses auch die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erlaubt, und es Hinweise aus der Literatur gab, dass denaturierte Proteine besser zur Internalisierung befähigt sind. Zusätzlich hat das gewählte System den Vorteil, dass im nicht induzierten Zustand die Transkription vom T7-Promotor durch einen natürlichen Inhibitor der T7-Polymerase gehemmt wird.

Abb.8 zeigt die Strategie zur Klonierung des Konstruktes pThm3Ha4-TAB1C. Als Kontrolle für die späteren Experimente wurde ebenfalls der Vektor pThm3Ha4-GFP hergestellt. Die exprimierten Proteine enthalten zusätzlich zu dem HisTag einen MYCtag zur Detektion im Westernblot sowie die dritte Helix des *Drosophila* Transkriptionsfaktors Antennapedia (ANTP), die die Internalisierung vermittelt. Abb.10 verdeutlicht, dass die Aufreinigung beider Proteine sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen möglich war. Obwohl die ANTP-Sequenz stark hydrophob ist, wurden keine toxischen Effekte auf die Bakterien beobachtet, was aufgrund der Inkorporation hydrophober Proteine in das Membransystem der Bakterien häufig ein Problem darstellt. Durch Verwendung des Protease-defizienten Bakterienstammes BL21(DE3)pLysS tauchten bei der Expression und Aufreinigung keine Schwierigkeiten mit der Stabilität der rekombinanten Proteine auf, und sie konnten in befriedigenden Ausbeuten gewonnen werden. Die Ausbeuten waren unter denaturierenden Bedingungen jedoch höher, wofür es zwei mögliche Hauptursachen gibt. Eukaryotische Proteine, die in Bakterien exprimiert werden, bilden häufig unlösliche Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*), wobei die intermolekulare Assoziation von hydrophoben Domänen während der Faltung des Proteins eine Hauptursache ist. Durch die Verwendung von Harnstoff bei der denaturierenden Aufarbeitung werden die unlöslichen Proteinfractionen solubilisiert, was die Ausbeute erhöht. Außerdem ist der HisTag im denaturierten Zustand besser zugänglich, so dass die Bindung an die Ni-NTA-Matrix erhöht wird.

Zur Charakterisierung des Internalisierungsverhaltens von His-MYC-ANTP-TAB1C und His-MYC-ANTP-GFP wurden HeLa-Zellen mit den rekombinanten Proteinen behandelt und durch Ultrazentrifugation in lösliche und membranöse Fraktionen aufgeteilt. Abb.11 veranschaulicht, dass weder His-MYC-ANTP-TAB1C noch His-MYC-ANTP-GFP in die Zellen translozieren konnten, wobei die Art der Aufarbeitung keine Rolle spielte. Im Westernblot fanden sich die

Proteine hauptsächlich im mikrosomalen Sediment der Zentrifugation, nicht jedoch im löslichen Anteil. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte außerdem eindeutig gezeigt werden, dass HIS-MYC-ANTP-GFP an die Zellmembran gebunden wird und nicht etwa an intrazelluläre membranöse Kompartimente. Lediglich für denaturierend aufgearbeitetes HIS-MYC-ANTP-TAB1C konnte eine sehr geringe Internalisierung detektiert werden, die im Verhältnis zu dem membrangebunden Anteil jedoch nur einen Bruchteil der eingesetzten Proteinmenge ausmachte. Entsprechend konnten in Experimenten mit dem TAB1C-Protein auch keine funktionellen Effekte auf die TAK1-vermittelte Signaltransduktion beobachtet werden.

Zusammenfassend läßt sich an dieser Stelle festhalten, dass die Eigenschaften von ANTP-Fusionsproteinen im großen Umfang von der ANTP-Sequenz beeinflusst werden, die hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren enthält. Entsprechend verhält sich das Fusionsprotein ebenfalls sehr hydrophob, was durch verschiedene Beobachtungen nahegelegt wird:

- die Bildung von *inclusion bodies*, die zwar nicht direkt nachgewiesen wurde, aufgrund der obigen Ausführungen jedoch sehr wahrscheinlich ist.
- die starke, unspezifische Bindung an die Zellmembran, die im Westernblot und durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen wurde.
- das Auftauchen SDS-unlöslicher Multimere, die durch die Ausbildung von Micellen in Gegenwart von SDS erklärt wird, und die ebenfalls im Westernblot beobachtet wurden (vergl. Sternmarkierung in Abb. 11).

Die Anzahl an Arbeiten, die funktionelle Effekte von ANTP-Fusionsproteinen untersuchen, ist im Verhältnis zum Einsatz anderer Internalisierungssequenzen relativ gering. Außerdem wurden durch neuere Arbeiten (vergl. "Einleitung") Zweifel daran laut, ob diese Sequenz überhaupt zur Zellpenetration befähigt ist. Vielmehr wurde die beobachtete Internalisierung als Artefakt, resultierend aus der starken, unspezifischen Interaktion dieser hydrophoben Domäne mit der Zellmembran und der anschließenden Fixierung der Zellen mit Methanol, Aceton oder Paraformaldehyd bezeichnet (Richard et al., 2003; Leifert et al., 2002). Die eigenen, hier gemachten Beobachtungen stehen zwar im Einklang mit diesen Arbeiten, allerdings gibt es auch Gruppen, die eine direkte Internalisierung der ANTP-Sequenz in artifiziell hergestellte, unilamellare Vesikel beobachten konnten (Thoren et al., 2000).

Eine Schlussfolgerung aus den hier vorgestellten Experimenten ist jedoch, dass die starke Hydrophobizität der ANTP-Internalisierungssequenz ein limitierender Faktor ist und diese Technik daher für jede Fragestellung und für jedes Protein auf seine Anwendbarkeit hin evaluiert werden muss.

4.1.2 Synthetisch hergestellte, zellpermeable TAT-Peptide als molekulare Werkzeuge und ihr Einsatz zur Funktionsanalyse ausgewählter Proteine

4.1.2.1 Charakterisierung des Peptides TAT-TAB1C3 (wt)

Alternativ zu den rekombinant hergestellten ANTP-Fusionsproteinen wurden synthetisch hergestellte Peptide eingesetzt, die an die Internalisierungssequenz des HIV-Transkriptionsfaktors TAT fusioniert waren.

Um die chemische Synthese eines zellpermeable TAB1-Peptides zu ermöglichen, mußte die auszuwählende Sequenz von TAB1 weiter eingengt werden, da der C-Terminus mit seinen 68 Aminosäure zu lang für eine Festphasensynthese ist. Sakurai et al. hatten bereits gezeigt, dass die äußersten Aminosäuren von TAB1 (480-504) die Bindung an TAK1 vermitteln, während die unmittelbar davor gelegenen Aminosäuren (437-479) hauptsächlich für die TAK1-Aktivierung verantwortlich sind (Sakurai et al., 2000). Durch ein Reportersystem (vgl. Abb.12), bei dem die Expression der Luziferase von einem minimalen, humanen IL-8-Promotor kontrolliert wird, konnte in dieser Arbeit zusätzlich gezeigt werden, dass der äußerste C-Terminus von TAB1 (TAB1C3) noch partiell aktivierende Aktivität besitzt. In Kooperation mit Dr. Graham Knight von der *University of Cambridge* wurde daher ein Peptid bestehend aus der TAT-Internalisierungssequenz und TAB1C3 synthetisiert.

Im Gegensatz zu dem rekombinant hergestellten ANTP-TAB1C-Protein wurde dieses von 100% der Zellen aufgenommen (vgl. Abb.14). Daraus läßt sich folgern, dass die TAT-Sequenz besser zur Zelltransduktion geeignet ist, als die ANTP-Sequenz. Allerdings ist das synthetisch hergestellte Peptid wesentlich kleiner als das rekombinant hergestellte TAB1-Protein, welches zusätzlich zum gesamten C-Terminus von TAB1 außerdem einen HIS- und einen MYCtag enthält, so dass diese Feststellung nur mit Einschränkungen zu treffen ist. Trotz dieser sehr effektiven Zelltransduktion, konnten auch mit dem synthetischen TAT-TAB1C3-Peptid keine Effekt auf die TAK1-abhängige Signaltransduktion gemessen werden (vgl. Abb.15). Aus dem bereits im "Ergebnis"-Teil geschilderten Gründen kann daraus jedoch nicht auf eine grundsätzliche Versagen dieses Ansatzes geschlossen werden. Die Festphasensynthese und anschließende Aufreinigung von TAT-TAB1C3 verlief sehr problematisch, und die korrekte Spezies war nur zu einem geringen Anteil vorhanden und stark kontaminiert, so dass das Material laut Dr. Knight nur bedingt einsetzbar war. Eine Neusynthese durch Dr. Knight war leider nicht mehr möglich. Da unserer Gruppe als molekularbiologisch und biochemisch arbeitendes Labor sowohl die Expertise als auch die instrumentelle Ausstattung für die selbständige Synthese von Peptiden fehlt, wurden die Arbeiten an dieser Stelle eingestellt.

4.1.2.2 Charakterisierung und Einsatz des Peptides TAT-c-JUN (wt)

4.1.2.2.1 Initiale Charakterisierung des Peptides TAT-c-JUN (wt)

Mit dem ebenfalls von Dr. Knight hergestellten TAT-c-JUN-Peptid (wt) konnte hingegen gezeigt werden, dass sich die Technik der Proteintransduktion gut zur Funktionsanalyse von Proteinen und zum manipulativen Eingriff in physiologische Prozesse innerhalb einer Zelle eignet.

Der dimere Transkriptionsfaktor AP-1 und eine seiner am besten untersuchten Komponenten c-JUN sind von zentraler Bedeutung, um Zellen in die Lage zu versetzen, auf externe Stimuli zu reagieren. c-JUN wird durch Phosphorylierung der Aminosäuren Serin63 und Serin73 durch die MAP-Kinase JNK aktiviert, wobei die Interaktion mit JNK durch die δ -Domäne von c-JUN vermittelt wird (Hibi et al., 1993; Adler et al., 1994). Um die Signalverzweigung distal von JNK zu untersuchen und Funktionen von c-JUN offenzulegen, wurde durch Festphasensynthese ein Peptid bestehend aus der TAT-Internalisierungssequenz und der δ -Domäne hergestellt.

Das HPLC-Profil in Abb.17, welches von Dr. Graham Knight aufgenommen wurde, zeigt die hohe Reinheit der Präparation von TAT-c-JUN (wt) ebenso wie des Kontrollpeptides TAT-c-JUN (scr.). Zusätzlich konnte durch die Aufnahme eines MS-Spektrums das Vorliegen der korrekten Spezies gezeigt werden. In Absprache mit Dr. Knight wurde daher davon ausgegangen, dass diese Peptide für die nachfolgenden Versuche verwendet werden konnten.

Um das TAT-c-JUN (wt) Peptid zur Aufklärung der Funktionen des c-JUN-JNK-Komplexes in intakten Zellen einsetzen zu können, mußte dieses Peptid zwei Eigenschaften erfüllen. Erstens sollte es *in vitro* und *in vivo* (in intakten Zellen) mit der Interaktion von c-JUN mit JNK interferieren können und zweitens sollte TAT-c-JUN (wt) in Zellen aufgenommen werden.

Die Rupturierung des c-JUN-JNK-Komplexes *in vitro* konnte in mehreren komplementären Ansätzen nachgewiesen werden. Hierzu wurden aktivierte JNK entweder durch Affinitätschromatographie mit GST-c-JUN oder durch Fusion an den TAPtag isoliert (vgl. Abb.18A-C und Abb.42B). Beide Ansätze zeigen die Hemmung der JNK-vermittelten c-JUN-Phosphorylierung. Dieser Effekt ist nur durch direkte Bindung des δ -Domänen-Peptides an JNK zu erklären, die in Abb.44 gezeigt werden konnte.

Da c-JUN für seine Aktivierung auf die Phosphorylierung angewiesen ist, sollte durch eine Hemmung der Phosphorylierung das transaktivierende Potential von c-JUN sinken. Zu diesem Zweck wurde das beschriebene GAL4-Reportersystem verwendet, welches hochspezifisch die Transaktivierung von c-JUN misst. Entsprechend der beobachteten *in vitro*-Hemmung der c-JUN-Phosphorylierung konnte durch Kultivierung transfizierter HeLa-Zellen in Gegenwart des zellpermeablen TAT-Peptides auch eine praktisch vollständige Inhibition des Transaktivierungspotentials von c-JUN gemessen werden (vgl. Abb.18D). Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass durch Kombination des Wissens um *docking sites* mit der

Technik der Zelltransduktion ein hochspezifisches, molekulares Werkzeug hergestellt werden konnte, welches die Analyse von c-JUN-Funktionen in intakten Zellen zuläßt.

Die Internalisierungseigenschaften wurden anhand einer Konzentrations- und Zeitreihe in HeLa-Zellen bestimmt (vgl. Abb.19). TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.) wiesen dabei ein identisches Verhalten auf, so dass die Internalisierung nicht durch die Anordnung der Aminosäuren in der Cargo-Sequenz beeinflusst wird. Der Mechanismus der Internalisierung ist noch sehr umstritten, jedoch konnte in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die Internalisierung von der Konzentration der Peptide im umgebenden Medium und von der Zeit abhängig ist. Zudem wurde in einer Reihe von Versuchen an unfixierten Zellen beobachtet, dass die Peptide die Zellmembran auch in umgekehrter Richtung passieren können, wenn das umgebende Medium frei von Peptiden ist (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten von Zeitabhängigkeit und Abhängigkeit von vorhandenen Konzentrationsgefällen suggeriert, dass die Peptide die Membran praktisch frei passieren können. Die Peptide verteilten sich darüberhinaus zwischen Zytosol und Zellkern, was deshalb erwartet war, weil die TAT-Sequenz eine Kernlokalisationssequenz trägt (vergl. "Einleitung"). Besonders vor dem Hintergrund, dass endogene c-JUN- und JNK-Proteine ebenfalls im Zytosol und im Kern anzutreffen sind, war dieser Befund von Bedeutung, da dadurch die Wahrscheinlichkeit der Bindung des TAT-c-JUN (wt) Peptides an endogene JNK-Proteine erhöht wird

Zur Visualisierung der Internalisierung wurden die Zellen in dieser Arbeit mit 4% PFA fixiert. In verschiedenen Arbeiten wurde berichtet, dass die Fixierung von Zellen zur Redistribution von zellpermeablen Peptiden führt und die beobachtete Internalisierung ein Artefakt darstellt. So soll auch die Fixierung mit Formaldehyd diesen Effekt hervorrufen (Richard et al., 2003). Allerdings wurde eine Aufnahme von TAT-c-JUN (wt) und TAT-c-JUN (scr.) auch in unfixierten Zellen beobachtet, jedoch war die Aufnahme von Fotos mit diesen Zellen sehr schwierig, da die Peptide, wie bereits erwähnt, schnell in das umgebende, peptidfreie Medium translozierten. Andere Gruppen konnten jedoch eine Internalisierung der TAT-Sequenz auch in unfixierte Zellen nachweisen (Thoren et al., 2000; Thoren et al., 2003).

Aufgrund der vielversprechenden initialen Experimente und ungeachtet der Diskussion um den Mechanismus der Peptidinternalisierung, wurden daher weitere Versuche mit den zellpermeablen Peptiden durchgeführt.

In der Folge wurden dabei verschiedene spezifische und funktionelle Effekte des TAT-c-JUN (wt) Peptides im Vergleich zum TAT-c-JUN (scr.) Kontrollpeptid in Zellen beobachtet. Dieses ist ein weiterer eindeutiger Hinweis darauf, dass zumindest ein Teil der in die Zellen gelangten TAT-Peptide biologische Aktivität besitzt.

4.1.2.2.2 Einfluss von TAT-c-JUN (wt) auf das Überleben von Zellen

Zu den vom TAT-c-JUN (wt) Peptid hervorgerufenen Effekten gehört die starke Induktion von Apoptose in Zellen, die für längere Zeitspannen mit diesem Peptid kultiviert wurden (vgl. Abb.21). In diesem Zusammenhang sollte die Wichtigkeit des Kontrollpeptides erwähnt werden,

da durch dessen Einsatz eindeutig ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um einen unspezifischen, toxischen Effekt durch zellpermeable TAT-Peptide im allgemeinen handelt, zumal mit sehr hohen Konzentrationen von bis zu 400µmol/l gearbeitet wurde. Allerdings wurde in anderen publizierten Arbeiten, in denen funktionelle Effekte zellpermeabler Peptide in intakten Zellen beobachtet wurden, mit ähnlichen Konzentrationen gearbeitet (Sawada et al., 2003; May et al., 2000). Apoptose wird im Gegensatz zur Nekrose durch Blasenbildung in der Membran (*membrane blebbing*), ein Schrumpfen der Zellen (*cell shrinking*) und die Kondensation und Fragmentierung des Chromatins charakterisiert. In Abb.22 konnten sämtliche dieser Eigenschaften nachgewiesen werden.

Die Phosphorylierung von c-JUN ist wichtig für den Ablauf des Zellzyklus (Bakiri et al., 2000). Da TAT-c-JUN (wt) *in vitro* die Hemmung der c-JUN-Phosphorylierung bewirkt, wurde vermutet, dass die beobachtete Apoptose eine Folge der ausbleibenden c-JUN-Phosphorylierung des endogenen Proteins als Antwort auf Wachstumsfaktoren darstellt. Bei ersten Versuchen, die serum-induzierte -also Wachstumsfaktor-induzierte- Phosphorylierung von endogenem c-JUN in spontan proliferierenden HeLa-Zellen zu messen, wurde schnell klar, dass dieses nicht reproduzierbar möglich ist. Sehr wahrscheinlich liegt dieses daran, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt immer nur ein bestimmter Anteil der Kultur im gleichen Stadium des Zellzyklus ist und somit nicht in allen Zellen der gleiche Phosphorylierungsstatus von c-JUN vorliegt. Die Zellen wurden daher durch die Kultivierung in Medium, welches nur 1/100 der übliche FKS-Konzentration enthielt, synchronisiert und anschließend restimuliert. Wie erwartet, führte dies zu einer transienten und meßbaren Phosphorylierung von c-JUN (vgl. Abb.23), wobei zwei Phosphoformen auftauchten, was im Einklang mit der Phosphorylierung von c-JUN an mehreren Akzeptorstellen steht (vergl. "Einleitung"). Darüberhinaus konnte eine FKS-induzierte Phosphorylierung von JNK gemessen werden. Dieses ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass nicht nur die Phosphorylierung von c-JUN, sondern ein funktionsfähiger c-JUN-JNK-Komplex für den Ablauf des Zellzyklus wichtig ist. Dieser Befund steht einerseits im Einklang aber andererseits auch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Bakiri et al., da diese zwar eine c-JUN-Phosphorylierung während des G2-M-Phase-Übertritts jedoch keine korrelierende JNK-Phosphorylierung messen konnten.

Die am stärksten hyperphosphorylierte Form von c-JUN konnte komplett mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid gehemmt werden. Da die FKS-induzierte Phosphorylierung von JNK nicht beeinflusst wurde, läßt sich folgern, dass das Peptid direkt unterhalb von JNK in die Signalkette eingreift, was im Einklang mit der nachgewiesenen, direkten Bindung von TAT-c-JUN (wt) an JNK steht (vgl. Abb.44).

Interessanterweise führte TAT-c-JUN (wt) nicht zur kompletten Hemmung der c-JUN-Phosphorylierung und hatte keinen Einfluß auf die schneller migrierende Phospho-c-JUN-Form. Dieses kann verschiedene Ursachen haben. Sterische Verhältnisse im c-JUN-JNK-Komplex könnten dazu führen, dass das Peptid *in vivo* nur zum teilweisen Aufbruch des Komplexes führt, so dass nur bestimmte einzelne Phosphorylierungsstellen oder bestimmte Kombinationen von Phosphorylierungsstellen betroffen sein könnten. Wie in Abb.3 gezeigt, spielen vermutlich auch

Bereiche in der C-terminalen DNA-Bindungsdomäne von c-JUN *in vivo* eine Rolle bei der Kopplung an JNK (May et al., 1998). Diese Interaktion dürfte nicht Peptid-sensitiv sein, so dass eine Restphosphorylierung von c-JUN durch JNK *in vivo* auch in Anwesenheit von TAT-c-JUN (wt) erklärbar wäre. Darüberhinaus konnte vor kurzem gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen außer JNK auch ERK1/2 die Aminosäuren Serin 63 und Serin 73 phosphorylieren kann (Morton et al., 2003). Da der in Abb.23 verwendete Antikörper phosphoryliertes Serin an Position 63 erkennt, könnte ein Teil der beobachteten Phosphorylierung von c-JUN als Antwort auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren auch durch ERK1/2 vermittelt werden, die ebenfalls nicht Peptid-sensitiv sein dürfte. Diese Hypothese liesse sich durch den ERK1/2-Signalweg-Inhibitor PD98059 überprüfen.

Nichtsdestotrotz lässt sich festhalten, dass die Peptid-induzierte Apoptose eindeutig mit der Hemmung der FKS-induzierten c-JUN-Phosphorylierung korreliert werden konnte. Ein wichtiger Hinweis auf einen durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid ausgelösten Zellzyklusarrest wurde durch Messung des Einbaus von ³H-Thymidin in neu synthetisierte DNA erhalten (vgl. Abb.24A). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{cip1/waf1} durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart von TAT-c-JUN (wt) induziert wird, ein Effekt, der auch durch den Entzug an Wachstumsfaktoren ausgelöst wurde (vgl. Abb.24B). p21 steht dabei über p53 unter indirekter Kontrolle von c-Jun (vergl. "Einleitung") und auch in c-JUN^{-/-}-Zellen sind p53 und in der Folge p21 hochreguliert. An dieser Stelle sollte zusätzlich auf eine Reihe von Arbeiten, die die Rolle von JNK in der Proliferation von Tumorzellen beschreiben, verwiesen werden. In Experimenten mit *antisense* Oligonukleotiden gegen JNK1 oder JNK2 wurde der gleiche Phänotyp wie durch Behandlung von Zellen mit TAT-c-JUN (wt) beobachtet, nämlich die Inhibition der Proliferation und die Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21 und in der Folge das vermehrte Auftreten apoptischer Zellen (Potapova et al., 2000a; Potapova et al., 2000b).

Aus der Kombination der in der Literatur vorliegenden Daten und den in dieser Arbeit mit dem c-JUN-Peptid gewonnenen Ergebnissen, läßt sich folgendes Modell für die Rolle des c-JUN-JNK-Komplexes für die Proliferation von Tumorzelllinien entwickeln:

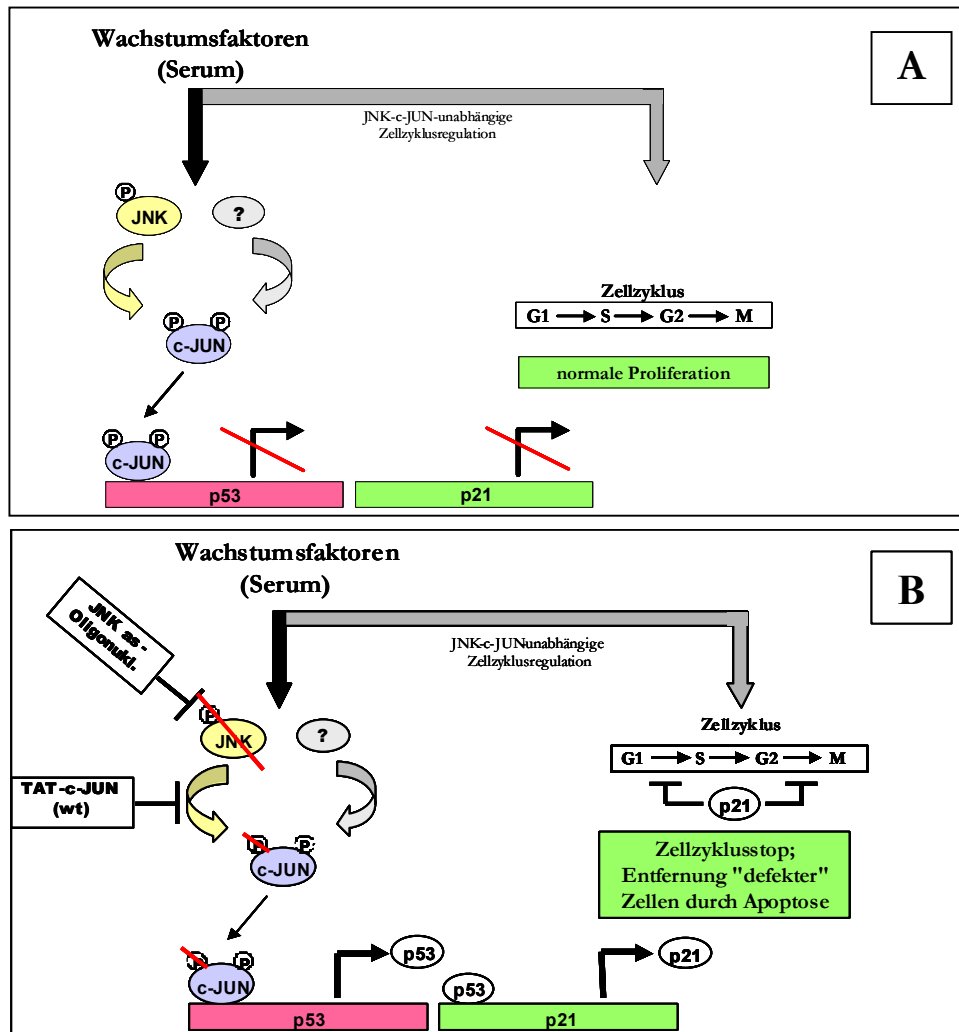


Abbildung 46: c-JUN und JNK als positive Regulatoren von Zellüberleben; Effekte von JNK as-Oligonukleotiden oder des TAT-c-JUN (wt) Peptides

Obige Abbildung stellt ein Modell dar, welches die Rolle von JNK und c-JUN bzw. des JNK-c-JUN-Komplexes bei der Regulation von Zellüberleben zeigt. Unter normalen Bedingungen (A) erfolgt eine durch Wachstumsfaktoren ausgelöste Aktivierung von JNK (und eventuell anderer Kinasen), die zur Phosphorylierung von c-JUN führt. Obwohl die Phosphorylierung von c-JUN in der Regel einen Anstieg seines transaktivierenden Potentials zur Folge hat, wirkt c-JUN repressorisch auf den p53-Promotor. Da p53 wiederum aktivierend auf die Transkription von p21 wirkt, wird unter diesen Bedingungen kein p21 exprimiert. Die Behandlung von Zellen mit JNK as-Oligonukleotiden oder mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid (B) ruft den gleichen Phänotyp hervor. In beiden Fällen kann c-JUN nicht mehr durch JNK als Antwort auf Wachstumsfaktoren phosphoryliert werden, entweder durch eine Verringerung der JNK-Menge oder durch eine Inhibition der c-JUN-JNK-Interaktion. c-JUN kann somit nicht mehr den p53-Promotor hemmen, in der Folge kommt es daher zur Expression von p21 und zur einem Zellzyklusarrest. p21 ist ein CDK Inhibitor (*cyclin dependent kinase*) und hemmt den G1-S-Übergang sowie den G2-M-Übergang des Zellzyklus. Dauert diese Situation über eine längere Zeit an (Stunden oder Tage), so werden die arretierten Zellen durch Apoptose eliminiert.

c-JUN stimuliert die Zellzyklusprogression darüberhinaus durch Induktion von Cyclin D1. Der Effekt des TAT-c-JUN (wt) Peptides auf die Expression von Cyclin D1 wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Dieses Modell wird zusätzlich durch die hier vorgestellten siRNA-Experimente in HeLa-Zellen gestützt (vgl. Abb.32 und Abb.33). Im Westernblot konnte eindeutig die Absenkung der endogenen c-JUN-Menge nach Transfektion von c-JUN-siRNA-Molekülen beobachtet werden. Die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen zeigte die gleichen morphologischen Eigenschaften wie von Zellen, die für längere Zeitspannen mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid behandelt wurden. So konnte eine Inhibition der Proliferation sowie ein starker Anstieg in der Zahl apoptischer Zellen festgestellt werden. Dieser Effekt konnte eindeutig mit der Absenkung der c-JUN-Menge korreliert werden, da die Transfektion unrelevanter siRNA-Spezies (hier gegen Luziferase) bzw. die Transfektion geringerer c-JUN-siRNA-Mengen, die keinen *knock down* hervorrufen, keinen antiproliferativen bzw. apoptischen Einfluss hatten.

Abschließend sollte nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Spezifität dieser Ergebnisse besonders durch die Verwendung des TAT-c-JUN (scr.) Kontrollpeptides, welches keinerlei antiproliferativen oder apoptischen Effekte auslöst, demonstriert werden konnte.

4.1.2.2.3 Einfluß von TAT-c-JUN (wt) auf die Expression entzündlicher Gene

Da die Funktionen von c-JUN als positiver Regulator von Zellproliferation mittlerweile gut etabliert sind, wurde in dieser Arbeit nicht versucht, weitere c-JUN-Zielgene, die in die Zellzykluskontrolle involviert sind, zu identifizieren. Die Untersuchungen wurden auf andere Stimuli ausgedehnt, für die die Aktivierung von JNK und AP-1-Komponenten eine wichtige Rolle spielt.

In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass JNKs eine wichtige Funktion für die Expression entzündlicher Gene spielen (Krause et al., 1998; Chu et al., 1999). Das TAT-c-JUN (wt) Peptid wurde daher dazu verwendet, die Rolle des c-JUN-JNK-Komplexes bei der Signalweiterleitung durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 zu untersuchen. Viele entzündungsrelevante Gene, wie auch das von unserer Arbeitsgruppe intensiv untersuchte IL-8-Gen (CXCL-8), enthalten AP-1-Bindungsstellen in ihrem Promotor (Kracht and Saklatvala, 2002). Da JNKs durch IL-1 aktiviert werden, sollte die Frage beantwortet werden, ob JNKs die Expression entzündlicher Gene generell über die Phosphorylierung von c-JUN steuern.

Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene konnte in Abb.25 durch Verwendung des JNK-Inhibitors SP6001255 die Wichtigkeit von JNK für die IL-1-induzierte Expression von IL-8 bestätigt werden. Im Gegensatz dazu scheint c-JUN, bzw. die Phosphorylierung von c-JUN, nicht wichtig für die IL-8-Expression zu sein, wie die ausbleibende Hemmung durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid zeigt. Dieses scheint insofern zunächst ungewöhnlich, da das IL-8-Gen eine funktionelle Konsensus-AP-1-Bindungsstelle in seinem Promotor enthält, die, folgt man lange bestehenden *in vitro* Daten, präferentiell ein c-FOS-c-JUN-Heterodimer binden sollte (Hoffmann et al., 2002). Gleichzeitig ist dieser Befund jedoch auch ein Hinweis darauf, dass der etablierte Gedankengang von IL-1-abhängiger JNK-Aktivierung und in der Folge c-JUN-abhängiger Genexpression ein zu stark vereinfachtes Modell darstellt. Unser Ergebnis steht zudem in

Einklang mit einer Arbeit, in der die adenovirale Infektion von rheumatoiden Fibroblasten mit einer dominant-negativen c-JUN-Form keine Hemmung der IL-1-induzierten IL-6- oder IL-8-Expression bewirken konnte (Georganas et al., 2000). Allerdings wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass diese c-JUN-Form die TNF α -induzierte Expression vom IL-8-Promotor hemmen kann (Natarajan et al., 2001).

Die Anwendung des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten "Entzündungs-*Microarrays*" ermöglichte uns die Untersuchung des spezifischen Effektes des TAT-c-JUN (wt) Peptides auf die IL-1-induzierte Expression von 110 entzündungsrelevanten Genen. Diese Experimente wurden in primären Zellen, in diesem Fall humanen Zahnfleischfibroblasten, durchgeführt, da diese eine vielfältigere und starke Expression dieser Gene als Antwort auf Zytokine zeigen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig festzuhalten, dass die Proteintransduktion besonders für primäre Zellen geeignet ist, die genetischer Manipulation nur bedingt zugänglich sind.

Abb.28 und Abb.30 fassen die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse zusammen. Um dabei die Signifikanz der gemessenen Effekte sicherzustellen, wurden sowohl an das Meßsystem als auch an die konkreten Versuchsbedingungen hohe Ansprüche gestellt:

Zum einen stellt der verwendete *Microarray* ein sehr sorgfältig evaluiertes Meßsystem dar, welches in einer großen Anzahl verschiedener Zelltypen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen getestet wurde. Jeder *Microarray* enthält zusätzlich zwei getrennte Sondenspots, so dass bei jedem Experiment automatisch ein technisches Replikat der Meßwerte erzeugt wird.

Um außerdem repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden mehrere voneinander unabhängige Experimente in die Auswertung einbezogen. Für die basalen Werte der unstimulierten Proben (unstimuliert = 0) wurde der Durchschnittswert aus vier getrennten Experimenten gebildet. Für die jeweils mit IL-1-stimulierten Proben (IL-1; IL-1 + TAT-c-JUN (wt); IL-1 + TAT-c-JUN (scr.); IL-1 + SP600125) wurden jeweils zwei völlig unabhängige Experimente durchgeführt. Ein weiterer experimenteller Parameter, der die Betrachtung von Artefakten eliminiert, ist der Einsatz des Kontrollpeptides, da dadurch potentiell unspezifische Effekte, die durch die Behandlung der primären Fibroblasten mit zellpermeablen Peptiden hervorgerufen werden, aus der Betrachtung herausgenommen werden können. Aufgrund der starken proapoptischen Wirkung von TAT-c-JUN (wt) wurde darüberhinaus die durchschnittliche Fragmentlänge der auf die Arrays hybridisierten cRNAs ermittelt, die sich jedoch zwischen IL-1-behandelten und IL-1/TAT-c-JUN (wt)-behandelten Zellen nicht unterschied (vgl. Abb.29).

Durch diese Art des experimentellen Vorgehens konnten eine Gruppe von Genen identifiziert werden, deren IL-1-induzierte Expression durch TAT-c-JUN (wt) entweder signifikant herauf- oder herunterreguliert wird, so dass geschlußfolgert werden kann, dass diese Gene für ihre Regulation auf die Phosphorylierung von c-JUN angewiesen sind (vgl. Abb.28). Die Tatsache, dass der JNK-Inhibitor die Expression einer größeren Gengruppe trifft, weist darauf hin, dass sich die Weiterleitung des durch IL-1 ausgelösten Signals in der Zelle auf der Ebene von JNK

auftrennt, und JNK eine Reihe von Genen durch andere Substrate als c-JUN kontrolliert. Vier Gene -IL-1 β , ICAM-1, pent(r)axin-3 und CXCL10- wurden durch TAT-c-JUN und SP600125 gleichermaßen reguliert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Gene auf eine klassische JNK-c-JUN-Kaskade angewiesen sind.

Das am stärksten durch TAT-c-JUN (wt) Peptid gehemmte Gen war CCL-2 (= MCP-1), dessen IL-1-induzierte Expression zu 90% inhibiert wurde (vgl. Abb.28 und Abb.29). MCP-1 (= *monocyte chemoattractant protein-1*) ist ein chemotaktisches Zytokin (= Chemokin), welches ursprünglich *in vitro* als Monozyten-spezifisch beschrieben wurde (Matsushima et al., 1989). Später wurde jedoch gezeigt, dass MCP-1 auch T-Gedächtniszellen und z.B. natürliche Killerzellen dirigieren kann (Allavena et al., 1994; Carr et al., 1994). Entsprechend seinen Funktionen spielt MCP-1 eine wichtige Rolle in chronisch entzündlichen Erkrankungen, die durch eine Infiltration durch mononukleäre Zellen charakterisiert sind. Dazu gehören beispielsweise die rheumatoide Arthritis oder die multiple Sklerose (Koch et al., 1992; Ransohoff et al., 1993). Die ausbleibende Hemmung von IL-8 durch das c-JUN-Peptid, die zuvor schon in HeLa-Zellen beobachtet wurde (vgl. Abb.25), konnte in HuGi-Zellen bestätigt werden. IL-8 war das erste Chemokin welches entdeckt wurde und rekrutiert Neutrophile aus der Blutbahn in verletzte Gewebe. Die Expression von IL-8 wird erst durch eine Vielzahl von Stimuli induziert, zu denen z.B. proinflammatorische Zytokine wie das hier eingesetzte IL-1 oder TNF gehören, aber auch zellulärer Stress oder Produkte von Pathogenen (Hoffmann et al., 2002). Ebenso wie MCP-1 ist IL-8 an der Entstehung chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis beteiligt (Endo et al., 1991). Im Gegensatz zu MCP-1 gibt es von IL-8 allerdings kein Homolog in Mäusen, so dass die Funktionsanalyse an *knock out* Mäusen nicht möglich ist. Trotz der Ähnlichkeit dieser beiden chemotaktischen Proteine scheint ihre Regulation doch unterschiedlich zu sein.

Sowohl MCP-1 als auch IL-8 haben AP-1-Bindestellen in ihren Promotoren. Jedoch wird nur MCP-1 durch das JUN-Peptid gehemmt. Aus der ausbleibenden Hemmung von IL-8 und der Tatsache, dass der JNK-Signal wichtig für die induzierbare Expression von IL-8 ist, lässt sich schlußfolgern, dass JNKs Gene mit AP-1-Bindungsstellen nicht grundsätzlich über c-JUN regulieren. Dieses Ergebnis bricht somit mit dem allgemeingültigen "JNK/c-JUN/AP-1-Paradigma" und fügt der AP-1-regulierten Gentranskription eine zusätzliche Ebene der Komplexität hinzu. Nur das Vorliegen einer AP-1-Bindestelle stellt also keinerlei Beweis dafür dar, dass dieses Gen tatsächlich durch einen c-JUN-JNK-Komplex reguliert wird. Dieses gilt auch für andere auf dem *Array* befindliche Gene, die AP-1-Bindestellen enthalten, wie z.B. MMP-1 (Kollagenase) oder IL-6.

Dieses Ergebnis konnte durch siRNA-Experimente gegen c-JUN in HuGi-Zellen erhärtet werden (Abb.32 und Abb.34). Die Absenkung der endogenen c-JUN-Menge führt zwar eindeutig zur Hemmung der IL-1-induzierten MCP-1-Expression nicht jedoch zur Hemmung der IL-8-Expression. Das TAT-c-JUN (wt) Peptid hat also deshalb keinen Einfluss auf die IL-8-

Expression, weil c-JUN keine Rolle für die Regulation von IL-8 spielt, obwohl es JNK-abhängig reguliert wird und eine AP-1-Bindestelle im Promotor trägt.

Neben MCP-1 wurden auch andere Gene identifiziert, deren Expression zwar durch TAT-c-JUN (wt), nicht jedoch durch den JNK-Inhibitor SP600125 inhibiert wurde. Dieser Befund, mag auf den ersten Blick überraschend sein, jedoch kann es dafür mehrere mögliche Erklärungen geben. Aufgrund der zehn JNK-Isoformen sind die genauen Vorhersagen über die Auswirkungen von TAT-c-JUN (wt) und SP600125 nur sehr schwierig möglich. So ist nicht bekannt, ob der JNK-Inhibitor alle zehn JNK-Isoformen gleichermaßen hemmt, allerdings ist JNK3 *in vitro* weniger sensitiv gegenüber SP600125 (Bennett et al., 2001). Es ist somit z.B. möglich, dass die JNK-Isoform, die die Aktivierung von c-JUN am MCP-1-Promotor vermittelt, nicht effizient von SP600125 gehemmt wird. Diese Fragestellung könnte durch die Untersuchung der MCP-1-Expression in verschiedenen JNK-defizienten Zellen beantwortet werden.

Eine Reihe anderer Überlegungen könnten ebenfalls zur Klärung der Diskrepanz zwischen TAT-c-JUN (wt)-abhängigen Genen und SP600125-abhängigen Genen herangezogen werden. Nicht alle JNK-Isoformen binden mit der gleichen Affinität an c-JUN, so zeigt JNK2 die stärkste Bindung an c-JUN (Kallunki et al., 1994). Das c-JUN-Peptid wurde zwar in einer Konzentration von 400 µmol/l eingesetzt, allerdings ist aufgrund der neueren mechanistischen Befunde zur Peptidinternalisierung (vergl. "Einleitung") nicht klar, wieviel davon tatsächlich biologische Aktivität besitzt. Es ist also möglich, dass nur die am wenigsten stabilen Komplexe durch das Peptid getroffen werden. Zudem ist es sehr wahrscheinlich, dass die Zugänglichkeit des Peptids zu der Interaktionsoberfläche von c-JUN und JNK im Komplex bzw. im Komplex mit anderen Proteinen des JNK-Signalweges (MKK4 und MKK7 oder JIP) wichtig für die Wirkung von TAT-c-JUN (wt) ist. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass c-JUN noch durch andere Kinasen als JNK phosphoryliert wird (Morton et al., 2003). Ob und wen ja in welcher Weise das c-JUN-Peptid diese Interaktionen stören kann, ist nicht bekannt. Schließlich sollte noch erwähnt werden, dass Kinaseinhibitoren in den allermeisten Fällen nicht vollständig selektiv sind. Bei der hier eingesetzten Konzentration soll SP600125 z.B. auch andere Kinase wie ERK2 oder CK1 (*casein kinase 1*) hemmen (Bain et al., 2003).

Folgend Abbildung fasst die Befunde zur JNK- und c-JUN-abhängigen Regulation der MCP-1- und IL-8-Expression zusammen:

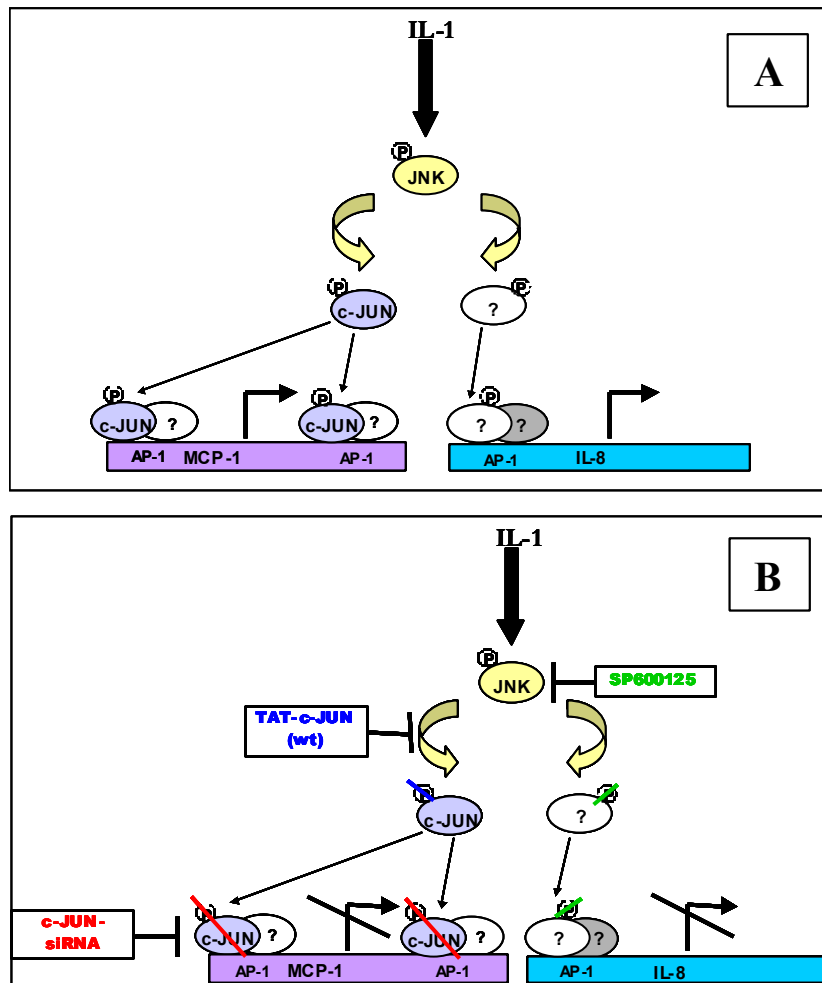


Abbildung 47: Regulation der Expression der Chemokine MCP-1 und IL-8 durch JNK und c-JUN

Die Stimulation mit IL-1 führt zur Aktivierung von JNKs (A). JNK hat verschiedene Substrate, von denen c-JUN das am besten charakterisierte darstellt. Der MCP-1-Promotor enthält neben Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren (z.B. SP-1 und NF-κB) mehrere weniger gut charakterisierte AP-1-Bindungsstellen, unter anderem im 3'-Bereich des Gens 600 Basenpaare abwärts der Polyadenylierungsstelle. Es gibt Hinweise darauf, dass diese bevorzugt c-JUN-FRA-1-Heterodimere bindet (Finzer et al., 2000). Die Hemmung der c-JUN-Phosphorylierung durch TAT-c-JUN (wt) führt genauso wie eine siRNA-vermittelte Absenkung der endogenen c-JUN-Menge zur Hemmung der MCP-1-Expression (B). Die fehlende Inhibition der MCP-1-mRNA-Bildung nach Hemmung der JNK-Aktivität mit SP600125 kann eine Reihe verschiedener Ursachen haben (vgl. Diskussion).

Der IL-8-Promotor enthält neben anderen Transkriptionsfaktorbindestellen ebenfalls eine Konsensus-AP-1-Stelle. Die Ergebnisse dieser Arbeit und weitere Befunde aus unserer Arbeitsgruppe weisen eindeutig darauf hin, dass c-JUN keine Rolle für die Regulation des IL-8-Gens spielt, obwohl dieses Gen eindeutig JNK-abhängig reguliert wird, was z.B. die Hemmung mit SP600125 zeigt. Das Substrat, über welches JNK die Expression von IL-8 steuert, bleibt ebenso wie die Zusammensetzung des AP-1-Dimers am IL-8-Promotor weiterhin ungeklärt. In Chromatin-Immunoprecipitations-Studien konnte jedoch die Bindung von c-FOS an den IL-8-Promotor reproduzierbar gemessen werden (Hoffmann und Kracht, unveröffentlichte Daten).

Aus der Kombination dieser Daten lässt sich folgern, dass das alleinige Vorliegen einer AP-1-Bindestelle noch keinerlei Beweis dafür ist, dass das entsprechende Gen tatsächlich durch einen c-JUN-JNK-Komplex reguliert wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das TAT-c-JUN (wt) Peptid erfolgreich zur weiteren Aufklärung der biologischen Funktionen von c-JUN und des c-JUN-JNK-Komplexes

eingesetzt werden konnte, zumal ausgewählte Ergebnisse eindeutig durch RNAi gegen c-JUN bestätigt werden konnten. Folgende Abbildung fasst diese Ergebnisse zusammen:

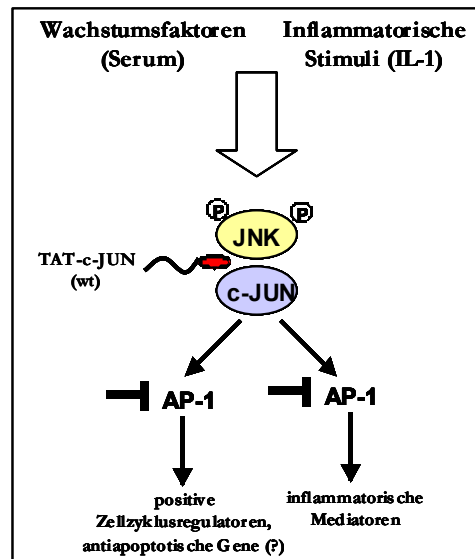


Abbildung 48: Manipulation der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen auf der Ebene des c-JUN-JNK-Komplexes durch ein zellpermeables Peptid

Die Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren bzw. inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 kann auf der Ebene des c-JUN-JNK-Komplexes durch ein zellpermeables Peptid unterbrochen werden. Dieses führt entweder zur Blockade von Proliferation und Zellüberleben oder zur Inhibition verschiedener entzündlicher Gene. Die Unterbrechung der Signalkaskade unterhalb von JNKs kann somit potentiell zur Behandlung von proliferativen Krankheitsbildern oder zur Manipulation der Entzündungsantwort eingesetzt werden.

4.2 Tandem affinity purification als Methode zur Darstellung von Proteinkomplexen

Trotz der intensiven Erforschung von JNK bedürfen eine Reihe von Aspekten der molekularen Regulation dieses Signalweges der weiteren Aufklärung. Dazu gehört einerseits die weitere Identifikation von JNK-regulierten Genen. Durch den Einsatz des zellpermeablen c-JUN-Peptides und des JNK-Inhibitors konnte dazu im Kontext der IL-1-abhängigen Genexpression ein entscheidender Beitrag geleistet werden. Zum anderen Bedarf es der weiteren Identifikation von JNK-Substraten. So sind für den ERK-Signalweg z.B. mehr als 100 Substrate bekannt (Lewis et al., 2000), ähnliches gilt für den p38-MAP-Kinase-Signalweg (Shi and Gaestel, 2002). Es ist daher schwer vorstellbar, dass die Vielzahl an Stimuli, die JNK aktivieren, dieses über nur ein knappes Dutzend Proteinsubstrate bewirken.

Zur Identifikation von JNK-interagierenden Proteinen und damit von JNK-Substraten stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. So könnte auch ein *yeast two hybrid screen* eingesetzt werden. Dabei werden jedoch transiente, stimulus- und modifikationsabhängige Veränderungen, die in Säugerzellen stattfinden, nicht gemessen. Dieses wird zwar durch die Anwendung der

Koimmunopräzipitation ermöglicht, allerdings haben die aufgereinigten Fraktionen einen relativ geringen Reinheitsgrad. Es wurde daher ein anderer biochemischer Zugang gewählt, bei dem über zwei aufeinanderfolgende Affinitätschromatographie-Schritte Proteinkomplexe, die sich an ektopisch überexprimierten Zielproteinen bilden, aus intakten Zellen in nativer Form isoliert und anschließend *in vitro* nachuntersucht werden können. In Hefen konnte diese als *tandem affinity purification* bezeichnete (TAP) Methode (vergl. "Material und Methoden") bereits erfolgreich zur Isolierung von bis zu 200 Multiproteinkomplexen eingesetzt werden (Gavin et al., 2002). Im Vergleich dazu gibt es jedoch nur wenige Berichte über die Anwendung dieser Technik in Säugerzellen.

Die TAP-Technik konnte hier erfolgreich für die Aufreinigung eines katalytisch aktiven JNK-TAPtag-Fusionsproteins aus HEK293 IL-1R-Zellen adaptiert und im analytischen Maßstab zur Darstellung von JNK-Substraten eingesetzt werden.

Abb.35-38 beschreiben die Klonierung des Vektors pIND-JNK2TAPtag und des Kontrollvektors pIND-LacZTAPtag, durch die die regulierbare Expression der Proteine JNK2-TAPtag und β -Galaktosidase-TAPtag möglich ist. Für die Etablierung der TAP-Methode wurde dabei auf ein regulierbares Expressionssystem zurückgegriffen. Diese Variante wurde deshalb gewählt, da in Hefen die Möglichkeit besteht, die Expression von TAP-Fusionsproteinen durch den endogenen Genpromotor zu steuern, indem das Transgen in den endogenen Genlocus plaziert wird. Auf diese Weise werden stimulusabhängig physiologische Mengen der Fusionsproteine exprimiert. Da auch in Säugerzellen die Möglichkeit besteht, dass die stöchiometrischen Verhältnisse in einem Proteinkomplex wichtig für dessen Stabilität sind, wurde mit dem pIND-System gearbeitet, welches für andere Fragestellungen bereits in unserer Arbeitsgruppe verwendet wurde (Wolter et al., 2002).

Eine weitere wichtige Frage bei der Etablierung der TAP-Technik war die Auswahl des geeigneten Zelltyps. Für die initialen Experimente sollte zunächst mit einer gut transfizierbaren Zelllinie gearbeitet werden, da dies die Gewinnung von JNK-TAPtag in ausreichenden Mengen garantieren sollte. Da die Isolierung von JNK-interagierenden Proteinen außerdem in Abhängigkeit des proinflammatorischen Zytokins IL-1 erfolgen sollte, musste eine IL-1-responsive Zelllinie ausgewählt werden. Schließlich musste diese Zelllinie noch auf Ponasteron antworten, um die Expression vom minimalen Hitzeshock-Promotor des pIND-Plasmides zu ermöglichen. Eine solche Zelllinie lag zu Beginn der Arbeiten nicht vor, so dass parallel zur Klonierung der pIND-Plasmide die Zelllinie HEK293 IL-1R/pVgRxR generiert wurde (vgl. Abb.39A), die alle nötigen Eigenschaften aufweist; namentlich die hohe Transfektionseffizienz der HEK293-Zellen, die IL-1-Responsivität durch stabile Transfektion der cDNA für den IL-1-Rezeptor und die Ponasteron-Responsivität durch stabile Transfektion des Plasmides pVgRxR. Diese Zelllinie wurde zunächst durch Expression von katalytisch aktiver β -Galaktosidase-TAPtag evaluiert (vgl. Abb.39B) und zur Ponasteron-abhängigen Expression von JNK-TAPtag verwendet (vgl. Abb.40).

Zur Adaption eines Protokolls zur Aufreinigung von JNK-TAPtag und JNK-interagierenden Proteinen wurde auf publizierte Arbeiten zurückgegriffen, wobei jedoch einige Änderungen vorgenommen wurden. So wurden die Zellen zur Lyse in einem hypoosmolaren Puffer schwellen gelassen und in der Folge durch einen zweiten Puffer mit einer sehr geringen Detergenzkonzentration von 0,05% aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde durch Scherkräfte vervollständigt. Diese besonders schonende Methode der Zellyse sollte dem Erhalt von Protein-Protein-Interaktionen dienen. Zudem wurden verschiedene Inkubationsschritte im Verhältnis zu Originalprotokollen verkürzt, um eine Degradation von Proteinen zu verhindern. Besonders die Adsorption der Zielproteine in die IgG-Matrix wurde statt für 18h für 2h durchgeführt. Die gesamte Aufreinigung einschließlich der Zellyse konnte somit innerhalb eines Tages durchgeführt werden.

Im Westernblot konnte die erfolgreiche Aufreinigung von JNK-TAPtag sowie von phosphoryliertem JNK-TAPtag gezeigt werden (vgl. Abb.41) Beide Proteine konnten im letzten Schritt von der Calmodulin-Matrix eluiert werden. In einem ergänzenden Experiment konnte zudem die hohe Effizienz dieser Prozedur gezeigt werden. Das Zielprotein JNK-TAPtag war am Ende der Aufreinigung fast vollständig im Eluat zu finden, Verluste durch eine unvollständige Adsorption an die IgG- oder Calmodulin-Matrix traten dabei ebensowenig auf wie Verluste durch eine unvollständige Abspaltung bzw. Elution (Daten nicht gezeigt).

Da die Elution unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde, sollte die katalytische Aktivität von JNK-TAPtag nach IL-1-Stimulation der Zellen überprüft werden. In Abb.42 wird deutlich, dass die Kinaseaktivität von JNK bis zur letzten Fraktion konserviert werden konnte. Die Hemmung der Phosphorylierung von GST-c-JUN (1-135) durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid demonstriert zudem die Spezifität des Systems und stellt außerdem eine Ergänzung zu dem in Abb.18C vorgestellten Kinaseversuch dar.

Durch diese Art des experimentellen Zugangs eröffnete sich also die Möglichkeit, Substrate von JNK, die potentiell im Eluat der TAP-Aufreinigung vorlagen, durch Phosphorylierung *in vitro* sichtbar zu machen. Dieses konnte für zwei Proteine auch demonstriert werden (vgl. Abb.43). Sowohl die Phosphorylierung des 55kD großen Substrates als auch die Phosphorylierung des 30kD großen Substrates konnte spezifisch durch Hemmung der JNK-Aktivität mit SP600125 inhibiert werden, ein Hinweis darauf, dass es sich um direkte JNK-Substrate handelt. Zudem verdeutlicht dieses Experiment den hohen Aufreinigungsgrad der TAP-Aufreinigung, da ausschließlich die Autophosphorylierung von JNK-TAP sowie die Phosphorylierung dieser zwei JNK-Substrate detektiert wurde. Wird die gleiche Kinasereaktion vor der Aufreinigung durchgeführt, so tauchen eine Vielzahl unspezifischer Banden in der Autoradiographie auf (vgl. Abb.42; Bahn 1 und Bahn 2 in Teilabbildung A).

Aus der Hemmung der Phosphorylierung von GST-c-JUN (1-135) durch TAT-c-JUN (wt) (vgl. Abb.42B) läßt sich schlussfolgern, dass dieses direkt an JNK-TAPtag bindet. Der direkte Nachweis dieser Bindung konnte durch die Zugabe von TAT-c-JUN (wt) zur JNK-TAPtag, welches an der Calmodulin-Matrix immobilisiert wurde, geführt werden (vgl. Abb.44). Die Analyse des Ergebnisses lässt zwei wichtige Schlußfolgerungen zu. Zum einen bestätigt es den

Mechanismus über den TAT-c-JUN (wt) zur Hemmung von JNK führt, nämlich durch direkte Bindung, und verdeutlicht die Spezifität im Verhältnis zu TAT-c-JUN (scr.). Zum anderen steht dieses Ergebnis im Einklang mit der Phosphorylierung von JNK-Substraten in Abb.43, da das etablierte Protokoll offensichtlich dazu geeignet ist, JNK-bindende Proteine im Komplex mit JNK von der Calmodulin-Matrix zu eluieren.

Durch eine Erhöhung der eingesetzten Zellmenge um das 20-fache sollten sequenzierbare Mengen an JNK-bindenden Proteinen aus IL-1-stimulierten Zellen isoliert werden. Die Ermittlung der Peptidmassen erfolgte durch Dr. Robin Wait in London. In einer Reihe von Vorversuchen wurde festgestellt, dass eine Proteinmenge, die in einer SYPRO Ruby-Färbung noch schwach sichtbar ist, in der Regel für eine Identifikation ausreicht. Die Sensitivität von SYPRO Ruby liegt dabei zwischen der von Coomassie und Silber. Acht der eingeschickten Banden konnten identifiziert werden (vgl. Abb.45). Drei Banden stellten Artefakte aus der Aufreinigung dar (Bande 1,5 und 9). Zwei weitere Banden wurden Zytoskelettproteinen zugeordnet. Solche Proteine werden aufgrund der Tatsache, dass sie in hohen Mengen in Zellen exprimiert werden, häufig mitaufgereinigt.

Somit stellen lediglich die drei verbleibenden Banden relevante Proteine dar. JNK-TAPtag (Bande 7a und 7b) konnte in hohen Mengen isoliert werden, was die Effizienz der Aufreinigung zeigt. Bande 3 stellt eine JNK-Isoform dar und ist somit ein Hinweis auf das Vorliegen von endogenen JNK-Dimeren. Die Dimerisierung von ERK2 im Zuge seiner Phosphorylierung wurde bereits gezeigt und erhöht dessen Translokation in den Kern. Auch für JNK wurde das Vorliegen von Dimeren vorgeschlagen (Khokhlathev et al., 1998). Dieses Ergebnis ist besonders vor dem Hintergrund, dass die Aufreinigung mit Material von IL-1-stimulierten Zellen durchgeführt wurde wichtig, da somit phosphorylierte JNK-TAPtag und phosphorylierte endogene JNKs vorlagen. Das Indiz für das Vorliegen von JNK-Dimeren stützt das in Abb.3 vorgestellte, hypothetische Modell des c-JUN-JNK-Komplexes, in dem jeweils ein c-JUN-Homodimer mit einem JNK-Homodimer interagiert, was zu einem Komplex maximaler Stabilität führt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Bande 3 ein Fragment von JNK-TAPtag darstellt. Dieses ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da in der Regel C-terminale Fragmente von überexprimierten Proteinen gefunden werden, die aus einem vorzeitigen Abbruch der Translation rühren. Solche C-terminalen Deletionsmutanten von JNK-TAPtag könnten jedoch unmöglich durch die TAP-Prozedur aufgereinigt werden, da ihnen der TAPtag fehlen würde oder nur unvollständig vorhanden wäre.

Bande 8 wurde dem humanen Hitzeschockprotein HSP-70 zugeordnet. Die Bindung dieses Chaperons könnte aus der starken Überexpression von JNK-TAPtag und seiner etwaigen Fehlfaltung resultieren. In einem parallel durchgeführten TAP-Ansatz mit TAB1-TAPtag als Fängerprotein wurde ebenfalls HSP-70 gefunden, was diese Vermutung weiter unterstützt. Nichtsdestotrotz existieren auch Hinweise dafür, dass die antiapoptische Wirkung von HSP-70 in verschiedenen zellulären Kontexten auf der Hemmung der JNK-Aktivität beruht (Kumar and Tatu, 2003; Mosser et al., 2000), so dass eine Interaktion von JNK und HSP-70 auch vor einem

physiologischen Hintergrund stattfinden kann. Um eine Aussage über die Signifikanz der JNK-HSP-70-Interaktion zu machen, müßte diese daher unter verschiedenen experimentellen Bedingungen überprüft werden. Dazu könnten z.B. die Verwendung unterschiedlicher Stimuli gehören oder der Vergleich von unstimulierten und stimulierten Proben. Zudem könnte die Menge von JNK-TAPtag durch das pIND-System variiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse des präparativen Ansatzes trotz der vielversprechenden initialen Experimente im analytischen Maßstab enttäuschend waren. Keines der isolierten Proteine stellt einen Transkriptionsfaktor, eine Kinase oder ein anderes Enzym dar, die zur Klärung von JNK-Funktionen hätten herangezogen werden können. Dafür kann es mehrere Ursachen geben. Falls die Bedingungen bei der Aufarbeitung zu stringent sind, gehen schwachen Wechselwirkungen verloren. Um ein Zerfallen der Proteinkomplexe in ihre Einzelkomponenten zu vermeiden, könnte daher die Menge an Detergenz weiter verringert werden, oder es könnten stabilisierende Substanzen wie Glycerol zugesetzt werden. Da die Bildung von Proteinkomplexen zudem Gleichgewichtsreaktionen sind, könnte auch die Erhöhung der Proteinkonzentration im Ausgangslysat zu einer Stabilisierung führen.

Zusätzlich zu den Variationen am eigentlichen Aufreinigungsschema, könnte auch das prinzipielle Vorgehen überdacht werden. Die Expression von JNK-TAPtag erfolgte hier nach transienter Transfektion. Bei einer durchschnittlichen Transfektionseffizienz von 30-40% in HEK293-Zellen muß bedacht werden, dass die Isolierung von Proteinkomplexen im Prinzip nur aus einem Drittel der eingesetzten Zellmengen möglich ist und man eventuell noch unterhalb der nötigen Detektionsschwelle liegt. Die Herstellung stabiler Zelllinien könnte hier einen Ausweg darstellen, allerdings war dieses mit dem Vektor pIND-JNK-TAPtag bisher nicht möglich. Außerdem könnten gerade die Proteine, die in Zellen nur in sehr geringen Mengen vorliegen, die möglicherweise interessanten regulatorischen Strukturen sein. Deren Menge wird durch Überexpression des TAP-Fusionsproteins jedoch nicht gesteigert, so dass tatsächlich sehr große Zellmengen zur Aufreinigung dieser Proteine eingesetzt werden müßten.

Die Hauptursache für die Komplikationen beim Einsatz der TAP-Technik in Säugerzellen ist jedoch vermutlich eine andere. In der Hefe werden die TAP-Fusionsproteine nach homologer Rekombination unter dem endogenen Genpromotor exprimiert. Dieses hat zwei entscheidende Vorteile. Erstens werden physiologische Mengen des Fängerproteins exprimiert und zweitens konkurriert das TAP-Fusionsprotein nicht mit dem unmarkierten, endogenen Protein um die zu isolierenden Bindungspartner. Um diesen Ansatz auf Säugerzellen zu übertragen, müsste die Menge des endogenen Proteins durch RNAi abgesenkt werden, was jedoch für die Aufarbeitung größerer Zellmengen hohe Kosten verursacht und technisch ein sehr komplexes Experiment darstellt (Forler et al., 2003). Alternativ könnte die Isolierung auch aus Zellen von Mäusen erfolgen, die defizient für das gewählte Fängerprotein sind. Prinzipiell stellt die TAP-Methode also auch zur Darstellung von Proteinkomplexen aus Säugerzellen eine neue, vielversprechende Methode dar, die allerdings auf verschiedenen Ebenen der jeweiligen Fragestellung angepaßt werden muss.

4.3 Ausblick

Aus den beschriebenen Effekten des TAT-c-JUN (wt) Peptides ergeben sich eine Vielzahl weiterer möglicher Vorgehensweisen. Aufgrund der Biopermeabilität des Peptides würde es sich prinzipiell zum Einsatz in Tiermodellen eignen. Zuvor sollten jedoch noch einige mechanistische Untersuchungen zur Bestätigung der beobachteten Effekte durchgeführt werden. Nötig wäre z.B. eine Zellzyklusanalyse von Zellen, die für verschiedene Zeitspannen mit dem TAT-c-JUN (wt) Peptid behandelt wurden. Solche Versuche wurden im Zuge dieser Arbeit bereits durchgeführt, waren jedoch aufgrund der Fluorescein-Markierung der Peptide nicht auswertbar, so dass zunächst eine neue Synthese durchgeführt werden müsste. Aufgrund des hochspezifischen apoptischen Effektes könnte das c-JUN-Peptid in Tumormodellen eingesetzt werden, zumal es eindeutige Hinweise dafür gibt, dass c-JUN an der Tumorentstehung beteiligt ist (Zenz et al., 2003; Eferl et al., 2003).

Ein weiterer wichtiger offener Punkt ist der Nachweis der Hemmung der IL-1-induzierten c-JUN-Phosphorylierung durch das TAT-c-JUN (wt) Peptid. Eine Hemmung der Phosphorylierung an Position Serin 63 konnte mit dem bisher zur Verfügung stehenden Antikörper nicht detektiert werden. Erst seit kurzem existieren Antikörper zur Untersuchung aller bekannten c-JUN-Phosphorylierungsstellen (Morton et al., 2003), zu denen die Arbeitsgruppe nun Zugang hat. Die systematische Analyse aller Phosphorylierungsstellen nach Behandlung von Zellen mit verschiedenen Stimuli und den zellpermeablen Peptiden ist bereits geplant. Zusätzlich ergibt sich dadurch auch die Möglichkeit, den Mechanismus der selektiven Hemmung der IL-1-induzierten MCP-1-Expression im Vergleich zum IL-8-Gen zu untersuchen. Durch Chromatin-Immunopräzipitations-Versuche (*Chip-Assay*) könnte systematisch der Besatz der bekannten AP-1-Stellen mit c-JUN und den verschiedenen phospho-c-JUN-Formen in den Promotoren von MCP-1 und IL-8 untersucht werden. Zusätzlich könnte der Einfluss von TAT-c-JUN (wt) auf den Promotorbesatz analysiert werden. Aufgrund seines antiinflammatorischen Effekts eignet sich das c-JUN-Peptid darüberhinaus auch zum Einsatz in akuten oder chronischen Entzündungsmodellen der Maus.

Die Methode der *tandem affinity purification* stellt theoretisch einen relativ schnellen und einfachen Ansatz zur Isolierung von Interaktionspartnern eines bestimmten Proteins dar. Es bleibt abzuwarten, wie inwieweit sich diese Technik durchsetzen wird. Doch gerade neuere Veröffentlichungen weisen auf einen erfolgreichen Einsatz auch in Säugierzellen hin (Westermarck et al., 2002; Taoka et al., 2003; Cox et al., 2002a; Basu et al., 2003).

Falls es gelingen sollte, nach Modifikation des Ansatzes interessante JNK-bindende Proteine zu isolieren, schließen sich eine Vielzahl von Folgeexperimenten direkt an. Nach Klonierung der entsprechenden cDNAs sollte die Interaktion mit JNK durch alternative Methoden *in vitro* nachgewiesen werden, wie z.B. durch den Einsatz von GST-Fusionsproteinen oder Koimmunopräzipitationen. Ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion *in vivo* könnte durch Kolokalisationsstudien in intakten Zellen durch Immunfluoreszenz erhalten werden. Durch die Herstellung von Deletionsmutanten könnten die Interaktionsdomänen mit JNK bestimmt

werden. Die Funktionen könnten beispielsweise durch RNAi oder zellpermeable Peptide, die die Bindung an JNK stören, sowie transgene Mausmodelle aufgeklärt werden.

5 Literaturverzeichnis

Adler,V. and Kraft,A.S. (1992). Affinity-purified c-JUN amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* 267, 17001-17005

Adler,V., Unlap,T., and Kraft,A.S. (1994). A peptide encoding the c-Jun delta domain inhibits the activity of a c-jun amino-terminal protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 11186-11191.

Allavena,P., Bianchi,G., Zhou,D., van Damme,J., Jilek,P., Sozzani,S., and Mantovani,A. (1994). Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 24, 3233-3236.

Alvarez,E., Northwood,I.C., Gonzalez,F.A., Latour,D.A., Seth,A., Abate,C., Curran,T., and Davis,R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 266, 15277-15285.

Angel,P., Baumann,I., Stein,B., Delius,H., Rahmsdorf,H.J., and Herrlich,P. (1987a). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell Biol.* 7, 2256-2266.

Angel,P., Imagawa,M., Chiu,R., Stein,B., Imbra,R.J., Rahmsdorf,H.J., Jonat,C., Herrlich,P., and Karin,M. (1987b). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.

Arbour,N., Nanche,D., Homann,D., Davis,R.J., Flavell,R.A., and Oldstone,M.B. (2002). c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 signaling pathways have divergent roles in CD8(+) T cell-mediated antiviral immunity. *J. Exp. Med.* 195, 801-810.

Bain,J., McLauchlan,H., Elliott,M., and Cohen,P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 371, 199-204.

Bakiri,L., Lallemand,D., Bossy-Wetzel,E., and Yaniv,M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.* 19, 2056-2068.

Basu,S., Totty,N.F., Irwin,M.S., Sudol,M., and Downward,J. (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 11, 11-23.

- Behrens,A., Sibilio,M., David,J.P., Mohle-Steinlein,U., Tronche,F., Schutz,G., and Wagner,E.F. (2002). Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J.* 21, 1782-1790.
- Behrens,A., Sibilio,M., and Wagner,E.F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* 21, 326-329.
- Bennett,B.L., Sasaki,D.T., Murray,B.W., O'Leary,E.C., Sakata,S.T., Xu,W., Leisten,J.C., Motiwala,A., Pierce,S., Satoh,Y., Bhagwat,S.S., Manning,A.M., and Anderson,D.W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 13681-13686.
- Berlose,J.P. and Chassaing,G. (1996). Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.* 242, 372-386.
- Blank,J.L., Gerwins,P., Elliott,E.M., Sather,S., and Johnson,G.L. (1996). Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 5361-5368.
- Bonny,C., Nicod,P., and Waeber,G. (1998). IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 273, 1843-1846.
- Bucci,M., Gratton,J.P., Rudic,R.D., Acevedo,L., Roviezzo,F., Cirino,G., and Sessa,W.C. (2000). In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat. Med.* 6, 1362-1367.
- Burack,W.R. and Shaw,A.S. (2000). Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 211-216.
- Cao,G., Pei,W., Ge,H., Liang,Q., Luo,Y., Sharp,F.R., Lu,A., Ran,R., Graham,S.H., and Chen,J. (2002). In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J. Neurosci.* 22, 5423-5431.
- Carr,M.W., Roth,S.J., Luther,E., Rose,S.S., and Springer,T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3652-3656.
- Chang,L. and Karin,M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Cheung,P.C., Campbell,D.G., Nebreda,A.R., and Cohen,P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J.* 22, 5793-5805.
- Chida,K., Nagamori,S., and Kuroki,T. (1999). Nuclear translocation of Fos is stimulated by interaction with Jun through the leucine zipper. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 297-302.
- Chinenov,Y and Kerppola, T.K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos:Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity: *Oncogene* 20, 2438-2452.
- Chu,W.M., Ostertag,D., Li,Z.W., Chang,L., Chen,Y., Hu,Y., Williams,B., Perrault,J., and Karin,M. (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* 11, 721-731.

- Cohen,P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 309-315.
- Console,S., Marty,C., Garcia-Echeverria,C., Schwendener,R., and Ballmer-Hofer,K. (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 278, 35109-35114.
- Conze,D., Krahl,T., Kennedy,N., Weiss,L., Lumsden,J., Hess,P., Flavell,R.A., Le Gros,G., Davis,R.J., and Rincon,M. (2002). c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J. Exp. Med.* 195, 811-823.
- Cox,D.M., Du,M., Guo,X., Siu,K.W., and McDermott,J.C. (2002). Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells. *Biotechniques* 33, 267-8, 270.
- Davis,R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 14553-14556.
- Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- Deng,T. and Karin,M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.* 7, 479-490.
- Deng,T. and Karin,M. (1993). JunB differs from c-JUN in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-JUN by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.* 7, 479-490.
- Denicourt,C. and Dowdy,S.F. (2003). Protein transduction technology offers novel therapeutic approach for brain ischemia. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 216-218.
- Derijard,B., Hibi,M., Wu,I.H., Barrett,T., Su,B., Deng,T., Karin,M., and Davis,R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- Derijard,B., Raingeaud,J., Barrett,T., Wu,I.H., Han,J., Ulevitch,R.J., and Davis,R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.
- Derossi,D., Calvet,S., Trembleau,A., Brunissen,A., Chassaing,G., and Prochiantz,A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271, 18188-18193.
- Derossi,D., Joliot,A.H., Chassaing,G., and Prochiantz,A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444-10450.
- Derossi,D. and Prochiantz,A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* 8, 84-87.
- Dickens,M., Rogers,J.S., Cavanagh,J., Raitano,A., Xia,Z., Halpern,J.R., Greenberg,M.E., Sawyers,C.L., and Davis,R.J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277, 693-696.
- Dong,C., Yang,D.D., Tournier,C., Whitmarsh,A.J., Xu,J., Davis,R.J., and Flavell,R.A. (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 405, 91-94.

- Dong,C., Yang,D.D., Wysk,M., Whitmarsh,A.J., Davis,R.J., and Flavell,R.A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282, 2092-2095.
- Donovan,N., Becker,E.B., Konishi,Y., and Bonni,A. (2002). JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J. Biol. Chem.* 277, 40944-40949.
- Dunn,C., Wiltshire,C., MacLaren,A., and Gillespie,D.A. (2002). Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal.* 14, 585-593.
- Eferl,R., Ricci,R., Kenner,L., Zenz,R., David,J.P., Rath,M., and Wagner,E.F. (2003). Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112, 181-192.
- Eferl,R., Sibia,M., Hilberg,F., Fuchsbichler,A., Kufferath,I., Guertl,B., Zenz,R., Wagner,E.F., and Zatloukal,K. (1999). Functions of c-Jun in liver and heart development. *J. Cell Biol.* 145, 1049-1061.
- Elliott,G. and O'Hare,P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223-233.
- Endo,H., Akahoshi,T., Takagishi,K., Kashiwazaki,S., and Matsushima,K. (1991). Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. *Lymphokine Cytokine Res.* 10, 245-252.
- Fan,M., Goodwin,M., Vu,T., Brantley-Finley,C., Gaarde,W.A., and Chambers,T.C. (2000). Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J. Biol. Chem.* 275, 29980-29985.
- Fawell,S., Seery,J., Daikh,Y., Moore,C., Chen,L.L., Pepinsky,B., and Barsoum,J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 664-668.
- Finch,A., Davis,W., Carter,W.G., and Saklatvala,J. (2001). Analysis of mitogen-activated protein kinase pathways used by interleukin 1 in tissues in vivo: activation of hepatic c-Jun N-terminal kinases 1 and 2, and mitogen-activated protein kinase kinases 4 and 7. *Biochem. J.* 353, 275-281.
- Finzer,P., Soto,U., Delius,H., Patzelt,A., Coy,J.F., Poustka,A., zur,H.H., and Rosl,F. (2000). Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition. *Oncogene* 19, 3235-3244.
- Fittipaldi,A., Ferrari,A., Zoppe,M., Arcangeli,C., Pellegrini,V., Beltram,F., and Giacca,M. (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 34141-34149.
- Forler,D., Kocher,T., Rode,M., Gentzel,M., Izaurrealde,E., and Wilm,M. (2003). An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat. Biotechnol.* 21, 89-92.
- Ganiatsas,S., Kwee,L., Fujiwara,Y., Perkins,A., Ikeda,T., Labow,M.A., and Zon,L.I. (1998). SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 6881-6886.

- Gartner,A., Nasmyth,K., and Ammerer,G. (1992). Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* 6, 1280-1292.
- Gavin,A.C., Bosche,M., Krause,R., Grandi,P., Marzioch,M., Bauer,A., Schultz,J., Rick,J.M., Michon,A.M., Cruciat,C.M., Remor,M., Hofert,C., Schelder,M., Brajenovic,M., Ruffner,H., Merino,A., Klein,K., Hudak,M., Dickson,D., Rudi,T., Gnau,V., Bauch,A., Bastuck,S., Huhse,B., Leutwein,C., Heurtier,M.A., Copley,R.R., Edelman,A., Querfurth,E., Rybin,V., Drewes,G., Raida,M., Bouwmeester,T., Bork,P., Seraphin,B., Kuster,B., Neubauer,G., and Superti-Furga,G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Ge,B., Xiong,X., Jing,Q., Mosley,J.L., Filose,A., Bian,D., Huang,S., and Han,J. (2003). TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1. *J. Biol. Chem.* 278, 2286-2293.
- Georganas,C., Liu,H., Perlman,H., Hoffmann,A., Thimmapaya,B., and Pope,R.M. (2000). Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J. Immunol.* 165, 7199-7206.
- Green,M. and Loewenstein,P.M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1179-1188.
- Gupta,S. and David,R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 15, 2760-2770.
- Halazonetis,T.D., Georgopoulos,K., Greenberg,M.E., and Leder,P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917-924.
- Han,H., Fuortes,M., and Nathan,C. (2003). Critical role of the carboxyl terminus of proline-rich tyrosine kinase (Pyk2) in the activation of human neutrophils by tumor necrosis factor: separation of signals for the respiratory burst and degranulation. *J. Exp. Med.* 197, 63-75.
- Hanks,S.K., Quinn,A.M., and Hunter,T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Herskowitz,I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.
- Hibi,M., Lin,A., Smeal,T., Minden,A., and Karin,M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135-2148.
- Hochuli,E., Dobeli,H., and Schacher,A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411, 177-184.
- Hoffmann,E., Dittrich-Breiholz,O., Holtmann,H., and Kracht,M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 72, 847-855.
- Holland,P.M. and Cooper,J.A. (1999). Protein modification: docking sites for kinases. *Curr. Biol.* 9, R329-R331.
- Holzberg,D., Knight,C.G., Dittrich-Breiholz,O., Schneider,H., Dorrie,A., Hoffmann,E., Resch,K., and Kracht,M. (2003). Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN

delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of interleukin-1-induced inflammatory genes. *J. Biol. Chem.* 278, 40213-40223.

Ishitani,T., Takaesu,G., Ninomiya-Tsuji,J., Shibuya,H., Gaynor,R.B., and Matsumoto,K. (2003). Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J.* 22, 6277-6288.

Jiang,Z., Ninomiya-Tsuji,J., Qian,Y., Matsumoto,K., and Li,X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol. Cell Biol.* 22, 7158-7167.

Johnson,G.L. and Lapadat,R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

Joliot,A., Pernelle,C., Deagostini-Bazin,H., and Prochiantz,A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 1864-1868.

Kallunki,T., Deng,T., Hibi,M., and Karin,M. (1996). c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87, 929-939.

Karin,M., Liu,Z., and Zandi,E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-246.

Karin,M. and Shaulian, E. (2001). AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB. Life* 52, 17-24.

Khokhlatchev,A.V., Canagarajah,B., Wilsbacher,J., Robinson,M., Atkinson,M., Goldsmith,E., and Cobb,M.H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-615.

Kishimoto,K. and Ninomiya-Tsuji,J. (2000). TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 7359-7364.

Koch,A.E., Kunkel,S.L., Harlow,L.A., Johnson,B., Evanoff,H.L., Haines,G.K., Burdick,M.D., Pope,R.M., and Strieter,R.M. (1992). Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* 90, 772-779.

Komatsu,Y., Shibuya,H., Takeda,N., Ninomiya-Tsuji,J., Yasui,T., Miyado,K., Sekimoto,T., Ueno,N., Matsumoto,K., and Yamada,G. (2002). Targeted disruption of the *Tab1* gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis. *Mech. Dev.* 119, 239-249.

Kracht,M. and Saklatvala,J. (2002). Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* 20, 91-106.

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

Kuan,C.Y., Yang,D.D., Samanta Roy,D.R., Davis,R.J., Rakic,P., and Flavell,R.A. (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.

- Kumar,Y. and Tatu,U. (2003). Stress protein flux during recovery from simulated ischemia: Induced heat shock protein 70 confers cytoprotection by suppressing JNK activation and inhibiting apoptotic cell death. *Proteomics*. 3, 513-526.
- Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Chem.* 265, 17355-17363.
- Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81, 807-869.
- Kyriakis,J.M., Banerjee,P., Nikolakaki,E., Dai,T., Rubie,E.A., Ahmad,M.F., Avruch,J., and Woodgett,J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Lawler,S., Fleming,Y., Goedert,M., and Cohen,P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr. Biol.* 8, 1387-1390.
- Leifert,J.A. and Whitton,J.L. (2002). Full-length proteins attached to the HIV tat protein transduction domain are neither transduced between cells, nor exhibit enhanced immunogenicity. *Gene Ther.* 9, 1422-1428.
- Lewis,T.S. and Ahn,N.G. (2000). Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol. Cell* 6, 1343-1354.
- Lin,A., Minden,A., Martinetto,H., Claret,F.X., Lange-Carter,C., Mercurio,F., Johnson,G.L., and Karin,M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268, 286-290.
- Lindgren,M., Hallbrink,M., Prochiantz,A., and Langel,U. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 99-103.
- Lindsay,M.A. (2002). Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 587-594.
- Manning,A.M. and Davis,R.J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 554-565.
- Matsushima,K., Larsen,C.G., DuBois,G.C., and Oppenheim,J.J. (1989). Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* 169, 1485-1490.
- May,G.H., Allen,K.E., Clark,W., Funk,M., and Gillespie,D.A. (1998). Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 33429-33435.
- May,M.J., D'Acquisto,F., Madge,L.A., Glockner,J., Pober,J.S., and Ghosh,S. (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I-kappaB kinase complex. *Science* 289, 1550-1554.
- Mochida,Y., Takeda,K., Saitoh,M., Nishitoh,H., Amagasa,T., Ninomiya-Tsuji,J., Matsumoto,K., and Ichijo,H. (2000). ASK1 inhibits interleukin-1-induced NF-kappa B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 32747-32752.

- Montgomery, M.K. and Fire, A. (1998). Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet.* 14, 255-258.
- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., and Hagiwara, M. (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* 271, 13675-13679.
- Morton, S. and Cohen, P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-JUN. *EMBO J.* 22, 3876-3886.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I., and Massie, B. (2000). The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 20, 7146-7159.
- Munoz-Sanjuan, I., Bell, E., Altmann, C.R., Vonica, A., and Brivanlou, A.H. (2002). Gene profiling during neural induction in *Xenopus laevis*: regulation of BMP signaling by post-transcriptional mechanisms and TAB3, a novel TAK1-binding protein. *Development* 129, 5529-5540.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Snyder, E.L., Ho, A., Latham, D.G., Lissy, N.A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S.A., and Dowdy, S.F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* 4, 1449-1452.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K., and Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell* 55, 907-915.
- Natarajan, R., Gupta, S., Fisher, B.J., Ghosh, S., and Fowler, A.A., III (2001). Nitric oxide suppresses IL-8 transcription by inhibiting c-Jun N-terminal kinase-induced AP-1 activation. *Exp. Cell Res.* 266, 203-212.
- Ono, K., Ohtomo, T., Sato, S., Sugamata, Y., Suzuki, M., Hisamoto, N., Ninomiya-Tsuji, J., Tsuchiya, M., and Matsumoto, K. (2001). An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK. *J. Biol. Chem.* 276, 24396-24400.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 10, 885-892.
- Pooga, M., Lindgren, M., Hallbrink, M., Brakenhielm, E., and Langel, U. (1998). Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 863, 450-453.
- Potapova, O., Gorospe, M., Bost, F., Dean, N.M., Gaarde, W.A., Mercola, D., and Holbrook, N.J. (2000a). c-Jun N-terminal kinase is essential for growth of human T98G glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 275, 24767-24775.
- Potapova, O., Gorospe, M., Dougherty, R.H., Dean, N.M., Gaarde, W.A., and Holbrook, N.J. (2000b). Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 20, 1713-1722.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J.R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.

- Ransohoff,R.M., Hamilton,T.A., Tani,M., Stoler,M.H., Shick,H.E., Major,J.A., Estes,M.L., Thomas,D.M., and Tuohy,V.K. (1993). Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 7, 592-600.
- Reynolds,C.H., Utton,M.A., Gibb,G.M., Yates,A., and Anderton,B.H. (1997). Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J. Neurochem.* 68, 1736-1744.
- Richard,J.P., Melikov,K., Vives,E., Ramos,C., Verbeure,B., Gait,M.J., Chernomordik,L.V., and Lebleu,B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585-590.
- Rigaut,G., Shevchenko,A., Rutz,B., Wilm,M., Mann,M., and Seraphin,B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17, 1030-1032.
- Ruben,S., Perkins,A., Purcell,R., Joung,K., Sia,R., Burghoff,R., Haseltine,W.A., and Rosen,C.A. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63, 1-8.
- Ryseck,R.P. and Bravo,R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6, 533-542.
- Sabapathy,K., Jochum,W., Hochedlinger,K., Chang,L., Karin,M., and Wagner,E.F. (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech. Dev.* 89, 115-124.
- Sakuari,H. and Sugita,T. (2002). TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase kinase that stimulates AP-1 and NF-kappaB signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 1277-1281.
- Sakurai,H., Miyoshi,H., Mizukami,J., and Sugita,T. (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett.* 474, 141-145.
- Sakurai,H., Miyoshi,H., Toriumi,W., and Sugita,T. (1999). Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 274, 10641-10648.
- Sakurai,H., Shigemori,N., Hasegawa,K., and Sugita,T. (1998). TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappa B-inducing kinase-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 545-549.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Sanjo,H., Takeda,K., Tsujimura,T., Ninomiya-Tsuji,J., Matsumoto,K., and Akira,S. (2003). TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling. *Mol. Cell Biol.* 23, 1231-1238.
- Sawada,M., Hayes,P., and Matsuyama,S. (2003). Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat. Cell Biol.* 5, 352-357.
- Schaeffer,H.J., Catling,A.D., Eblen,S.T., Collier,L.S., Krauss,A., and Weber,M.J. (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281, 1668-1671.

- Scheller,A., Oehlke,J., Wiesner,B., Dathe,M., Krause,E., Beyermann,M., Melzig,M., and Bienert,M. (1999). Structural requirements for cellular uptake of alpha-helical amphipathic peptides. *J. Pept. Sci.* 5, 185-194.
- Schreiber,M., Kolbus,A., Piu,F., Szabowski,A., Mohle-Steinlein,U., Tian,J., Karin,M., Angel,P., and Wagner,E.F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* 13, 607-619.
- Schwarze,S.R. and Dowdy,S.F. (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 45-48.
- Schwarze,S.R., Ho,A., Vocero-Akbani,A., and Dowdy,S.F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.
- Serfling,E., Barthelmas,R., Pfeuffer,I., Schenk,B., Zarius,S., Swoboda,R., Mercurio,F., and Karin,M. (1989). Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *EMBO J.* 8, 465-473.
- Shaulian,E., Schreiber,M., Piu,F., Beeche,M., Wagner,E.F., and Karin,M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103, 897-907.
- Shaulian,E. and Karin,M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131-E136.
- Shi,Y. and Gaestel,M. (2002). In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol. Chem.* 383, 1519-1536.
- Shibuya,H., Yamaguchi,K., Shirakabe,K., Tonegawa,A., Gotoh,Y., Ueno,N., Irie,K., Nishida,E., and Matsumoto,K. (1996). TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272, 1179-1182.
- Shirakabe,K., Yamaguchi,K., Shibuya,H., Irie,K., Matsuda,S., Moriguchi,T., Gotoh,Y., Matsumoto,K., and Nishida,E. (1997). TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 8141-8144.
- Southern,E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Takaesu,G., Ninomiya-Tsuji,J., Kishida,S., Li,X., Stark,G.R., and Matsumoto,K. (2001). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 21, 2475-2484.
- Takaesu,G., Surabhi,R.M., Park,K.J., Ninomiya-Tsuji,J., Matsumoto,K., and Gaynor,R.B. (2003). TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J. Mol. Biol.* 326, 105-115.
- Tanoue,T., Maeda,R., Adachi,M., and Nishida,E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J.* 20, 466-479.
- Taoka,M., Ichimura,T., Wakamiya-Tsuruta,A., Kubota,Y., Araki,T., Obinata,T., and Isobe,T. (2003). V-1, a protein expressed transiently during murine cerebellar development, regulates actin polymerization via interaction with capping protein. *J. Biol. Chem.* 278, 5864-5870.
- Theodosiou,A. and Ashworth,A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol.* 3, REVIEWS3009.

- Theodosiou,A., Smith,A., Gillieron,C., Arkinstall,S., and Ashworth,A. (1999). MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene* 18, 6981-6988.
- Thoren,P.E., Persson,D., Isakson,P., Goksoy,M., Onfelt,A., and Norden,B. (2003). Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 100-107.
- Thoren,P.E., Persson,D., Karlsson,M., and Norden,B. (2000). The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Lett.* 482, 265-268.
- Tournier,C., Dong,C., Turner,T.K., Jones,S.N., Flavell,R.A., and Davis,R.J. (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.* 15, 1419-1426.
- Tournier,C., Whitmarsh,A.J., Cavanagh,J., Barrett,T., and Davis,R.J. (1999). The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol. Cell Biol.* 19, 1569-1581.
- Treier,M., Staszewski,L.M., and Bohmann,D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78, 787-798.
- Wang,W., Zhou,G., Hu,M.C., Yao,Z., and Tan,T.H. (1997). Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J. Biol. Chem.* 272, 22771-22775.
- Waskiewicz,A.J., Flynn,A., Proud,C.G., and Cooper,J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 16, 1909-1920.
- Wasserman,J.D. and Freeman,M. (1998). An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the *Drosophila* egg. *Cell* 95, 355-364.
- Wender,P.A. and Rothbard,J.B. (2000). The design, synthesis and evaluation of molecules that enable or enhance uptake. peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13003-13008.
- Westermarck,J., Weiss,C., Saffrich,R., Kast,J., Musti,A.M., Wessely,M., Ansorge,W., Seraphin,B., Wilm,M., Valdez,B.C., and Bohmann,D. (2002). The DEXD/H-box RNA helicase RHIII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *EMBO J.* 21, 451-460.
- Whitmarsh,A.J. and Davis,R.J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 23, 481-485.
- Whitmarsh,A.J., Kuan,C.Y., Kennedy,N.J., Kelkar,N., Haydar,T.F., Mordes,J.P., Appel,M., Rossini,A.A., Jones,S.N., Flavell,R.A., Rakic,P., and Davis,R.J. (2001). Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev.* 15, 2421-2432.
- Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79, 143-180.

- Wisdom,R., Johnson,R.S., and Moore,C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 18, 188-197.
- Wolter,S., Mushinski,J.F., Saboori,A.M., Resch,K., and Kracht,M. (2002). Inducible expression of a constitutively active mutant of mitogen-activated protein kinase kinase 7 specifically activates c-JUN NH2-terminal protein kinase, alters expression of at least nine genes, and inhibits cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 277, 3576-3584.
- Xia,Y. and Karin,M. (2000). MEK kinase 1 is critically required for c-JUN N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5243-5248.
- Xu,S. and Cobb,M.H. (1997). MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 32056-32060.
- Yamaguchi,K., Shirakabe,K., Shibuya,H., Irie,K., Oishi,I., Ueno,N., Taniguchi,T., Nishida,E., and Matsumoto,K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- Yang,D.D., Conze,D., Whitmarsh,A.J., Barrett,T., Davis,R.J., Rincon,M., and Flavell,R.A. (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity.* 9, 575-585.
- Yang,D.D., Kuan,C.Y., Whitmarsh,A.J., Rincon,M., Zheng,T.S., Davis,R.J., Rakic,P., and Flavell,R.A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389, 865-870.
- Yujiri,T., Fanger,G.R., Garrington,T.P., Schlesinger,T.K., Gibson,S., and Johnson,G.L. (1999). MEK kinase 1 (MEKK1) transduces c-Jun NH2-terminal kinase activation in response to changes in the microtubule cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274, 12605-12610.
- Yujiri,T., Sather,S., Fanger,G.R., and Johnson,G.L. (1998). Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 282, 1911-1914.
- Yujiri,T., Ware,M., Widmann,C., Oyer,R., Russell,D., Chan,E., Zaitsev,Y., Clarke,P., Tyler,K., Oka,Y., Fanger,G.R., Henson,P., and Johnson,G.L. (2000). MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 7272-7277.
- Zenz,R., Scheuch,H., Martin,P., Frank,C., Eferl,R., Kenner,L., Sibilio,M., and Wagner,E.F. (2003). c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev. Cell* 4, 879-889.
- Zhao,Y., Bjorback,C., and Moller,D.E. (1996). Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 29773-29779.

6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: David Alexander Holzberg
Anschrift:: Berliner Allee 63, 30175 Hannover
Tel.: 0511/8112810
E-Mail: dahol@01019freenet.de
Geburtsdatum: 19.11.1974
Familienstand: ledig
Eltern: Alfred Herbert Holzberg und Maria Pilar Holzberg,
geborene Gamarra Garcia

Schulausbildung

1982 – 1986: Katholische Grundschule Innenstadt, Goslar
1986 – 1988: Orientierungsstufe Goetheschule, Goslar
1988 – 1994: Ratsgymnasium, Goslar

Wehrersatzdienst

1994-1995: Diakoniestation Goslar

Hochschulstudium

1995 – 2000: Studium der Biochemie an der Universität
Hannover
Mündliche Diplomprüfung: Mai 2000 mit der Note „sehr gut“
bestanden.
Diplomarbeit: von Juni 2000 bis November 2000
am Max Planck Institut für experimentelle Endokrinologie
mit dem Titel „Identifikation von Genen, welche die innere
Uhr beeinflussen“. Mit der Note „sehr gut“ bewertet; unter der
Anleitung von Prof. Dr. Urs Albrecht.

Anfertigung der Promotion: Seit Februar 2001 am Institut für allgemeine Pharmakologie
unter Anleitung von Prof. Dr. med. Michael Kracht

7 Liste wissenschaftlicher Publikationen

Artikel:

- **Holzberg D**, Knight G, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Hoffmann E, Resch K, Kracht M
Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN δ domain induces apoptosis and affects a distinct set of IL-1-induced inflammatory genes.
Journal of Biological Chemistry, 2003; Oct. 10; 278(41):40213-40223
- **Holzberg D**, Albrecht U.
The circadian clock: a manager of biochemical processes within the organism.
Journal Neuroendocrinol., 2003; Apr.15(4):339-43. Review.
- Tsikas D, Sandmann J, **Holzberg D**, Pantazis P, Raida M, Frölich JC.
Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde.
Anal. Biochem., 1999; Aug. 15;273(1):32-40.

Vorträge:

- **Holzberg D**, Knight G, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Hoffmann E, Resch K, Kracht M
Identification of c-JUN target genes by specific disruption of the c-JUN-JNK complex *in vivo*.
6th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, 7.11.-9.11.2002, Page 106
- **Holzberg D**, Knight G, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Hoffmann E, Resch K, **Kracht M**
Identification of c-JUN target genes by specific disruption of the c-JUN-JNK complex *in vivo*.
44th Joint Meeting of the German Society of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Mainz, 17.4.-20.4.2003, Page R58
- **Holzberg D**, Knight G, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Hoffmann E, Resch K, Kracht M
Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cellpermeable peptide affects a distinct set of IL-1-induced inflammatory genes.
Annual Meeting of the International Cytokine Society, Dublin, 20.09-24.09.2003, Page 22

Der präsentierende Autor ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, 19.12.2003

David Holzberg

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die hervorragende und motivierende Betreuung bei der Anfertigung dieser Dissertation, ein interessantes Thema und seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Resch für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für allgemeine Pharmakologie anzufertigen sowie ganz besonders Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves für die sofortige Übernahme des Referates.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Kracht, namentlich Axel, Daniela, Elke, Holger, Sabine und natürlich unserer Anneke für die freundliche Arbeitsatmosphäre während der letzten Jahre. Durch ihre Hilfestellungen sowie ihre ständige Bereitschaft, ihr Wissen mit mir zu teilen, hat jeder von ihnen zur erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit beigetragen. Den Mitarbeitern des Teilprojektes Z02 des Sonderforschungsbereiches 1765 Dr. Oliver Dittrich-Breiholz und Heike Schneider möchte ich für die Durchführung der *Microarray*-Analyse danken, sowie Dr. Graham Knight für die Synthese der verwendeten Peptide.

Besonders herzlich danken möchte ich den Menschen in meinem privaten Umfeld: meinen Freunden, allen voran Myriam und Thomas für die besten Freunde, die man sich wünschen kann und ganz besonders natürlich Jörg.

Zum Schluß meiner Familie, Michael und Svenja und meinen Eltern, durch deren ständige Unterstützung und Liebe ich mich zu dem Menschen entwickeln konnte, der ich heute bin.

David