

Regulation von MAPK Signalwegen durch die Serin/Threonin Kinase MLK3

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt

von Jörg Hartkamp

aus Sulingen

Würzburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1997 bis 2001 am Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. R. Rapp angefertigt. In der Fakultät für Biologie wurde die Arbeit durch Herrn Prof. Dr. G. Krohne vertreten.

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Jörg Hartkamp)

Inhaltsverzeichnis

1.	Summary	1
1.	Zusammenfassung	2
2.	Einleitung	
2.1.	MAP Kinase Signaltransduktionskaskaden.....	3
2.2.	Struktur, Regulation und Funktion des ERK Signalwegs.....	4
2.3.	Stress-aktivierte MAP Kinasen.....	7
2.3.1.	JNK/SAPK.....	7
2.3.2.	p38.....	9
2.4.	Die Rolle von Ras und Rho GTPasen in der Zelltransformation.....	10
2.5.	Funktionen von JNK/SAPK-gesteuerten Signalwegen in der Apoptose.....	13
2.6.	MAPKKs oberhalb von Stress-aktivierten MAP Kinase Kaskaden.....	14
2.7.	Mixed Lineage Kinasen.....	15
2.8.	Regulation der Mixed Lineage Kinasen.....	16
2.9.	Spezifität bei der Signaltransduktion durch MAP Kinasen.....	17
2.10.	Fragestellungen.....	18
3.	Material und Methoden	
3.1.	Arbeitsmaterial	
3.1.1.	Chemikalien und radioaktive Verbindungen.....	19
3.1.2.	Zellkulturmaterial.....	20
3.1.3.	Enzyme.....	20
3.1.4.	Größenmarker.....	21
3.1.5.	Antikörper.....	21
3.1.6.	Rekombinante Proteine.....	21
3.1.7.	Reagenziensätze.....	22
3.1.8.	Plasmide.....	22
3.1.9.	Zelllinien und Bakterienstämme.....	24
3.1.10.	Geräte.....	24
3.2.	Arbeitsmethoden	
3.2.1.	Bakterienkulturen.....	24
3.2.2.	Bestimmung der DNA Konzentration.....	25
3.2.3.	Konstruktion von Expressionsplasmiden.....	25
3.2.4.	Sequenzanalyse von DNA.....	27
3.2.5.	Maxipräparation von Plasmid DNA.....	28
3.2.6.	Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	28
3.2.7.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
3.2.8.	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
3.2.9.	Immunoblot.....	30
3.2.10.	Zellkultur: Haltung eukaryotischen Zelllinien in Kultur.....	31
3.2.11.	Transiente Transfektion von Säugerzellen.....	32
3.2.12.	Herstellung stabiler Zelllinien.....	32
3.2.13.	Soft-Agar Klonierung.....	33

3.2.14.	<i>in vivo</i> Phosphomarkierung von HeLa Zellen.....	33
3.2.15.	Immunpräzipitation.....	33
3.2.16.	" <i>in vitro</i> " Kinase-Assay.....	34
3.2.17.	Luciferase Test.....	34
3.2.18.	β -Galaktosidase Test.....	35

4. Ergebnisse

4.1. Identifizierung intrazellulärer MAPK Kaskaden, die durch MLK3 aktiviert werden

4.1.1.	MLK3 aktiviert die Transkription von AP-1/Ets-abhängigen Promotoren.	36
4.1.2.	Überexpression von MLK3 führt zur Raf-unabhängigen Aktivierung der MAPK ERK1.....	37
4.1.3.	MLK3-induzierte ERK Aktivierung ist abhängig von MEK.....	39
4.1.4.	MLK3 aktiviert die MAPK JNK/SAPK.....	40
4.1.5.	MLK3 phosphoryliert MEK1 und SEK1 <i>in vitro</i>	41
4.1.6.	MLK3 ist ein schwacher MEK-, aber ein starker SEK-Aktivator.....	43
4.1.7.	Enge Korrelation zwischen MLK3 vermittelter MEK1 Substrat-phosphorylierung <i>in vitro</i> und MEK1/2 Phosphorylierung auf Ser 217/221.....	44
4.1.8.	MLK3 phosphoryliert MEK1/2 <i>in vivo</i>	45
4.1.9.	Modulation von MLK3-vermittelter ERK Aktivierung durch MEK1 Mutanten.....	47
4.1.10.	MLK3 blockiert die Assoziation von MEK mit ERK.....	50
4.1.11.	MLK3-phosphoryliertes endogenes MEK1/2 ist inaktiv.....	51
4.1.12.	IL1 β und andere JNK/SAPK Aktivatoren entkoppeln MEK Phosphorylierung von ERK Aktivierung <i>in vivo</i>	53
4.1.13.	MLK3 Aktivierung durch die Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 führt zu JNK/SAPK Aktivierung und einer von ERK entkoppelten MEK Phosphorylierung.....	55

4.2. Überexpression von Wild Typ MLK3 transformiert NIH 3T3 Fibroblasten

4.2.1.	NIH 3T3 Fibroblasten, die MLK3 überexprimieren, sind morphologisch transformiert und bilden Kolonien in Soft Agar.....	57
4.2.2.	MEK und c-Jun sind konstitutiv phosphoryliert in MLK3-transformierten NIH 3T3 Fibroblasten.....	60
4.2.3.	Der MEK Inhibitor PD 098059 revertiert die transformierte Morphologie MLK3-exprimierender NIH 3T3 Fibroblasten partiell.....	62
4.2.4.	Synergistische Focibildung durch MLK3 und aktivierter MEK1.....	63
4.2.5.	Reduzierte ERK1/2 Aktivierung durch mitogene Stimuli in MLK3-transformierten Zellen.....	65
4.2.6.	MLK3 induzierte MEK Phosphorylierung blockiert Wachstumsfaktor-induzierte MEK Aktivierung.....	67

5. Diskussion

5.1.	MLK3 aktiviert JNK/SAPK und phosphoryliert und entkoppelt gleichzeitig die MAPK Kinasen MEK1/2 von ERK1/2 Aktivierung.....	69
5.2.	In MLK3 transformierten NIH 3T3 Fibroblasten ist Wachstumsfaktor-induzierte ERK Aktivierung blockiert.....	74
6.	Literaturangaben.....	79
	Anhang	
	Abkürzungen.....	93
	Danksagung.....	94
	Curriculum Vitae.....	95
	Publikationsverzeichnis.....	96

1. Summary

MAPK cascades play a key role in transducing and converting signals from extracellular stimuli into intracellular signals thereby regulating diverse processes like differentiation, proliferation or stress responses. Mixed lineage kinases (MLKs) form a family of serin/threonin protein kinases with multiple protein/protein interaction domains (SH3, Cdc42 Rac interactive binding sequence/CRIB, leucine zipper), which are most closely related to the MAPKK kinase family. In this work we show that MLK3 mediates Cdc42/Rac induced JNK/SAPK activation resulting in subsequent phosphorylation and enhanced transcriptional activity of the immediate early gene *c-jun*, which belongs to the family of AP-1 proteins. In addition MLK3 directly phosphorylates the dual specificity kinases MEK1/2 *in vitro* and *in vivo* on serines 217/221, which are important for activation. Whereas this only resulted in activation of the ERK1/2 pathway in overexpression systems, the analyses demonstrate convincingly that endogenous MEK1/2 phosphorylated by MLK3 is unable to transmit its activity *in vitro* and *in vivo* to its physiological substrat, ERK1/2. Therefore we postulate that MLK3 mediated MEK1/2 phosphorylation uncouples the dual specificity kinases from ERK1/2 activation.

Furthermore we show that overexpression of wild type MLK3 leads to morphological transformation of NIH 3T3 fibroblasts and growth in soft agar. Consistent with the other analyses MEK1/2 is highly phosphorylated but uncoupled from ERK1/2 activation in MLK3 transformed cells. In addition MLK3 cooperates with activated MEK1 in foci formation which demonstrates that MLK3 utilizes pathways different from ERK1/2 for cell transformation. Furthermore growth factor induced ERK1/2 activation and induction of the immediate early gene *junB* is partially blocked in MLK3 transformed fibroblasts. Our data provide evidence for the first time that a MAPKK kinase differentially regulates MAPK pathways. On the one hand MLK3 activates JNK/SAPK but on the other hand it uncouples MEK1/2 phosphorylation from ERK1/2 activation and even blocks growth factor induced ERK1/2 activation partially.

1. Zusammenfassung

MAPK Kaskaden spielen eine Schlüsselrolle bei der Übertragung und der Umwandlung von extrazellulären Reizen in intrazelluläre Signale und regulieren dadurch unterschiedliche Prozesse wie Differenzierung, Zellproliferation oder Stress Antworten. 'Mixed Lineage Kinasen' (MLKs) bilden eine Familie von Serin/Threonin Proteinkinasen mit mehreren Protein/Protein Interaktionsdomänen (SH3, Cdc42 Rac interactive binding sequence/CRIB, Leuzin Zipper), die am engsten mit der Familie der MAPKK Kinasen verwandt ist. In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass MLK3 Cdc42/Rac induzierte JNK/SAPK Aktivität vermittelt, welches zu einer anschließenden Phosphorylierung und verstärkter transkriptioneller Aktivität des zur AP-1 Familie gehörenden immediate early Gens c-Jun führt. Zusätzlich phosphoryliert MLK3 die dualspezifischen Kinasen MEK1/2 direkt *in vitro* und *in vivo* an den für die Aktivierung wichtigen Serinen 217/221. Wohingegen dies nur zu einer ERK Aktivierung in Überexpressionssystemen führte, demonstrieren die Analysen überzeugend, dass endogenes MEK1/2, welches von MLK3 phosphoryliert worden ist, nicht in der Lage ist, diese Aktivität auf das physiologische Substrat ERK1/2 *in vitro* wie auch *in vivo* zu übertragen. Wir postulieren daher, dass MLK3 vermittelte MEK1/2 Phosphorylierung die dualspezifischen Kinasen von ERK1/2 Aktivierung entkoppelt.

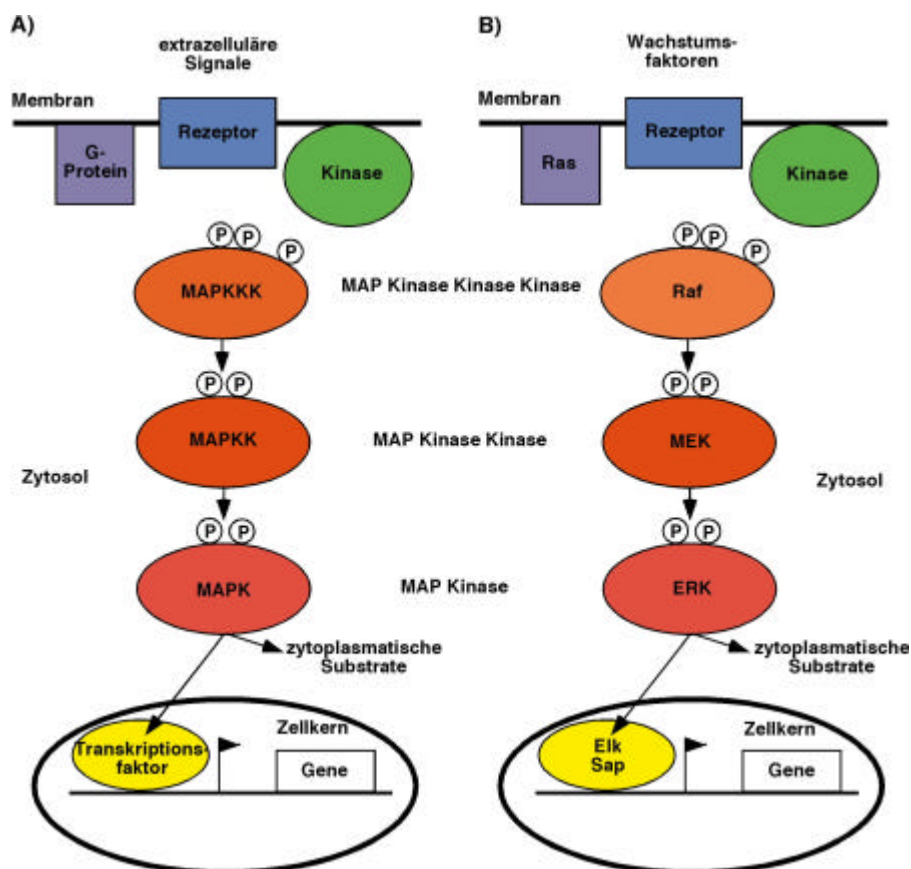
Zusätzlich zeigen wir, dass Überexpression von Wild Typ MLK3 zur morphologischen Transformation von NIH 3T3 Fibroblasten und Wachstum in Soft Agar führt. In Übereinstimmung mit den anderen Analysen ist MEK1/2 stark phosphoryliert jedoch von ERK1/2 Aktivierung in MLK3 transformierten Zellen entkoppelt. Weiterhin kooperiert MLK3 mit aktivierter MEK1 in Foci Bildung, was zeigt, dass MLK3 andere Signalwege als ERK1/2 in der Zelltransformation benutzt. Vielmehr ist in MLK3 transformierten Fibroblasten Wachstumsfaktor-induzierte ERK1/2 Aktivierung und Expression des immediate early Gens *junB* partiell blockiert. Unsere Analysen zeigen zum ersten Mal für eine MAPKK Kinase, dass sie MAPK Signalwege unterschiedlich reguliert. Während MLK3 auf der einen Seite JNK/SAPK aktiviert, entkoppelt es MEK1/2 induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 Aktivierung und blockiert sogar Wachstumsfaktor-induzierte ERK1/2 Aktivierung partiell.

2. Einleitung

2.1. MAP Kinase Signaltransduktionskaskaden

In den frühen 90er Jahren half eine Kombination von biochemischen und genetischen Analysen in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Hefen und Säugern einen ersten kompletten Signalweg von der Zellmembran zum Zellkern aufzuklären. Membranassoziierte Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (Rezeptortyrosinkinasen oder RTKs) reagieren auf Peptidliganden, Wachstumsfaktoren und induktive Signale während der Entwicklung. Bildung eines aktivierten Rezeptorkomplexes regt eine Signaltransduktionskaskade an, die zur Phosphorylierung und Aktivierung von MAP Kinasen (mitogen-aktiviert protein kinase, MAPK) führt. Diese können im aktivierten Zustand in den Zellkern gehen und dort Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Somit schafft der MAPK Signalweg eine klare Verbindung zwischen Zytoplasma und Nukleus, indem Stimulation durch Wachstumsfaktoren mit Änderung in der Genexpression gekoppelt wird (Abb. 2.1).

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Struktur von MAP Kinase Signalwegen



Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase Signaltransduktionsweg ist ein ursprüngliches Signalweiterleitungssystem, welches die Natur in unterschiedlichen Permutationen benutzt,

um eine Vielzahl von Aufgaben zu bewältigen. Er existiert in allen Eukaryoten und kontrolliert fundamentale zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben oder programmierten Zelltod (Apoptose). Die wesentlichen Komponenten beinhalten ein G-Protein, welches oberhalb eines zentralen Elements bestehend aus drei Kinasen arbeitet: eine Serin/Threonin spezifische MAPK Kinase phosphoryliert und aktiviert eine dualspezifische MAPK Kinase, die wiederum eine MAPK phosphoryliert und aktiviert (Abb. 2.1A). Dieses System sorgt nicht nur für die Amplifikation des Signals, sondern auch für zusätzliche regulatorische Anpassungen, die es ermöglichen, Kinetik, Dauer und Amplitude der Aktivität exakt einzustellen. Es gibt sechs MAPK Signalwege in der Hefe, die alle aus strukturell verwandten Komponenten zusammengesetzt sind, aber an unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt sind. Die drei wichtigsten MAPK Kaskaden die auch in Säugern identifiziert wurden, werden in den beiden folgenden Kapiteln näher beschrieben.

2.2. Struktur, Regulation und Funktion des ERK Signalwegs

Die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade ist ein Signalweiterleitungssystem, welches evolutionär hoch konserviert ist. So nutzt die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* diesen Signalweg für mehrere entwicklungssteuernde Prozesse, wie u.a. auch für die Augenentwicklung. Selbst beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* liegt dieser Signalweg konserviert vor und reguliert hier unter anderem die Entwicklung der Vulva.

In Säugern sind zwei Proteine der ERK (extracellular signal-regulated kinase) MAPK Signaltransduktionskaskade als Onkogene beschrieben worden, nämlich Ras und Raf. Es ist daher nicht überraschend, dass dieser Signalweg Kontrollfunktionen in Prozessen wie Proliferation, Transformation, Differenzierung und Apoptose ausübt. Eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Differenzierungsfaktoren und Tumorpromovierenden Faktoren aktivieren ERK (Lewis et al. 1998). Die meisten von ihnen aktivieren zuerst Ras Proteine, indem sie den Austausch von GDP mit GTP initiieren (Abb. 2.1B). Die intrinsische GDP/GTP Austausch- und GTP Hydrolyseaktivität von Ras ist jedoch gering. Daher wird die Kontrolle des GDP/GTP Zykluses von zwei unterschiedlichen Klassen von regulatorischen Proteinen moduliert. Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) unterstützen die Bildung des aktiven, GTP-beladenen Zustands, während GTPase aktivierende Proteine (GAPs) die Formation des inaktiven, GDP-beladenen Zustands fördern (Boguski and McCormick 1993). Somit übernehmen kleine G-Proteine der Ras Familie die Funktion eines molekularen Schalters bei der Verknüpfung von Rezeptoraktivierung an der Zellmembran mit zytoplasmatischer Signalweiterleitung (Koide et al. 1993; Katz and McCormick 1997; Campbell et al. 1998).

Aktivierung der MAPK ERK durch den EGF (epidermal growth factor) Rezeptor ist einer der am besten charakterisierten und analysierten Signalwege (Abb. 2.2) (Egan and Weinberg 1993; Avruch et al. 1994; Marshall 1995). Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden führt erst zu einer Rezeptordimerisierung, anschließender Transphosphorylierung und verstärkter Tyrosin Kinase Autophosphorylierung (Ullrich and Schlessinger 1990; Schlessinger 1993; Heldin 1995), die Anheftungsstellen für Signaltransduktionsproteine und Adaptoren wie Shc und Grb2 schaffen (Schlessinger 1994). Shc wird nach Bindung an einen aktivierten Rezeptor phosphoryliert, was zur Bildung einer Erkennungsstelle für die SH2

Domäne von Grb2 (growth-factor-receptor-bound-protein2) führt (McCormick 1993). Da Grb2 mit dem Ras GEF SOS (son of sevenless) assoziiert ist, kommt es hiermit indirekt zu einer SOS Translokation an die Plasmamembran (Buday and Downward 1993; Aronheim et al. 1994; Schlessinger 1994), wo es transient für eine GTP Beladung von Ras und damit für eine erhöhte Ras Aktivität sorgt (Bourne et al. 1991; Schlessinger 1993).

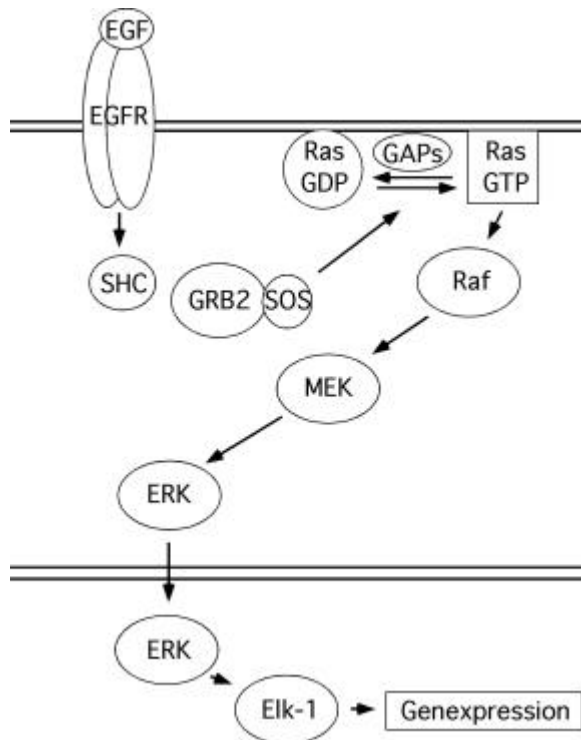


Abb. 2.2: Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK Signaltransduktionskaskade durch den Wachstumsfaktor EGF

Aktiviertes Ras fungiert als Adaptor, welcher die Serin/Threonin Kinase Raf mit hoher Affinität bindet (Howe et al. 1992; Moodie et al. 1993; Van Aelst et al. 1993; Vojtek et al. 1993; Warne et al. 1993; Zhang et al. 1993; Avruch et al. 1994; Daum et al. 1994; Hall 1994; Leever et al. 1994; Magnuson et al. 1994; Stokoe et al. 1994) und zu einer teilweisen Aktivierung von Raf führt. Neuere Studien zum Mechanismus der Raf Aktivierung zeigen, dass Raf Proteine Ras unabhängig durch Interaktionen mit Phospholipiden zur Zellmembran gebracht werden (Rizzo et al. 2000), wo es dann durch Bindung an aktiviertes Ras in der Nähe von aktivierten Wachstumsfaktorrezeptorkomplexen akkumuliert und Konformationsänderungen eingeht, die für die Interaktion mit aktivierenden Kinasen und Substraten notwendig sind. Phosphorylierung von Raf durch Serin/Threonin wie auch durch Tyrosinkinase (Heidecker et al. 1992; Morrison and Cutler 1997) führt dann zur Bindung weiterer Proteine, was zur Stabilisierung des Komplexes und damit der aktiven Kinase beiträgt. Alle Isoformen von Raf (C-Raf, A-Raf, B-Raf) (Morrison and Cutler 1997; Hagemann and Rapp 1999) phosphorylieren und aktivieren anschließend die dualspezifischen MAPK Kinasen MEK1/2 (MAPK/ERK kinase) (Kyriakis et al. 1992; Alessi et al. 1994; Huang and Erikson 1994; Jelinek et al. 1994; Zheng and Guan 1994). Die beiden hierfür benötigten Phosphorylierungsstellen befinden sich in der Aktivierungsschleife von MEK. MEK Kinasen gehören zur kleinen Gruppe von dualspezifischen Kinasen, die sowohl Threonin, als auch Tyrosinreste phosphorylieren. Sie aktivieren ERK1/2 durch

Phosphorylierung eines Thr-Glu-Tyr Motivs in der Aktivierungsschleife (Payne et al. 1991) und erst diese duale Phosphorylierung führt zur Aktivierung der MAPK. Obwohl Transkriptionsfaktoren wie z.B. Elk-1 wichtige MAP Kinase Substrate sind (Marais et al. 1993), transloziert nur ein Teil der aktivierten MAPK in den Nukleus, während der andere Teil im Zytoplasma und anderen subzellulären Kompartimenten verbleibt. Im Gegensatz zu den MEKs sind für ERKs eine Vielzahl von zytoplasmatischen und nukleären Substraten beschrieben worden (Pearson et al. 2001). So stimuliert ERK1/2 z.B. DNA Synthese durch Phosphorylierung der Carbamoyl-Phosphat Synthetase II, welches ein limitierendes Enzym bei der Pyrimidin Nukleotid Biosynthese ist (Graves et al. 2000). Zusätzlich induzieren diese MAP Kinasen Zellzyklus Progression durch Inaktivierung der Zellzyklus Inhibitor-Kinase MYT1 (wahrscheinlich über MAPKAPs wie RSK) (Palmer et al. 1998), aber sie arretieren meiotische Zellen in Metaphase II durch Aktivierung eines zytostatischen Faktors (Bhatt and Ferrell 1999; Gross et al. 1999). Gleichfalls können ERKs indirekt durch Steigerung der AP-1 Aktivität Zellproliferation stimulieren, was zur Induktion von Cyclin D1 führt (Treinies et al. 1999). Während Arbeiten von Kerkhoff et al. vorschlagen, dass onkogenes C-Raf den Eintritt in den Zellzyklus in Fibroblasten unabhängig von einem autokrinen Loop auslöst (Kerkhoff and Rapp 1997), zeigen andere Daten, dass in anderen Zellsystemen dieser Signalweg allein nicht ausreichend für die Initiation von DNA Synthese ist und zusätzlich eine Aktivierung der PI3-Kinase benötigt, die indirekt durch autokrine Wachstumsfaktoren vermittelt wird, deren Expression ERK abhängig ist (Treinies et al. 1999). Expression von autokrinen Faktoren ist ein Beispiel dafür, wie MAP Kinasen andere Signalwege aktivieren können (Wasserman and Freeman 1998).

Konsequenterweise folgt hieraus, dass Stärke und Dauer eines aktivierenden Signals kritische Parameter für biologische Effekte sind. Dies beinhaltet die Notwendigkeit des Wiederherstellens einer Balance nach Aktivierung der Signalkaskade durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk von Protein Phosphatasen (Keyse 2000). Signalintensität und Dauer können auf mehreren Ebenen der Kaskaden durch Phosphatasen negativ reguliert werden (Hunter 1995). Es ist jedoch klar, dass direkte Regulation der MAP Kinasen als Endglied der Kaskaden eine besondere Bedeutung zukommt. MAPK Phosphatasen setzen sich aus dual spezifischen (Threonin/Tyrosin) und Tyrosin spezifischen Enzymen zusammen. Eine MAPK kann von beiden Klassen dieser Proteinphosphatasen dephosphoryliert werden. Substratspezifität wird hierbei durch spezifische Protein-Protein Interaktionen am nicht katalytischen N-Terminus der MAPK gewährleistet (Camps et al. 2000; Keyse 2000).

Veränderungen in Komponenten dieser konservierten Proliferationskaskade, die zu einer Deregulation oder Entkopplung von Wachstumsfaktorrezeptoren an der Zellmembran führen, spielen eine zentrale Rolle im Prozeß der Tumorgenese. Der Familie der Ras GTPasen kommt hierbei eine Schlüsselposition zu und wird in Kapitel 2.4 im Zusammenhang mit Rho GTPasen und denen von ihnen aktivierten MAPK Transduktionskaskaden näher beschrieben.

2.3. Stress-aktivierte MAP Kinasen

Ein Teil der zellulären Reaktion auf inflammatorische Zytokine, Toxine und physikalischen Stress wird durch den JNK/SAPK und den p38 Protein Kinase Signalweg übermittelt. Obwohl Stress-aktivierte Protein Kinase Signalwege strukturell mit der ERK MAPK Kaskade eng verwandt sind, haben sie unterschiedliche Funktionen. Genau wie der ERK Signalweg

sind Stress aktivierte Signalkaskaden hierarchisch angeordnet (Abb.2.3). Im Unterschied zu diesem ist allerdings einerseits weniger über die umfangreichen Aktivatoren oberhalb und andererseits weniger über die Effekte nach Stimulation unterhalb der MAPK bekannt. So sind auch die beschriebenen Effekte, die von den Stress aktivierten Signalwegen moduliert werden zahlreich: Apoptose, Transformation, Entwicklung, Aktivierung des Immunsystems, Entzündungsreaktionen und Anpassung an Umgebungsveränderungen. Während Ras die Aktivierung des ERK MAP Kinase Signalwegs kontrolliert, konnte in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, dass die Rho GTPasen Rac und Cdc42 (nicht Rho) die Aktivierung von JNK/SAPK und p38 regulieren (Seger and Krebs 1995). Expression von aktiviertem Rac und Cdc42 Mutanten in HeLa, NIH 3T3 und Cos Zellen führt zu einer Aktivierung von JNK/SAPK und p38 (Coso et al. 1995; Minden et al. 1995), was zu einer anschließenden Gen Aktivierung durch den SRF (serum response factor) führt (Hill et al. 1995). Die gleichen Effekte wurden auch mit onkogenen Rac/Cdc42-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren erzielt (Minden et al. 1995). Dass die Aktivierung von MAPK Signalwegen eine physiologische Funktion von Rho GTPasen ist, wird durch genetische Studien in *Drosophila melanogaster* unterstützt, wo Mutationen der Rho GTPasen den gleichen Phänotyp haben wie Mutationen in *basket/DJNK* Signalweg (dorsal open) (Ip and Davis 1998; Noselli and Agnes 1999), bei denen Defekte bei der Zellwanderung und in der Zytoskelett Reorganisation das Schließen des dorsalen Ektoderms um das Meso- und Endoderm des frühen Embryos verhindern. Im folgenden Kapitel werden die JNK/SAPK und p38 MAP Kinase Transduktionskaskaden unterhalb von Rac und Cdc42 näher eingeführt.

2.3.1. JNK/SAPK

Biochemische Analysen führten ursprünglich zur Identifikation von JNK/SAPK (c-Jun NH₂-terminal kinase/ stress-activated protein kinase) als einem Mikrotubulus assoziierten Protein (Kyriakis and Avruch 1990). Es bindet an die N-terminale Aktivierungsdomäne von c-Jun (Adler et al. 1992; Hibi et al. 1993) und phosphoryliert dort Ser-63 und Ser-73 (Pulverer et al. 1991), was zur Aktivierung von c-Jun und zur Expression von Genen mit AP-1 Bindestellen in Promotoren führt. Das Translationsprodukt des immediate early Gens *c-jun* formt mit verwandten Proteinen (JunD, JunB) Homodimere oder mit verschiedenen Mitgliedern der Fos Familie Heterodimere und bildet so den AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex (Bravo 1990), der eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Zellwachstum spielt (Angel and Karin 1991; Schreiber et al. 1999). Überexpression von c-Jun transformiert embryonale Hühnerfibroblasten (Bos et al. 1990) und zusätzlich wird es für Transformation von Fibroblasten durch eine Vielzahl von Onkogenen benötigt (Lloyd et al. 1991; Smeal et al. 1991; Rapp et al. 1994).

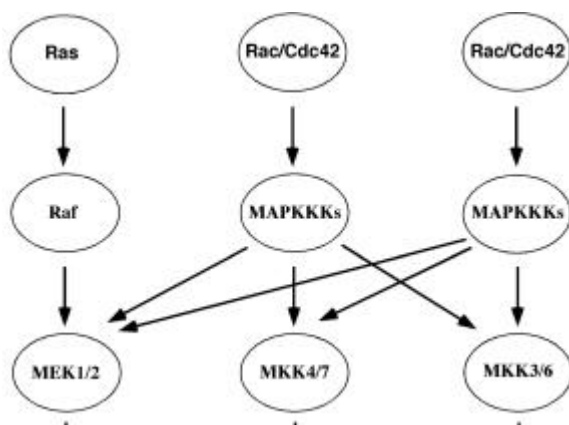


Abb.2.3: MAP Kinase Kaskaden aktivieren Transkriptionsfaktoren

Anschließendes Klonieren weiterer MAPK zeigte, dass drei separate JNK/SAPK Gene existieren, welche durch alternatives Splicen 8-10 Isoformen produzieren können (Derijard et al. 1994; Kallunki et al. 1994; Kyriakis et al. 1994; Casanova et al. 1996; Gupta et al. 1996). JNK/SAPKs werden durch Phosphorylierung eines Thr-Pro-Tyr Motivs aktiviert und migrieren dann in den Zellkern, um dort Zielproteine zu phosphorylieren. So können neben c-Jun auch weitere Jun Familienmitglieder phosphoryliert werden (Kallunki et al. 1996). Andere nukleäre Zielproteine sind Mitglieder der TCF (ternary complex factor) Familie: Elk-1 und SAP-1a (serum response factor accessory protein 1a) (Whitmarsh et al. 1995). Da diese Transkriptionsfaktoren den c-Fos Promotor positiv regulieren, erhöht dies wiederum den Anteil dieses Proteins am AP-1 Komplex (Karin et al. 1997).

Im Gegensatz zu den ERK MAP Kinasen werden JNK/SAPK MAP Kinasen in den meisten Zellsystemen nicht sehr stark durch Mitogene wie EGF, PDGF (platelet derived growth factor) oder FGF (fibroblast growth factor) aktiviert, sondern durch Stressfaktoren wie Hitzeschock, UV-Strahlung, oxidativen Stress, DNA schädigende Chemikalien (Topoisomerase Inhibitoren und alkylierende Agenzien), mechanischen Scher Stress und Protein Synthese Inhibitoren (Cycloheximid und Anisomycin) (Derijard et al. 1994; Pombo et al. 1994; Kyriakis et al. 1995; Kyriakis and Avruch 1996). Außerdem haben inflammatorische Zytokine der TNF (tumor necrosis factor) Familie (TNF, IL-1, CD40, CD27, Fas, RANK) wie auch vasoaktive Peptide wie Endothelin und Angiotensin II einen starken aktivierenden Effekt auf JNK/SAPK (Derijard et al. 1994; Kyriakis et al. 1994; Zohn et al. 1995; Berberich et al. 1996; Lenczowski et al. 1997).

Alle drei *Jnk/Sapk* Gene sind bereits durch Gen 'Knockout' ausgeschaltet worden. In verschiedenen genetischen Hintergründen ist keine der drei Einzel-Mutationen lethal. *Jnk/Sapk1/2* 'Doppelknockouts' sterben hingegen während der Schwangerschaft und zeigen Defekte beim Schließen des Neuralrohres (Kuan et al. 1999; Sabapathy et al. 1999). JNK/SAPK Funktion ist somit für die Entwicklung benötigt, aber nicht Isoform spezifisch. Weiterhin ist diese MAPK auch an der Regulation des Gleichgewichts zwischen Zelltod und Überleben beteiligt. Diese Funktionen werden in Kapitel 2.5 gesondert dargestellt.

Bislang konnte für die dualspezifischen Kinasen MKK4 (SEK1, JNKK1) und MKK7 gezeigt werden, dass sie direkte Aktivatoren der JNK/SAPK Kinasen sind (Yashar et al. 1993; Sanchez et al. 1994; Derijard et al. 1995; Lin et al. 1995; Moriguchi et al. 1995; Holland et al. 1997; Moriguchi et al. 1997; Tournier et al. 1997; Yao et al. 1997; Tournier et al. 1999;

Yamauchi et al. 1999). Während MKK4 JNK/SAPK präferentiell an Tyrosin phosphoryliert, bevorzugt MKK7 Threonin (Lawler et al. 1998). Durch Gen 'Knockoutstudien' konnte gezeigt werden, dass sowohl MKK4 als auch MKK7 für optimale JNK/SAPK Aktivierung nach UV Stimulation nötig sind (Tournier et al. 2001). Dagegen ist MKK7 essentiell für JNK/SAPK Aktivierung durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α (Tournier et al. 2001). Sowohl MKK4 als auch MKK7 werden für die embryonale Entwicklung benötigt. Während der Grund für den embryonalen Tod von *Mkk7*^{-/-} Mäusen unklar ist (Dong et al. 2000), sterben *Mkk4*^{-/-} Mäuse durch verstärkte Apoptose in der Leber (Ganiatsas et al. 1998; Nishina et al. 1999). Dieser Phenotyp ähnelt dem der *c-jun* 'Knockout-Maus' (Hilberg et al. 1993; Su et al. 1994). Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass der Grund für den MKK4 Phänotyp mit einem Verlust der JNK/SAPK vermittelten Phosphorylierungsstellen auf c-Jun zu erklären ist, denn *c-jun* Mäuse, denen diese Stellen durch Mutation entfernt wurden, haben keine auffälligen Defekte in der embryonalen Entwicklung (Behrens et al. 2000).

2.3.2. p38

p38 MAP Kinasen sind eine zweite Gruppe Stress-aktivierter MAP Kinasen. Das Klonieren der cDNA zeigte, dass p38 das Säugerhomolog zu HOG1 ist. HOG1 ist eine MAPK, die in der Hefe *S. cerevisiae* vorkommt, durch Hyperosmolarität aktiviert wird, und das gleiche Phosphoakzeptor Motiv hat wie p38 α (Thr-Gly-Tyr)(Han et al. 1994; Herskowitz 1995). Gleichzeitig und unabhängig voneinander identifizierten zwei Arbeitsgruppen p38 als eine durch IL-1 und Stress aktivierte Kinase, die MAPKAP Kinase 2 phosphorylieren kann. Diese Ser/Thr Kinase ist involviert in der Aktivierung und Phosphorylierung des kleinen Hitzeschockproteins HSP27 (Freshney et al. 1994; Rouse et al. 1994). Mittlerweile konnten vier Gene für p38 identifiziert werden: *p38a* (Han et al. 1994), *p38b* (Jiang et al. 1996), *p38g* (Lechner et al. 1996), *p38d* (Goedert et al. 1997). Genauso wie JNK/SAPKs werden p38 MAP Kinasen hauptsächlich durch Stress und inflammatorischen Zytokinen aktiviert (Kyriakis and Avruch 1996; Kyriakis and Avruch 2001). P38 α ist bislang das einzige Enzym der p38 MAPK Familie, das in der Maus ausgeschaltet worden ist. Im Gegensatz zu Deletionen einzelner Mitglieder der ERK oder JNK/SAPK Familie ist Inaktivierung von *p38a* aufgrund unzureichender Produktion von Erythropoietin embryonal lethal (Adams et al. 2000; Tamura et al. 2000). Oberhalb der p38 MAP Kinasen befinden sich die beiden dualspezifischen Kinasen MKK3 (MEK3) und MKK6 (MEK6) (Abb.2.3)(Derijard et al. 1995; Han et al. 1996; Stein et al. 1996; Enslin et al. 2000). MKK3 aktiviert präferentiell p38 α und β , während MKK6 alle p38 Mitglieder phosphoryliert und aktiviert (Enslin et al. 2000).

2.4. Die Rolle von Ras und Rho GTPasen in der Zelltransformation

Die Ras Familie der kleinen GTPasen (20 – 25 kDa) umfaßt insgesamt mehr als 100 Mitglieder und kann in mindestens 6 Unterfamilien eingeteilt werden: Ras, Rab, Rho, Ran, Rad/Gem, und Arf (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997; Zohn et al. 1998). Ras Proteine (H-Ras, K-Ras und N-Ras) sind in 30% aller humanen Tumore mutiert, was einen wichtigen Beitrag von konstitutiv aktiviertem Ras bei der Tumorgenese nahelegt (Bos 1989; Marshall

and Nigg 1998). Frühe Analysen bezüglich der transformierenden Aktivität von transfizierten Onkogenen in Maus-Embryo Fibroblasten kamen zu der Schlußfolgerung, dass das Ras Onkogen alleine oder in Kooperation mit anderen Onkogenen (z.B. Myc) ausreichend ist, um neoplastische Transformation zu induzieren (Land et al. 1983; Bishop 1987; Ruley 1990). Später wurde klar, dass Mutationen in mehreren Genen, einschließlich Onkogenen, Tumorsuppressoren und DNA Reparaturgenen notwendig sind, eine normale Zelle *in vivo* in eine neoplastische Zelle umzuwandeln (Stanbridge 1990; Kinzler and Vogelstein 1997; Lindahl and Wood 1999).

Konstitutiv aktiviertes Ras hat eine Vielzahl von Effekten auf die Morphologie und das Wachstumsverhalten von Zellen. Diese Effekte oder Veränderungen beinhalten die Auflösung von Aktin Mikrofilamenten, ein reduziertes Erfordernis für Wachstumsfaktoren, schnelleres Verankerungs-unabhängiges Wachstum *in vitro* und eines aggressiveren Tumorstwachstums *in vivo* (Ruley 1990; White et al. 1995; Plattner et al. 1996; Hall 1998). Frühe Studien zur Ras - Signaltransduktion identifizierten einen linearen (Ras-Raf-MEK-ERK-Elk-1) Signalweg (siehe 2.2), dessen Aktivierung in erster Linie zur transkriptionellen Induktion von Genen führt, welche beim Wachstum eine zentrale Rolle spielen (Leevers and Marshall 1992; Roberts 1992). Diese Signalkaskade ist für Ras abhängige Transformation von Fibroblasten absolut notwendig, denn dominant-negative Mutanten von Raf (Kolch et al. 1991; Troppmair et al. 1994) wie auch von MEK (Cowley et al. 1994) und syntetische MEK Inhibitoren blockieren diesen Effekt (Dudley et al. 1995). Kürzlich konnte sogar gezeigt werden, dass nach Behandlung mit einem MEK spezifischen Inhibitor von Mäusen mit Darmkrebs Tumorstwachstum stark inhibiert wird und mit reduzierten Mengen von aktiviertem ERK1/2 korreliert (Sebolt-Leopold et al. 1999).

Mittlerweile ist jedoch klar, dass dieser lineare Signalweg nur eine von mehreren Effektoren ist, die für die Funktion von Ras wichtig sind (Bos 1998). Ras vermittelt seine zellulären Effekte durch Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen (RalGDS, p120 GAP, PI3K, MEKK1) (Campbell et al. 1998). Zusätzlich sind einige Komponenten dieser individuellen linearen Signalwege in der Lage, auch andere Transduktionskaskaden zu modulieren (cross talk) (Bos 1998; Schaeffer and Weber 1999). Diese Vielzahl funktionell unterschiedlicher Ras Effektoren spiegelt sich auch in einer Vielfalt phänotypischer Konsequenzen wider. Während Aktivierung des Raf-abhängigen Signalwegs hauptsächlich Zellwachstum fördert, regulieren mehrere Raf-unabhängige Effektoren das Aktinzytoskelett und beeinflussen Zellform und Beweglichkeit (Hall 1998).

GTPasen der Rho Familie spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Hall 1998). Im Säuger sind 10 verschiedene Mitglieder dieser Familie beschrieben worden: RhoA, B, C, D und E, Rac1 und 2, Rac E, Cdc42Hs und TC10 (Symons 1996). Wie alle GTPasen der Ras Überfamilie können sie zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen Status und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand zyklisieren (Bourne et al. 1991). In Fibroblasten induziert Rac1 periphere Aktinakkumulationen und Membrankräuselungen, während RhoA Aktin-Stressfasern und fokale Adhäsionen induziert (Hall 1998). Sowohl Rac1 als auch Cdc42 sind an der Zusammensetzung fokaler Komplexe beteiligt; zusätzlich induziert Cdc42 Filopodien und Rac1 Lamellipodien (Abb. 2.4) (Ridley and Hall 1992; Ridley et al. 1992; Michiels et al. 1995; Nobes and Hall 1995; Boettner and Van Aelst 1999). In Swiss 3T3 Zellen liegen Cdc42, Rac und Rho in einer Signalkaskade, wobei Cdc42 Rac, und Rac Rho aktiviert (Nobes

and Hall 1995). Außerdem ist Rac in diesem Zellsystem ein Effektor von Ras (Abb. 2.4) (Ridley et al. 1992). Jüngere Arbeiten zeigen, dass Rho GTPasen auch essentiell für Zellwachstum sind. So spielen RhoA, Rac1 und Cdc42 eine entscheidende Rolle beim Durchlaufen des Zellzyklus durch G1 bis zum Eintritt in die S Phase (Olson et al. 1995).

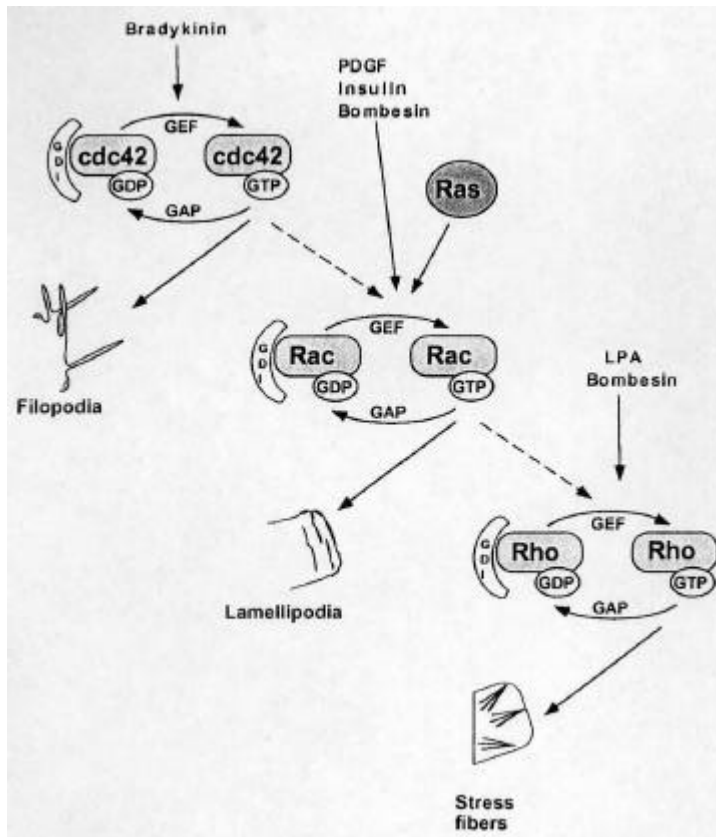


Abb.2.4: Rho GTPase Kaskaden und ihr Einfluß auf das Zytoskelett in Fibroblasten. Extrazelluläre Stimuli aktivieren Cdc42, Rac und Rho und bewirken unterschiedliche kurzlebige Zellreaktionen, wie z.B. die Bildung von Filopodien oder Lamellipodien. (aus Van Aelst et al.)

Weiterhin konnte für Rho, Rac und Cdc42 gezeigt werden, dass sie transformierendes Potential *in vitro* und *in vivo* haben (Khosravi-Far et al. 1995; Qiu et al. 1995a; Qiu et al. 1995b; Lin et al. 1997; Qiu et al. 1997). Nähere Analysen zeigten, dass dominant negative Formen von Rho GTPasen (RhoA, RhoB, RhoG, Rac1, Cdc42 und TC10) Ras Transformation blocken (Prendergast et al. 1995; Qiu et al. 1995a; Qiu et al. 1995b; Nur et al. 1999). Zusätzlich kooperieren aktivierte Formen dieser GTPasen mit schwach aktiviertem Raf (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997; Zohn et al. 1998), wie auch miteinander in ihrer Fähigkeit Foci zu generieren (Roux et al. 1997). Diese Daten schlagen vor, dass alle drei GTPasen unabhängige Signalwege aktivieren, die für den Ras-transformierten Phänotyp nötig sind. Dieses ist auch konsistent mit der Beobachtung, dass eine Reihe von aktivierten Rho spezifischen Austauschfaktoren (Dbl, Vav, Ect2, Tiam und Ost) stark transformierend sind, weil sie die Fähigkeit besitzen, mehrere Rho GTPasen simultan zu aktivieren (Miki et al. 1993; Horii et al. 1994; Khosravi-Far et al. 1994; van Leeuwen et al. 1995; Chan et al. 1996). Zusätzlich belegen mehrere Studien, dass Rho GTPasen in humanen Krebsformen häufig überexprimiert vorliegen (Suwa et al. 1998; Fritz et al. 1999). Obwohl Rho GTPasen wichtige Funktionen in der Zellproliferation und Zelltransformation zukommen, ist der Mechanismus, wie sie dies bewerkstelligen, noch unklar. Effektormutanten von Rac und Cdc42, die die Fähigkeit verloren haben, den JNK/SAPK Signalweg zu aktivieren, haben gezeigt, dass der aktivierende Effekt der Rho GTPasen auf Proliferation, Transformation und Stimulation von DNA Synthese JNK/SAPK unabhängig ist (Joneson et al. 1996; Lamarche et al. 1996).

In jüngster Zeit verstärken sich dennoch die Hinweise, dass auch JNK/SAPKs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Tumoren spielen. So konnte gezeigt werden, dass Ras induzierte Zelltransformation den Transkriptionsfaktor c-Jun benötigt (Johnson et al. 1996). Ferner induziert Ras c-Jun Phosphorylierung an denselben Aminosäuren, die auch von JNK/SAPK phosphoryliert werden (Pulverer et al. 1991; Smeal et al. 1991), und Ras-induzierte Transformation wird unterdrückt, wenn diese Phosphorylierungsstellen auf c-Jun mutiert werden (Behrens et al. 2000). Zusätzlich ist JNK/SAPK in einer Reihe von Tumorzelllinien konstitutiv aktiviert und für das transformierende Potential mehrerer Onkogene benötigt (Ip and Davis 1998). Dominant negative SEK1 blockt z.B. Ras-induzierte JNK/SAPK Aktivierung und Transformation, während Wild Typ SEK1 Ras Transformation verstärkt, ohne dabei ERK Aktivität zu modulieren (Clark et al. 1997). Blockierte JNK/SAPK Aktivierung in Lungenkrebszellen inhibiert EGF induzierte Proliferation (Bost et al. 1997). Zusätzlich aktiviert die EGF Rezeptor Mutante EGFRvIII, die konstitutiv aktiv ist und in vielen Tumoren exprimiert wird, die JNK/SAPK Signalkaskade, und Inhibierung dieses Signalwegs führt zum Verlust des transformierten Phänotyps (Antonyak et al. 1998).

Während der Tumorentwicklung muß JNK/SAPK abhängige Stress-induzierte Apoptose (siehe 2.4) unterdrückt werden und etablierte Tumorzellen müssen daher einen Mechanismus entwickelt haben, um diesen Effekt zu blockieren. Für diesen Prozeß können drei unterschiedliche Mechanismen in Betracht gezogen werden: (a), konstitutiv aktivierte Überlebenssignale in der Tumorzelle sind dominant über den JNK/SAPK vermittelten pro-apoptotischen Effekt; (b), Zielproteine der MAP Kinase sind mutiert oder post-translational modifiziert und verhindern JNK/SAPK induzierte Apoptose; (c), innerhalb einer Tumorzelle wird durch den Verlust von z.B. p53 oder Rb JNK/SAPK Aktivierung als anti-apoptotisches Signal interpretiert. Durch die Verwendung von JNK/SAPK anti-sense Oligonukleotiden

konnte kürzlich die These, dass JNK/SAPKs in primären und in Tumorzellen unterschiedliche Funktionen haben, unterstützt werden. Diese Studien belegen, dass JNK/SAPK für die Stress-induzierte Apoptose von primären Zellen nötig ist (Garay et al. 2000; Ho et al. 2000). Dagegen inhibieren JNK/SAPK anti-sense Oligonukleotide das Wachstum von Tumorzellen und können Apoptose induzieren (Bost et al. 1999; Potapova et al. 2000).

Demzufolge muß Ras-abhängige Zelltransformation nicht als Aktivierung einer linearen Kaskade, sondern als ein Ereignis, welches komplexe Signaltransduktionswege reguliert und verknüpft, verstanden werden.

2.5. Funktionen von JNK/SAPK-gesteuerten Signalwegen in der Apoptose

Erste Studien, die die Fragestellung untersuchten, ob JNK/SAPKs am Prozeß des gesteuerten Zellselbstmordes (Apoptose) beteiligt sind, wurden in neuronalen Zellen nach Entfernen des neurotrophen Faktors durchgeführt (Xia et al. 1995). Diese Daten zeigen, dass JNK/SAP Kinasen sowohl den apoptotischen Effekt unterstützen als auch JNK/SAPK abhängige Apoptose durch Aktivierung von Überlebenssignalwegen (ERK oder Akt/PKB) supprimiert wird. Diese Funktion von JNK/SAPK in Stress induziertem Zelltod von neuronalen Zellen konnte in *Jnk3* Knockout Mäusen bestätigt werden (Yang et al. 1997). *Jnk1/2* Doppelknockout MEFs (mouse embryo fibroblasts) haben starke Defekte in Stress (UV, anisomycin und DNA alkylierende Agenzien) induzierter Apoptose. Der Apoptosedefekt in diesen Zellen konnte zurückgeführt werden auf ein fehlendes Aktivieren der Effektor Caspasen (Tournier et al. 2000). Weitere Knockoutstudien in Mäusen identifizierten einen genetischen Signalweg für Stress induzierte Apoptose, wobei ein Fehlen von JNK/SAPK schon das Freisetzen von Cytochrom c aus den Mitochondrien blockiert. Unterhalb der MAP Kinase unterdrückt ebenso das Fehlen von Cytochrom c (Li et al. 2000), Apaf-1 (Yoshida et al. 1998), Initiator Caspase-9 (Hakem et al. 1998; Kuida et al. 1998) und Effektor Caspase-3 (Woo et al. 1998) UV induzierte Apoptose. Weitere Studien, die den Mechanismus dieses JNK/SAPK vermittelten pro-apoptotischen Effektes an der Mitochondrienmembran untersuchen, sind nötig.

Dennoch lösen die meisten Stimuli, für die eine JNK/SAPK Aktivierung beschrieben ist, keine Apoptose aus. Einerseits wird JNK/SAPK abhängige Apoptose durch gleichzeitige Aktivierung von Überlebenssignalwegen (NF- κ B, ERK, Akt/PKB) geblockt (Xia et al. 1995), woraus folgt, dass JNK/SAPK Funktion auch im Zusammenhang mit der Aktivität von anderen Signalwegen betrachtet werden muß. Andererseits führt nur anhaltende, aber nicht vorübergehende JNK/SAPK Aktivierung zur Apoptose (Chen and Tan 2000). Die meisten Zytokine vermitteln nämlich nur eine transiente JNK/SAPK Aktivierung (z.B. TNF), was nicht zur Apoptose führt (Liu et al. 1996). Mehrere Studien haben weiterhin gezeigt, dass JNK/SAPK Aktivierung unter bestimmten Umständen zum Überleben der Zelle beiträgt (Reinhard et al. 1997), was auch durch Analysen der *Jnk1^{-/-}/Jnk2^{-/-}* Embryos belegt wird, denn diese zeigen verstärkte Vorderhirn Apoptose in der Abwesenheit von JNK/SAPK (Kuan et al. 1999; Sabapathy et al. 1999).

2.6. MAPKKs oberhalb von Stress-aktivierten MAP Kinase Kaskaden

Die aus den drei Mitgliedern bestehende wohldefinierte Raf-MEK-ERK MAPK Kaskade ist im Falle der Stress aktivierten JNK/SAPK und p38 Protein Kaskaden momentan nur sehr lückenhaft charakterisiert. Dies liegt zum einem an der Fähigkeit vieler MAPKKs mehrere MAPKKs *in vitro* zu phosphorylieren und zum anderen daran, dass sie nach Überexpression mehrere MAP Kinasen aktivieren können. Ein weiteres Problem bei der Einordnung dieser Kinasen in Signaktransduktionskaskaden hängt mit der Schwierigkeit zusammen, dass konventionelle Kinase Assays nach Stimulation und Immunopräzipitation kaum eine Änderung der enzymatischen Aktivität nachweisen können. Diese Probleme werden in Zukunft vermehrt durch genetische Studien analysiert und gelöst werden, ähnlich denen, die für die Hefe MAPKKK STE11 eine physiologische Funktion in drei unterschiedlichen MAPK Signalwegen gezeigt haben (Herskowitz 1995; Posas and Saito 1997).

Eine bestimmte MAPKK Kinase kann abhängig von ihrer enzymatischen Aktivität entweder eine einzige oder mehrere MAPKKs regulieren. Dies ist auch abhängig von der zellulären Verteilung der Signaltransduktionskomponenten, Bildung von spezifischen Proteinkomplexen und des aktivierenden Signals. Konsequenterweise mögen signifikante Unterschiede sowohl in der Größenordnung als auch in der Kinetik bei der Aktivierung von MAPKs nach einem bestimmten Stimulus in einem bestimmten Zellsystem auftreten. Außerhalb der Kinasedomäne konnte bei der Vielzahl von identifizierten MAPKK Kinasen keine großen Ähnlichkeiten festgestellt werden. Der Beitrag einer MAPKKK bei der Aktivierung einer individuellen MAPK mit Ausnahme von Raf in der ERK Kaskade ist demzufolge noch unklar.

Die erste identifizierte MAPKKK, die oberhalb Stress aktivierter MAP Kinasen arbeitet, ist MEKK1. Diese Serin/Threonin Kinase ist eng mit der Hefe Kinase Ste11p verwandt (Rhodes et al. 1990). In ihrer katalytischen Region sind die Mitglieder der MEKK Familie (MEKK1/2/3/4) bis zu 50% konserviert (Lange-Carter et al. 1993; Blank et al. 1996; Xu et al. 1996; Gerwins et al. 1997). Genauso wie für die Familie der MEKKs gezeigt, aktivieren die folgenden MAPKKKs JNK/SAPK wenn sie überexprimiert werden oder durch *in vitro* Rekonstitutionsversuchen mit MEKs: MAP three kinase1 (MTK1)(Chou and Hanafusa 1995; Graves et al. 1998), TPL-2/Cot (Salmeron et al. 1996; Hagemann et al. 1999), TGF β -activated kinase (TAK1) (Yamaguchi et al. 1995), apoptosis-regulating kinase (ASK1)/MAPKKK5 (Wang et al. 1996; Ichijo et al. 1997), ASK2/MAPKKK6 (Wang et al. 1998), thousand and one amino acid kinases 1,2 (TAOs1,2) (Hutchison et al. 1998; Chen et al. 1999) und alle 5 Mitglieder der Mixed Lineage Kinasen, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden. Von den hier direkt angesprochenen aktivieren MEKK1/2/3 (Lange-Carter et al. 1993; Blank et al. 1996) und Tpl-2/COT (Salmeron et al. 1996; Hagemann et al. 1999) zusätzlich den ERK Signalweg. TAK1 (Yamaguchi et al. 1995), ASK1 (Ichijo et al. 1997), TAOs1/2 (Hutchison et al. 1998; Chen et al. 1999) und MTK1 (Graves et al. 1998) aktivieren zudem p38. Somit können viele der beschriebenen MAPKKKs mehr als eine MAP Kinase Kaskade aktivieren. Zusätzlich ist für einige auch eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges beschrieben worden (Mercurio and Manning 1999).

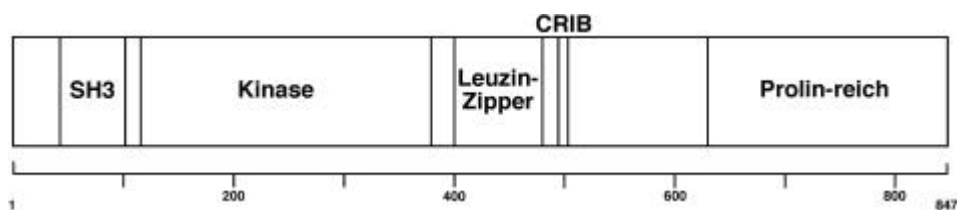
Obwohl das klassische MAPK Modul aus drei Mitgliedern besteht, gibt es oberhalb von MAPKKKs noch Serin/Threonin Kinasen (MAPKKKKs), die die Aktivität von MAPKKKs modulieren können und auch als Ste20 verwandte Kinasen zusammengefaßt werden. Auch hier gibt es oberhalb von Stress aktivierten MAP Kinasen mehrere Serin/Threonin

Proteinkinasen: p21-activated kinase (PAK) 1/2/3/4 (Bagrodia et al. 1995a; Polverino et al. 1995; Zhang et al. 1995), germinal center kinase (GCK) (Yuasa et al. 1998; Kyriakis 1999), GCK-related kinase (KHS/GCKR) (Tung and Blenis 1997), GCK-like kinase (Diener et al. 1997; Yao et al. 1999), hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) (Hu et al. 1996) und Nck-interacting Kinase (NIK) (Su et al. 1997). Der Mechanismus den diese Kinasen benutzen um JNK/SAPK zu aktivieren ist in diesem Fall komplizierter als bei den MAPKKs und noch vollkommen unklar.

2.7. Mixed Lineage Kinasen

Mixed Lineage Kinasen (MLKs) bilden eine Gruppe von verwandten Serin/Threonin MAPKK Kinasen. Diese Familie gliedert sich in zwei Gruppen: Die strukturell nah verwandten MLK1 (Dorow et al. 1993), MLK2/MST (Dorow et al. 1995; Katoh et al. 1995), MLK3/SPRK/PTK1 (Ezoe et al. 1994; Gallo et al. 1994; Ing et al. 1994) und die DLK/MUK/ZPK (Holzman et al. 1994; Reddy and Pleasure 1994; Hirai et al. 1996; Matsui et al. 1996), LZK (Sakuma et al. 1997) Unterfamilie. MLK2/3 setzen sich aus einer Reihe von Protein – Protein Interaktionsdomänen zusammen (Abb.2.5). Aminoterminal befindet sich eine SH3 Domäne, eine Cdc42 Rac interactive binding (CRIB) Region und eine Prolin-reiche Region am Carboxy-Terminus. MLK1 ist wahrscheinlich recht ähnlich aufgebaut, doch bis heute ist die Kinase noch nicht vollständig kloniert (Dorow et al. 1993). Obwohl DLK/MUK/ZPK und LZK enger miteinander verwandt sind als mit den MLKs, besitzen sie doch das gleiche charakteristische Merkmal dieser Gruppe von MAPKK Kinasen. Allen 5 Kinasen ist gemeinsam, dass sich C-terminal der Kinasedomäne 2 Leucin Zipper (LZ) befinden. Die Tandem LZs der MLKs sind untereinander 68% homolog und werden von einer stark konservierten Spacer Region von 13 Aminosäuren getrennt.

Abb.2.5: Schematische Struktur der Mixed Lineage Kinase 3 (MLK3) mit Darstellung der Protein – Protein Interaktionsdomänen



Sequenzvergleiche der katalytischen Regionen der MLKs zeigten, dass sie am stärksten mit Tyrosin Kinasen aus der FGFR Familie verwandt sind. Kritische Aminosäuren innerhalb der Kinasedomäne zeigten dann allerdings, dass es sich bei dieser Familie um Serin/Threonin Kinasen handelt (Gallo et al. 1994), woher sich auch ihr Name ableitet (Dorow et al. 1993). Alle Mitglieder der MLK Serin/Threonin Kinasen sind innerhalb der Kinasedomäne stark konserviert. (Hirai et al. 1997). So haben MLK1/2/3 untereinander eine Aminosäurehomologie von 75 – 77%. Sequenzvergleiche mit anderen Serin/Threonin Proteinkinasen zeigen, dass MLKs am engsten mit TAK und C-Raf (34 – 40% Homologie) verwandt sind, während die Homologie zwischen den Kinasedomänen der MLKs und denen der MEKKs bei nur 29 – 34% liegt (Hirai et al. 1997).

Eine andere konservierte Region innerhalb der MLKs ist die CRIB Domäne. Der am besten analysierte Effektor von Cdc42 und Rac ist p21-activated kinase (PAK) (Manser et al. 1994; Bagrodia et al. 1995b; Martin et al. 1995). Für die Interaktion von GTP beladenem Cdc42 oder Rac mit der Serin/Threonin Kinase PAK ist die CRIB Domäne, die aus 14 – 16 Aminosäuren besteht, von denen 8 konserviert sind, notwendig (Burbelo et al. 1995). Neben PAK konnte für eine Reihe unterschiedlicher Proteine gezeigt werden, dass sie eine funktionelle CRIB Domäne besitzen. Für die Tyrosinkinase Cdc42-associated kinase (ACK) (Manser et al. 1993) oder das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) (Aspenstrom et al. 1996) konnte z.B. ebenfalls gezeigt werden, dass sie über ihre CRIB Domänen mit GTP beladenem Cdc42/Rac interagieren. In den CRIB Domänen von MLK2/3 stimmen 6 von den 8 konservierten Aminosäuren überein. In Filter-Bindestudien konnte anschließend gezeigt werden, dass MLK2/3 an GTP, aber nicht an GDP beladenem Cdc42/Rac bindet (Burbelo et al. 1995; Nagata et al. 1998). Zusätzlich interagieren MLK2/3 im Hefe 'Two Hybrid' Test mit GTP beladenem Cdc42/Rac (Nagata et al. 1998).

2.8. Regulation der Mixed Lineage Kinase MLK3

Erste funktionelle Analysen zeigten, dass MLK3 nach Überexpression in Säuger Zelllinien JNK/SAPK durch Phosphorylierung und Aktivierung der dualspezifischen Kinasen MKK4 (Rana et al. 1996; Teramoto et al. 1996; Tibbles et al. 1996; Hartkamp et al. 1999) und MKK7 (Whitmarsh et al. 1998) aktiviert, und an die JNK/SAPK Gerüstproteine JIP-1 und JIP-2 bindet (Dickens et al. 1997; Whitmarsh et al. 1998; Yasuda et al. 1999). Neben diesem starken Effekt auf den JNK/SAPK Signalweg kommt es zusätzlich auch zu einer schwächeren MKK3/6 vermittelten p38 (Tibbles et al. 1996) und zu einer MEK1/2-vermittelten ERK Aktivierung (Hartkamp et al. 1999). Konsistent mit diesen Daten für MLK3 konnte auch für MLK2 in COS Zellen gezeigt werden, dass dieses Protein nach Überexpression einen starken aktivierenden Effekt auf den JNK/SAPK Signalweg hat. Zusätzlich aktiviert es zu einem geringeren Maß im gleichen Zellsystem p38 und ERK (Nagata et al. 1998).

Neben der Aktivierung aller drei MAPK Kaskaden ist der Einfluß von MLK3 auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrovers beschrieben worden. NF- κ B wird im unstimulierten Zustand von den inhibitorischen Proteinen der I κ B Familie im Zytoplasma zurückgehalten (Baldwin 1996). Kommt es zu einer Aktivierung werden die inhibitorischen I κ B Proteine phosphoryliert (Baldwin 1996), ubiquitiniert und proteolytisch degradiert (Yaron et al. 1998), worauf NF- κ B in den Zellkern migriert und die Expression von Genen induziert, die wichtige

Funktionen bei der Immun- und Entzündungsantwort (Baldwin 1996), sowie bei der Regulation von Apoptose (Baichwal and Baeuerle 1997) und Zellzyklusprogression haben (Guttridge et al. 1999; Hinz et al. 1999). Die induzierbare Phosphorylierung von I κ B wird durch die zwei homologen Kinasen IKK α und IKK β , welche sich in einem I κ B Kinase Komplex (IKC) (Maniatis 1997) befinden (Molekulargewicht ca. 700 – 900 kDa), vermittelt (DiDonato et al. 1997; Mercurio et al. 1997; Regnier et al. 1997; Woronicz et al. 1997; Zandi et al. 1997). Als erste MAPKKK, die IKKs aktivieren kann, wurde NF- κ B-inducing kinase (NIK) identifiziert (Malinin et al. 1997). Neben dieser induzieren sowohl MEKK1 (Karin and Delhase 1998), Cot (Lin et al. 1999), TAK1 (Ninomiya-Tsuji et al. 1999) als auch MEKK2 und 3 (Zhao and Lee 1999) NF- κ B Aktivität. Während Hehner et al. publiziert haben, dass MLK3 unterhalb der Rho GTPasen Rac und Cdc42 und oberhalb der IKKs NF- κ B in Jurkat T- und HeLa Zellen aktiviert (Hehner et al. 2000), ist von Zhao et al. publiziert worden, dass Überexpression von MLK3 in HeLa Zellen keinen Effekt auf NF- κ B Aktivierung hat (Zhao and Lee 1999).

Physiologische Konsequenzen, die sich aus der Überexpression von MLK3 ergeben, sind Hauptbestandteil dieser Arbeit, und werden im Ergebnisteil und in der Diskussion im Detail angesprochen.

2.9. Spezifität bei der Signaltransduktion durch MAP Kinasen

Die Kontrolle unterschiedlicher zellulärer Prozesse als Reaktion auf eine Vielzahl von extrazellulären Reizen durch einige wenige MAP Kinasen beinhaltet die Notwendigkeit, dass MAP Kinasen in ihrer Aktivität und Funktion spezifisch sein müssen. Mehrere verschiedene Mechanismen gewährleisten diese Spezifität. In der Hefe fungiert STE5 als ein Gerüstprotein (scaffold), welches die drei Komponenten der Pheromon aktivierten MAPK Kaskade in ein Modul organisiert (Herskowitz 1995). Die Suche nach analogen Gerüstproteinen bei Säugern führte zur Klonierung von JIP1/2. Dieses bindet spezifisch MLK2/3, MKK7 und JNK1/2 (Whitmarsh et al. 1998). Ein anderes Gerüstprotein, MP1, interagiert mit MEK1 und ERK1 und potentiell so ERK1 Aktivierung (Schaeffer and Weber 1999). Ein zweiter Mechanismus, durch den Spezifität gesichert wird, hängt ab von spezifischer Bindung von Signaltransduktionsproteinen untereinander (Xia et al. 1998). Z.B. wird JNK1/2 durch einen aminoterminalen Schwanz von MKK4 gebunden, welcher auch mit der katalytischen Domäne von MEKK1 interagiert. Jede Interaktion wird abgebrochen, nachdem die unterhalb arbeitende Kinase aktiviert wurde. Während Gerüstproteine Spezifität auf Kosten von Signalamplifikation erreichen, wird im zweiten Fall die Amplifikation nicht beeinträchtigt. Ein dritter Mechanismus basiert auf der Fähigkeit von MAP Kinasen indirekt die Expression von Liganden oder Inhibitoren für Membranrezeptoren zu regulieren (Wasserman and Freeman 1998). Solche positiven oder negativen autokrinen Loops können ein spezifisches MAPK Aktivierungsmuster generieren. Einmal aktiviert müssen MAP Kinasen ihre spezifischen Substrate finden. Alle MAP Kinasen erkennen eine ähnliche Phosphat Bindestelle zusammengesetzt aus einem Serin oder Threonin gefolgt von einem Prolin. Die Aminosäuren, die diese Bindestellen umgeben, steigern weiter die Spezifität, mit der die katalytische Tasche der aktivierten MAPK ihr Substrat erkennt. Vollständige Spezifität wird weiterhin durch eine zusätzliche Interaktionsstelle gewährleistet. Wie zuerst bei c-Jun

beschrieben, wird bei diesem JNK Substrat eine kurze Region, die den Phosphatbindestellen Ser63 und Ser73 vorangeht, von einer Interaktionsstelle außerhalb der katalytischen Tasche dieser MAPK erkannt (Tanoue et al. 2000). Ein weiterer Aspekt bei der Gewährleistung von Spezifität ist die Lokalisation von Signaltransduktionsmolekülen in unterschiedlichen Kompartimenten in der Zelle. So kolokalisiert MEKK1 z.B. mit Proteinen des Aktinzytoskeletts (English et al. 1999) und Umlagerungen von diesem stimuliert MEKK1 Aktivität (Xia et al. 1998; Yujiri et al. 1998).

2.10. Fragestellungen

Gallo et al. identifizierten mit Hilfe von degenerierten Oligodeoxynukleotid Primern, die gegen konservierte Domänen innerhalb von Proteinkinasen gerichtet waren, die Proteinkinase MLK3 (Gallo et al. 1994). Vergleichende Sequenzanalysen von Kinasedomänen konnten die Serin/Threonin Kinase MLK3 als eine MAPKK Kinase identifizieren, die über die Familie der 'Mixed Lineage Kinasen' hinaus am engsten mit C-Raf und TAK1 verwandt ist. Aus diesem Grund wurde zuerst die Fähigkeit der Kinase, MAPK Signalwege zu aktivieren, analysiert (Kapitel 4.1.1-4). Um die Effekte auf die unterschiedlichen MAPK Signalwege genauer zu verstehen, sollten in Weiterführung dieser Analysen folgende experimentell nachgegangen werden: Über welche bekannten Proteinkinasen vermittelt MLK3 seine Effekte auf MAP Kinasen durch direkte Phosphorylierung und Aktivierung (Kapitel 4.1.5-10)? Sind die durch MLK3 induzierten Effekte auch mit den bekannten Aktivatoren dieser MAPKK Kinase zu sehen (Kapitel 4.1.11-13)? Um die Rolle der durch MLK3 aktivierten Signalwege besser zu verstehen, wurde das transformierende Potential in NIH 3T3 Fibroblasten näher charakterisiert (Kapitel 4.2.1+2). Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren und Proteinmutanten wurden die Signalwege ermittelt, welche MLK3 benötigt, um Fibroblasten zu transformieren (Kapitel 4.2.3+4), welches auch Rückschlüsse auf das schwach transformierende Potential von MLK3 zuließ. Insgesamt belegen diese Daten, dass MLK3 den JNK/SAPK Signalweg aktiviert und die MAPKK MEK1/2 oberhalb von ERK1/2 von dessen Aktivierung entkoppelt. Im letzten Teil der Arbeit demonstrieren wir, dass diese Entkoppelung zu einer partiellen Blockierung von Wachstumsfaktor-induzierter ERK Aktivierung führt.

3. Material und Methoden

3.1. Arbeitsmaterial

3.1.1. Chemikalien und radioaktive Verbindungen

Acrylamid (40%)/Bisacrylamid (0,8%)	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Sigma, St. Louis
Agarose, ultra pure	GIBCO BRL, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, St. Louis
Anisomycin	Sigma, St. Louis
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, St. Louis
Bradford-Reagenz	Biorad, München
BromphenolBlau	Sigma, St. Louis
dNTP	Sigma, St. Louis
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, St. Louis
DNA-Längenstandardmarker (1kb-Marker)	Sigma, St. Louis
EDTA	Sigma, St. Louis
EGTA	Sigma, St. Louis
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Giemsa stain	Sigma, St. Louis
Glutathion	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, St. Louis
IPTG	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma, St. Louis
Leupeptin	Sigma, St. Louis
LipofectAMINE TM	GIBCO BRL, Karlsruhe
D-Luciferin (freie Säure)	Appllichem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumarsenit	Sigma, St. Louis
Natriumdesoxcholat (DOC)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid (ONPG)	Appllichem, Darmstadt
Nonidet P-40	Sigma, St. Louis
PD 098059 (2'-amino-3'Methoxyflavon)	Calbiochem, Bad Soden
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	GIBCO BRL, Karlsruhe
ProteinA-Agarose	Boehringer, Mannheim
ProteinG-Agarose	Boehringer, Mannheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Sigma, St. Louis
Triton-X100	Sigma, St. Louis
12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)	Sigma, St. Louis
Whatman 3MM Papier	Schleicher & Schüll,

Allgemeine Labor-chemikalien	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe SERVA, Heidelberg Sigma, St. Louis
Röntgenfilme	Amersham-Buchler, Braunschweig
Radiochemikalien	Amersham-Buchler, Braunschweig

3.1.2. Zellkulturmaterial

Dulbecco's modified eagle medium	GIBCO BRL, Karlsruhe
RPMI 1650	GIBCO BRL, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz
Streptomycin und Penicillin	GIBCO BRL, Karlsruhe
L-Glutamin	GIBCO BRL, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe
Zellkulturflaschen und -schalen	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3. Enzyme

Calf Intestine Phosphatase (CIP)	NEB, Mississauga
DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	MBI
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim MBI NEB, Mississauga
T4 DNA Ligase	NEB, Mississauga
Proteinase K	Sigma, St. Louis
RNase	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase	Boehringer, Mannheim

3.1.4. Größenmarker

Proteine:

Prestained Molecular Weight Standard Mixture (SDS-7B) Sigma, St. Louis

DNA:

1 kb Ladder GIBCO BRL, Karlsruhe

3.1.5. Antikörper

<u>Antikörper/Antiseren</u>	<u>Antigen</u>	<u>Referenz/Herkunft</u>
anti-ERK2 (C-14)	ERK2	Santa Cruz (sc154)
anti-p-ERK (E-4)	phospho-ERK	Santa Cruz (sc-7383)
anti-MEK1 (C-18)	MEK1	Santa Cruz (sc-219)
anti-MEK2 (N-20)	MEK2	Santa Cruz (sc-524)
anti-p-MEK	phospho-MEK	NEB
anti-JNK1 (F1)	JNK1	Santa Cruz (sc-571)
anti-MLK3 (C-20)	MLK3	Santa Cruz (sc-536)
anti-p-c-Jun (KM-1)	phospho-c-Jun	Santa Cruz (sc-822)
anti-JunB (N-17)	JunB	Santa Cruz (sc-46x)
anti-JunD (329)	JunD	Santa Cruz (sc-74x)
anti-c-Jun/AP-1 (N)	c-Jun	Santa Cruz (sc-45)
anti-p38	p38	Santa Cruz (sc-535)
anti-p-p38	phospho-p38	NEB
anti-CDK4 (C-22)	CDK4	Santa Cruz (sc-260)
M2	Flag-Epitop	Kodak/IBI
D-8	Flag-Epitop	Santa Cruz (sc807)
12CA5	Hämagglutinin-Epitop	MSZ, Würzburg
9E10	Myc	MSZ, Würzburg
anti-Maus IgG gekoppelt an Peroxidase (POD)		Amersham
anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Peroxidase (POD)		Amersham
Protein-A gekoppelte Peroxidase		Boehringer

3.1.6. Rekombinante Proteine

ERK1 K52R (His-tag)	MSZ, Würzburg
ERK1	MSZ, Würzburg
ERK2	MSZ, Würzburg
GST-c-Jun (1-135)	MSZ, Würzburg
GST-MEK1	MSZ, Würzburg
GST-MEK1 LIDA	MSZ, Würzburg
GST-MEK1 LIDEMANE	MSZ, Würzburg
MBP	GIBCO BRL, Karlsruhe
MEK1 K97M (His-tag)	MSZ, Würzburg
SAPK β	MSZ, Würzburg
GST-SEK1	MSZ, Würzburg
GST-SEK1 K167R	MSZ, Würzburg

3.1.7. Reagenziensätze (KITS)

ECL Western blotting detection reagents	Amersham
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Kit (Midi, Maxi)	Qiagen

3.1.8. Plasmide

Im folgenden sind die verwendeten Vektoren aufgelistet.

Mit * markierte Vektoren wurden im Rahmen dieser Arbeit konstruiert.

Die hinter den Vektoren in Klammern stehenden Buchstaben geben mutierte Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code an. Die Mutationen KA, KR oder A von Kinasen bezeichnet dabei einen Austausch der Aminosäure K in der ATP-Bindungsstelle nach A oder M, wodurch die Kinase inaktiviert wird. EE oder AF bezeichnen die mutierten Aminosäuren von S,T oder Y, die nach Phosphorylierung die Kinase aktivieren. Dabei wirkt ein Austausch in saure Aminosäuren wie E aktivierend, ein Austausch in neutrale Aminosäuren wie A oder F inaktivierend.

In Klammern sind die Referenzen angegeben: (1): pRSPA enthält RSV Promotor, PolyA-Signal von SV40 und "Multiple Klonierungssequenz" (MCS) von pBLII (Dorn et al. 1990). (2): Raf-BXB ist eine Deletionsmutante von C-Raf, wobei AS 26 bis einschließlich 302 deletiert wurden; Raf-C4B ist eine Kinasen-Domäne-deletierte Raf-Mutante mit 70 AS von B-Raf am C-Terminus (Bruder et al. 1992). (3): Raf-BXB-CX enthält am C-Terminus ein Farnesylierungssignalsequenz (sog. CAAX-Motiv, hier -CX bezeichnet) von Ki-Ras enthält (Hoffmeyer et al. 1998). (4): Bei MLK3(A) ist K(144) in A mutiert. (Gallo et al. 1994). (5): c-Jun (1-135) enthält nur die AS 1 – 135 (Kyriakis et al. 1994).

pkRSPA, psRSPA	D. Derse, Frederick (1)
pCDNA3	Invitrogen
pBabe puro	S. Cowley (Morgenstern and Land 1990)
pCMV5	M. Cobb (Andersson et al. 1989)
pGEM3Z-MLK3 (wt und KA)	K. Gallo, San Francisco (4)
pkRSPA-MLK3 (wt und KA)	cDNA in XhoI & XbaI von pkRSPA kloniert (Hoffmeyer et al. 1998)
pCMV5-MLK3 (wt und KA)	cDNA in EcoRI & BamHI von pCMV5 (Hartkamp et al. 1999)
pBabe-MLK3 (wt und KA)	cDNA in Sall von pBabe puro (Hartkamp et al. 1999)
pkRSPA-C-Raf	J. Bruder, Frederick (2)
pkRSPA-Raf-BXB	J. Bruder, Frederick (2)
pkRSPA-Raf-C4B	J. Bruder, Frederick (2)
pkRSPA-Raf-BXB-CX	C. Weber, MSZ Würzburg (Hoffmeyer et al. 1998)
pCDNA3-HA-Raf-BXB	C. Weber, MSZ Würzburg
pEBG-HA-SAPK β	J. Kyriakis, Charlestown (Sanchez et al. 1994)
pkRSPA-HA-ERK1	cDNA in NotI von pkRSPA (Ludwig et al. 1998)
pGEX-KG-c-Jun (1-135)	J. Kyriakis, Charlestown (Kyriakis et al. 1994)
pB4x-luc	J. Bruder, Frederick
pRSV- β Gal	T. Wirth, Würzburg (Hoffmeyer et al. 1998)
pBabe puro MEK1 (wt, A und EE)	S. Cowley (Cowley et al. 1994)
pCDNA3 MEK1 (wt, A und EE)	cDNAs in BamHI & EcoRI von pCDNA3 (*)
pRK5-MEK1 K97M	cDNA aus pRSETA-MEK1 K97M (N. Ahn) in BamHI & HindIII von pRK5 (Hartkamp et al. 1999)
pRK5-Rac1 L61	A. Hall
pRK5-Cdc42 L61	A. Hall
pRK5-RhoA L61	A. Hall

pBabe puro-Rac1 L61
pBabe puro-Cdc42 L61
pCMV6-PAK1 T423E
pT22 Ras V12

cDNA in BamHI & EcoRI von pBabe puro (*)
cDNA in BamHI & EcoRI von pBabe puro (*)
J. Chernoff
G. Prendergast

3.1.9. Zelllinien und Bakterien stämme

HEK293	humane embryonale Leberzelllinie, transformiert mit Adenovirus ATCC (America Type Culture Collection) CRL-1573
HeLa	humane Cervix-Karzinomzellen ATCC (America Type Culture Collection) CCL-2
NIH-3T3	murine Fibroblasten Zelllinie ATCC (America Type Culture Collection) CRL-1711

Bakterienstämme: *E. coli* DH5 α GIBCO-BRL, Karlsruhe

3.1.10. Geräte

Brutschränke, Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	G. Tietsch, Mechanikwerkstatt MSZ; Biorad, München
Eppendorf Minizentrifugen 5417C, R	Eppendorf, Hamburg
Megazentrifuge: Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Spektral-Photometer	Jouan, Unterhaching
Thermocycler, GeneAmp PCR System	Perkin Elmer, Foster City
Microlumat	EG&G Berthold, Wildbad

3.2. Arbeitsmethoden

Soweit nicht anders vermerkt, sind die nachfolgend aufgeführten Methoden in Anlehnung an die beschriebenen Protokolle aus "Current Protocols in Molecular Biology" von Ausubel et al. (Ausubel et al., 1997) und "Molecular Cloning: a laboratory manual" von Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) durchgeführt worden.

3.2.1. Bakterienkulturen

Als *E. coli* Stamm werden DH5 α verwendet.

Übernachtkulturen: 1 - 2 ml ampicillinhaltiges LB- (22 g LB Broth in 1 l ddH₂O; autoklaviert, danach 100 μ g/ml Ampicillin zugefügt) oder TB- Medium (47 g TB Broth in 1 l ddH₂O; autoklaviert, danach 100 μ g/ml Ampicillin zugefügt) werden mit einer Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Glycerindauerkulturen: 0,6 ml Bakteriensuspension werden mit 300 μ l 80% Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Transformation von Bakterien: Die bei -70°C gelagerten kompetenten Bakterien werden langsam auf Eis aufgetaut und 25 μ l der Zellen werden mit 3-5 μ l Ligationsansatz oder einer entsprechenden Menge Plasmid-DNA gemischt. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis und anschließendem Hitzeschock (45 sec) bei 42°C wird 1 ml SOC-Medium (2 % (w/v) Bacto

Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCL, 10 mM MgCL₂ und 10 mM MgSO₄ in 980 ml ddH₂O pH6,7-7,0; autoklaviert, danach 20 ml sterile 1M Glucose-Lösung zugefügt) auf Eis zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. 200 µl der Bakteriensuspension werden auf vorgetrockneten ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (1,4% Agar-Agar in LB-Medium, dem nach Autoklavieren und anschließendem Abkühlen bei 50°C 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt wird) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien sind mit einem Plasmid, welches das Ampicillin-Resistenzgen enthält, transformiert worden.

3.2.2. Bestimmung der DNA Konzentration

Bestimmt man die optische Dichte (OD) einer verdünnten DNA-Lösung bei 260nm, so kann daraus die Konzentration errechnet werden. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA von 40 µg/ml.

3.2.3. Konstruktion von Expressionsvektoren

Analyse von Nukleinsäuren auf Agarose-Gelen (Agarose-Gelelektrophorese): DNA-Fragmente können je nach ihrer Größe auf 0,7 – 2,5%-igen Agarosegelen voneinander getrennt werden. Durch kurzes Aufkochen in 1xTAE (40 mM Tris-HCL, 40 mM Eisessig, 2 mM EDTA pH7,8) wird die Agarose gelöst, nach leichter Abkühlung mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, in ein Gelbett gegossen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem die DNA mit 1/10 Vol. Probenpuffer (40% (w/v) Saccharose, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt wurde, erfolgt die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 50 - 100 V mit 1xTAE als Laufpuffer. Als DNA-Größenmarker wird 100 ng 1 kb DNA-Längenstandard mit auf das Gel geladen. Bei UV-Bestrahlung wird die DNA aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar und kann fotografiert werden.

Reinigung und Fällung von DNA: Zur Reinigung einer DNA-Lösung von Proteinen wird diese mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgt durch 10 Min. Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer Mikrozentrifuge. Die obere, wässrige Phase wird mit 2,5 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. 3M Natriumacetat (pH4,9) versetzt, 10 Min. auf Trockeneis gefällt und anschließend bei 4°C 15 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird dann zuerst mit 1 ml 96% Ethanol, anschließend mit der gleichen Menge 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wird in 10 mM Tris-HCl (pH8) aufgenommen und weiter analysiert.

Restriktionsverdau: Für die Spaltung von 1 µg DNA verwendet man in der Regel eine Einheit einer (oder mehrerer) Restriktionsendonuklease(n) (eine Einheit eines Restriktionsenzym ist die Aktivität, die 1 µg DNA in 1 h spaltet). Mit dem entsprechenden 10x Restriktionspuffer, dessen Salzkonzentration je nach Enzym ausgewählt wird, stellt man das Volumen des Ansatzes mit ddH₂O so ein, dass die Enzymmenge nicht mehr als 1/10 des Gesamtansatzes ausmacht. Grund hierfür ist, dass die Enzymlösung Glycerin enthält, das in zu hoher Konzentration hemmend auf die Reaktion wirken könnte. Der Ansatz wird ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Trennung der einzelnen DNA-Fragmente wird der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen: Die DNA-Fragmente können mittels Silikagel-Partikel aus Agarosegelen isoliert werden. Entsprechend der Beschreibung des Qiaex II Protokolls werden die Agarosestücke in einem Mikroreaktionsgefäß mit drei

Volumen Puffer QX1 10 Min. bei 50°C inkubiert. Hohe Salzkonzentrationen sorgen dabei sowohl für die Auflösung der Agarose-Polymere als auch für die Dissoziation DNA-bindender Proteine von den DNA-Fragmenten. Gleichzeitig absorbieren die dem Puffer zugesetzten Silikagel-Partikel die DNA-Moleküle. Durch 30 Sek. Zentrifugation in einer Tischzentrifuge können diese Silikagel-Partikel gesammelt werden. Waschen mit dem Puffer PE, der 70% Ethanol enthält, entfernt anschließend Salzverunreinigungen. Nach dem Trocknen der Partikel kann die DNA mit ddH₂O durch 5 Min. Inkubation bei 50°C eluiert werden.

Überführung von "überhängenden" DNA-Enden in "glatte": Um die bei der Spaltung mit den meisten Restriktionsenzymen entstehenden überhängenden ("sticky-end") 5'-Enden in glatte ("blunt-end")-Enden zu überführen, wird die DNA entweder mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase behandelt, wobei die kürzeren Stränge aufgefüllt werden. Wird die DNA mit MungBean Nuklease inkubiert, werden die überhängenden Enden abverdaut. 1 µg DNA wird in "nick-translation"-Puffer mit 2 mM dNTPs und zwei Einheiten Klenow-Fragment 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion mit MungBean Nuklease erfolgt bei 30°C für 20 Min. in 1x MungBean Nuklease-Puffer und wird durch Zugabe von 0,01% SDS gestoppt. Anschließend wird die DNA durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt.

Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden: Die Phosphatgruppe am 5'-Ende gespaltener DNA-Moleküle kann mit Calf-Intestine-Phosphatase (CIP) entfernt werden, um bei einer Ligationsreaktion den Ringschluß des Vektors zu verhindern. Dazu werden 2,5 µg DNA in 1x CIP-Puffer mit 1 µl CIP 30 Min. bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 mM EDTA und 15 Min. Inkubation bei 65°C wird das Enzym inaktiviert, und die DNA kann nach Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation direkt im Ligationsansatz eingesetzt werden.

Ligation: Bei Ligationen von "sticky"-DNA-Enden wird ein 3-facher molarer Überschuß, bei "blunt-end"-Ligationen ein 10-facher molarer Überschuß von Insert zu Vektor verwendet. 100 ng DNA werden mit 10 Einheiten T4-DNA-Ligase versetzt und in 1x Ligationspuffer in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 16°C inkubiert. Mit dem Ligationsansatz werden danach kompetente Bakterien transformiert (Kap. 3.2.1.).

Isolation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation): Die Bakterien von 1 ml Übernachtskultur werden durch 20 Sek. Zentrifugation in einer Minifuge bei 14.000 rpm sedimentiert. Das Pellet wird mit 100 µl Puffer I (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNase A pH8) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer II (200 mM NaOH, 1% SDS) werden die Bakterien 5 Min. bei RT lysiert. Danach werden 100 µl Puffer III (3M Kaliumacetat pH6) zugegeben, geschwenkt und 5 Min. bei 4°C inkubiert, wobei ein Großteil der bakteriellen Proteine ausfällt. Die präzipitierten Proteine und die Membranfragmente mit der assoziierten chromosomalen DNA werden für 5 Min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wird durch Zugabe von 1 ml Ethanol bei -70°C für 5 Min. gefällt und durch Zentrifugation für 15 Min. bei 14.000 rpm sedimentiert. Das Präzipitat wird mit 70% Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in 20 µl ddH₂O aufgenommen und mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese analysiert.

Von positiven Klonen werden Glycerolstocks angelegt sowie eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Die DNA wird zur Kontrolle der Klonierung sequenziert.

3.2.4. Sequenzanalyse von DNA

Sequenzreaktion: Das zur Sequenzierung von DNA verwendete "Taq Cycle Sequencing" basiert auf der klassischen Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977), verwendet jedoch statt der T7-Polymerase die Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*. Dabei wird die zu analysierende DNA ausgehend von dem Sequenzierungsprimer linear amplifiziert, wobei es durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zu Kettenabbrüchen kommt. In den aufeinanderfolgenden Zyklen wird die DNA zunächst thermisch denaturiert, der Sequenzierungsprimer hybridisiert und von diesem ausgehend ein komplementärer Strang synthetisiert, bis es durch den Einbau eines ddNTPs zum Abbruch der Reaktion kommt. Diese Methode ermöglicht eine Auflösung komplexer Sekundärstrukturen und benötigt geringere Mengen DNA. Der verwendete "Dye Terminator-Taq Sequenzierungskit" ermöglicht zusätzlich in Verbindung mit dem ABI-373 DNA-Sequenzer die Verwendung aller vier ddNTPs in einer Reaktion, da ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP jeweils an einem andersfarbigen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Für jede Reaktion werden folgende Reagenzien gemischt:

- 8,0 µl Prämix (ddNTPs, NTPs, 5xTACS-Puffer und AmpliTaq DNA-Polymerase)
- 1,0 µl DNA "template" (0,5 µg)
- 1,0 µl Primer (10 pmol)
- 10 µl ddH₂O

die Reaktion erfolgt in 25 Zyklen von 15 Sek. 96°C, 15 Sek. 48°C gefolgt von 4 Min 60°C.

Die nachfolgende Probenaufbereitung und Probenanalyse wurde von R. Krug (MSZ, Würzburg) durchgeführt.

Probenaufbereitung: Mit 80 µl ddH₂O wird zunächst die untere wässrige Phase entnommen und zweimal mit Phenol/Wasser/Chloroform (68/18/14) extrahiert, um nicht inkorporierte, an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte ddNTPs abzutrennen, die bei der Analyse stören. Aus der wässrigen Phase werden die Reaktionsprodukte präzipitiert, gewaschen, getrocknet und schließlich in 3 µl Formamid/50mM EDTA (5.1) resuspendiert.

Probenanalyse: Die Sequenzierungsprodukte werden auf einem 373A DNA-Sequenzer in einem 6%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dabei erfolgt eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mittels eines Argonlasers wenn diese die Detektionseinheit passieren und ihre Sekundärstrahlung wird über einen Filter und einen Photomultiplier aufgezeichnet. Nach Beendigung des Laufs ergibt sich so für jede Spur ein Rohdaten-Gelbild bestehend aus den vier verschiedenen Farben. Mittels der Analysesoftware wird daraus ein Chromatogramm erstellt, aus dem sich die Sequenzfolge innerhalb der analysierten DNA ermitteln läßt.

3.2.5. Maxipräparation von Plasmid DNA

Die für Anwendungen wie Sequenzierung oder Transfektion von Säugerzellen benötigten größeren Mengen an gereinigter Plasmid-DNA wird mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits isoliert. Das Verfahren entspricht der oben beschriebenen Plasmid-DNA Minipräparation im größeren Maßstab mit anschließender Aufreinigung an einer Ionenaustauschersäule.

50 ml ampicillinhaltiges Circle-Grow-Medium (4% w/v Circle Grow in ddH₂O mit 100 µg/ml Ampicillin) werden mit rekombinanten Bakterien aus einem Glycerolstock oder mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Bakterien werden pelletiert, in 10 ml Resuspensionspuffer (P1) aufgenommen und durch Zugabe von 10 ml Lyse-Puffer (P2) aufgeschlossen. Anschließend wird 10 ml eiskalter Neutralisationspuffer (P3) zupipettiert und die dabei präzipitierten bakteriellen Proteine und chromosomale DNA durch Zentrifugation bei 5000g sedimentiert.

Der Überstand wird auf eine equilibrierte Qiagen-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Die Säule wird nach dem Qiagen Protokoll gewaschen, um RNA-Fragmente, Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wird die Plasmid-DNA mit Hochsalzpuffer eluiert. Aus dem Eluat wird die DNA mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und bei 3000g für 30 Min. abzentrifugiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wird dann vorsichtig in 200 µl ddH₂O gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Zuvor werden 5 µl der DNA-Lösung für eine Restriktionskontrolle und Konzentrationsbestimmung abgenommen. Die photometrische Messung der DNA-Lösung bei 260 und 280 nm erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA, wobei der Quotient aus OD(260):OD(280) bei hoher DNA Reinheit zwischen 1,6 und 2 liegen sollte.

3.2.6. Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine werden Bakterien des Stammes E.coli BL21 verwendet. Die für die Expression von GST-Proteinen verwendeten pGEX-Vektoren (Pharmacia) besitzen einen LacZ-Promotor, der die Transkription des GST-Fusions-Gens kontrolliert. Die Expression wird durch Lactose oder das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Aufreinigung aus den Bakterienlysaten erfolgt entsprechend dem Protokoll von Pharmacia, wobei die GST-Fusionsproteine durch Bindung an eine Glutathion-Sepharose-Matrix von den anderen bakteriellen Proteinen separiert und dann von der Matrix durch Zugabe von freiem Glutathion eluiert werden. Für jedes Protein werden für maximale Expressionsraten die Bedingungen optimiert, wobei man das Kulturmedium, die optische Dichte der Bakteriensuspension zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG, die IPTG Konzentration, sowie die Dauer und Temperatur der Induktionsphase variiert.

100 ml einer Übernachtskultur werden in 1 l 2-YT-Medium (16 g Bacto-Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl in 900 ml ddH₂O gelöst, autoklaviert und mit 100 ml einer sterilen 20%igen Glucose-Lösung und 100 µg/ml Ampicillin versetzt) überführt und bei 37°C und 220 rpm in einem Schüttler bis zu einer OD(600nm) von 0,6 wachsen gelassen. Nach Zugabe von 0,3 mM IPTG werden die Bakterien für weitere 2 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien werden anschließend durch zehnmünütige Zentrifugation bei 5.000 rpm pelletiert und in 50 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl pH8; 120 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM Pefabloc) lysiert, wobei 2 mg/ml Lysozym zugegeben wird und man die Suspension bei 4°C rotiert. Alle folgenden Schritte werden bei 4°C ausgeführt. Um die DNA zu verdauen, werden 2,5 mM MgCl₂ und 1 µl DNaseI (Sigma) zugegeben und für weitere 15 Min. rotiert. Durch 60 Min. Zentrifugation bei 10.000 rpm werden die Zelltrümmer entfernt. Das im Überstand enthaltene rekombinante Protein bindet im anschließenden Schritt mit seinem GST-Anteil an zugesetzte 1 ml Glutathion-Partikel, die zuvor mit dem Lyse-Puffer equilibriert wurden. Nach 1 h Inkubation werden die Glutathion-Partikel dreimal mit Lyse-Puffer gewaschen und dann mit 1 ml Elutioslösung (10 mM Glutathion in 50 mM Tris pH8) für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation erhält man im Überstand das Fusionsprotein. Die Elution wird drei bis viermal wiederholt und von den Eluaten wird der Proteingehalt photometrisch bestimmt (Kap. 3.2.7.). Das Glutathion wird durch Zentrifugation in Zentrifugal-Konzentratoren entfernt, wobei zugleich die Proteine in Kinase-Puffer umgepuffert werden. Die Konzentration der so gereinigten Fusionsproteine wird in einem Bradford-Assay bestimmt und die Integrität der Protein durch SDS-Page und Coomassie-Blau Färbung verifiziert. Die Proteine werden durch Zusatz von 10% Glycerol bei -70°C gelagert.

3.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wird mit einem kommerziell erhältlichen Nachweissystem (Bio-Rad-Assay, Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis beruht auf einer Interaktion des Farbstoffs Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren (Bradford 1976). 1 bis 10 μ l eines Zellextraktes oder Proteinlösung werden für 10 Min. bei RT mit 1 ml des 1:5 in H₂O verdünnten Reagenz inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Eichprotein wird eine standardisierte BSA-Probe eingesetzt.

3.2.8. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein denaturierendes Polyacrylamidgel dient der Fraktionierung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts. Es besteht aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 6-15%-igen Trenngel mit unterschiedlichen pH-Werten.

a.)Trenngel:	3 M Tris pH8,9	1,25 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (40%)	1,5-3,75 ml
	20% SDS	0,05 ml
	ddH ₂ O	5-7,25 ml
	10% APS	0,1 ml
	TEMED	10 μ l
b.)Sammelgel:	1,0 M Tris pH6,8	1,25 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (40%)	1,1 ml
	20% SDS	0,05 ml
	ddH ₂ O	6,8 ml
	10% APS	0,1 ml
	TEMED	10 μ l
		Jeweils für 10 ml

Zunächst wird das Trenngel zwischen die senkrecht stehenden Glasplatten gegossen, bis diese zu etwa 3/4 gefüllt sind und sofort mit Isopropanol überschichtet, damit die Oberfläche gleichmäßig polymerisiert. Nach der Polymerisierung gießt man das Isopropanol ab, füllt mit Sammelgel auf, führt einen Gelkamm ein und läßt auch dieses polymerisieren.

Der Laufpuffer enthält Glycin, das bei niedrigem pH-Wert protoniert oder zwitterionig, bei hohem pH-Wert anionisch vorliegt (isoelektrischer Punkt ca. pH6). Im Sammelgel mit seinem niedrigen pH wandern deshalb die Chlorid-Ionen (Leitonen) schneller als das Glycin (Folgeionen). Durch diese Ladungstrennung kommt es lokal zu erhöhter Spannung. Die Proteine werden beschleunigt und kommen so, unabhängig von ihrer Größe, fast gleichzeitig am Trenngel an. Durch die pH-Änderung im Trenngel wird das Glycin zum Anion und kann somit genau so schnell wie das Chlorid-Ion im elektrischen Feld wandern. Die Proteine werden nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Bis zu 50 μ g der zu fraktionierenden Proteinextrakte werden mit dem SDS-Ladepuffer (31 mM Tris-HCl pH 6,8; 1% SDS, 5% Glycerin, 2,5% β -Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau) gemischt und 5 Min. bei 95°C denaturiert. Nach dem Auftragen erfolgt die Elektrophorese bei 10 V/cm im Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS).

3.2.9. Immunoblot

Für den Nachweis bestimmter Proteine durch Antikörper wird das Gel zunächst für 45 Min. in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 10% Methanol) bei 400 V auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran geblottet. Die Membran wird getrocknet, die unspezifischen Proteinbindungen in 5% Milchpulver (oder BSA) in PBS mit 0,01-0,05% Tween20 für eine Stunde geblockt. Anschließend wird für drei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C der Blot mit dem ersten spezifischen Antikörper, entsprechend in Milch-/BSALösung verdünnt, inkubiert. Nach dreimaligem 5 minütigen Waschen der Membran in PBS/Tween20 (0,01–0,05%) wird der Blot mit dem zweiten (gegen den ersten Antikörper gerichteten), an Peroxidase gekoppelten Antikörper für 30-60 Min. bei RT inkubiert. Alternativ wird auch anstelle eines zweiten Antikörpers ProteinA-gekoppelte Peroxidase verwendet. Nach erneutem Waschen (3 x 5 Min.) mit PBS/Tween20 (0,01-0,05%) werden mit dem ECL-System die Antikörper-gebundenen Proteine detektiert. ECL ist eine lichtemittierende, nicht radioaktive Methode zur Detektion immobilisierter Antigene, die direkt oder indirekt an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte Antikörper gebunden sind. Durch die Peroxidase wird die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen katalysiert. Nach der Oxidation befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand, von dem es unter Licht-Emission wieder in den Grundzustand zurückfällt. Das so erzeugte Licht hat eine Wellenlänge von 428 nm und kann durch die Exposition eines Röntgenfilms detektiert werden. Die Membran wird dazu leicht angetrocknet und für eine Minute mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Komponenten inkubiert. Anschließend wird die Membran getrocknet und ein Röntgenfilm für 0,1-30 Min. aufgelegt.

Strippen: Nach erfolgter Antikörperreaktion können die verwendeten Antikörper wieder vom Blot abgewaschen werden. Dieser "gestrippte" Blot lässt sich anschließend für die Detektion weiterer Proteine verwenden.

Der verwendete Blot wird hierfür 30 Min. bei 50°C in Strip-Puffer (60 mM Tris-HCl pH6,8; 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS) inkubiert. Anschließend wird der Blot 5-7x in PBS/Tween gewaschen, um Verunreinigungen von β -Mercaptoethanol zu entfernen.

3.2.10. Zellkultur: Haltung eukaryotischer Zelllinien in Kultur

Alle Arbeiten werden unter Laminarluftfluß mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren oder mit sterilen Kunststoffmaterialien und Nährmedien durchgeführt. Sämtliche Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Jurkat T-Zellen werden in RPMI-1650, NIH-3T3 sowie HeLa und HEK293 Zellen werden in DMEM gehalten, wobei den Medien 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und Antibiotika (je 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin) zugesetzt wird. Jurkats werden alle drei Tage und die adhärenen Zellen bei Erreichen der Konfluenz 1:10 gesplittet. Dazu werden die Zellen durch 1-5-minütige Behandlung mit einer 0,5%igen Trypsin-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und nach Suspendierung in frischem Medium wieder ausgesät.

Zur Lebendbestimmung werden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Lebende Zellen mit intakter Membran sind impermeabel für diesen Stoff, während er in tote Zellen eindringt und diese blau färbt. Zur Trypanblauanalyse werden die Zellen geerntet, durch Zentrifugation pelletiert und mit 5×10^6 Zellen/ml in Trypanblaulösung resuspendiert. Unter dem Mikroskop wird dann das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen in einem Hämatozytometer ermittelt.

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Dazu werden die Zellen pelletiert und mit ca. 5×10^6 Zellen/ml in Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen. 500 µl Aliquots werden über Nacht bei -80°C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Für die Reaktivierung werden die Zellen rasch aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Der DMSO-haltige Überstand wird entfernt und die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen.

Um die Zellen zu stimulieren, werden verschiedene Reagenzien verwendet. Wenn nicht anders angegeben werden die Zellen mit 10% FCS, 500 µM Natrium-Arsenit oder 10 ng/ml Anisomycin stimuliert. HeLa und HEK293 werden außerdem mit 100 ng/ml TPA stimuliert.

Die Kinase-Inhibitoren PD 098059 (20 mM in DMSO) und UO126 (1 mM in DMSO) werden in den jeweiligen Konzentrationen 20 Min. vor Stimulation zugegeben.

3.2.11. Transiente Transfektion von Säugerzellen

Um Vektor-DNA in Zellen einzuschleusen, werden zwei grundsätzlich verschiedene Methoden verwendet. Für die adhärenenten HEK293 Zellen wird die Calciumpräzipitationsmethode eingesetzt, die darauf basiert, dass die DNA als Kopräzipitat mit Calciumphosphat von den Zellen aufgenommen wird. Zum anderen wird eine auf Liposomen basierende Transfektionsmethode eingesetzt, wobei sich die DNA hierbei an die Liposomen anheftet und diese mit der Zellmembran verschmelzen. Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 70% konfluent sind.

Calciumpräzipitationsmethode: 1-3 µg DNA werden mit 100 µl 0,25 M CaCl₂ gemischt und unter ständigem vorsichtigen vortexen werden 100 µl 2xBES (5 mM BES, pH 6,97; 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄) hinzugegeben. Nach 15 Min. Inkubation bei RT wird die Lösung zu den mit 2 ml Kulturmedium überschichteten Zellen tropfenweise hinzugeführt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank werden die Präzipitate mit vorgewärmter PBS Lösung abgewaschen und die Zellen mit 0,0–0,3% FCS enthaltendem Medium gehungert.

LipofektAMIN-basierende Transfektion: Diese Transfektionsmethode wird für NIH 3T3 und HeLa Zellen eingesetzt. Zu 100 µl DMEM werden insgesamt 1,0 µg Plasmid-DNA gegeben. Dieses wird mit 100 µl DMEM, welches 6 µl LipofektAMIN enthält gemischt. Nach 30 Min. Inkubation bei RT werden 800 µl DMEM hinzugefügt. Diesen Ansatz pipettiert man dann vorsichtig auf die Zellen, die vorher 2 x mit DMEM gewaschen wurden, um Serumreste zu entfernen. Nach 5-6 h Inkubation im Brutschrank wird die Transfektionslösung gegen Kulturmedium ausgetauscht.

3.2.12. Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Herstellung stabiler Zelllinien werden NIH 3T3 Zellen mit der Lipofektamin Transfektionsmethode mit einem Expressionsplasmid, welches ein zur Selektion geeignetes Resistenzgen trägt, transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion werden die Zellen in eine Schale überführt und das Medium mit einer vorher austitrierten Menge des entsprechenden Antibiotikums versehen (NIH 3T3: 5,5 µg/ml Puromycin). Die Selektion ist beendet wenn alle Kontrollzellen unter den gleichen Bedingungen gestorben sind, während sich in der transfizierten Population resistente Kolonien gebildet haben.

3.2.13. Soft-Agar Klonierung

Soft-Agar Klonierung ist eine Methode, um transformierte Zellen zu identifizieren und klonale Zelllinien zu generieren, welche die Fähigkeit besitzen ohne Substratanheftung (anchorage independent) zu wachsen und zusätzlich keine Kontaktinhibierung aufweisen (Rapp and Todaro 1978).

Für die Soft-Agar Klonierung wurden Zellen 24 Stunden nach Transfektion oder Infektion verwendet. Für den Bottom-Agar wurde zunächst 0,5%iger Agar hergestellt (5%ige Sea Plaque Agarose bei 37°C mit vorgewärmtem Medium verdünnt) und in Schalen gegossen. Der aus 0,3%iger Sea Plaque Agarose bestehende Top-Agar wurde mit 10^3 - 10^5 Zellen versetzt, durchmischt und auf den Bottom-Agar gegossen. Die Schalen wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert und auf Kolonienbildung überprüft. Transformierte Zellhaufen können mit einer Pipette aus dem Agar isoliert und weiter vermehrt werden um Experimente mit diesen klonalen Zelllinien durchzuführen.

3.2.13. in vivo Phosphomarkierung von HeLa Zellen

Um HeLa Zellen mit radioaktivem Phosphat zu markieren, werden diese vor der Markierungsphase zweimal mit phosphatfreiem Medium gewaschen und dann in phosphatfreiem Medium für 4 h inkubiert. Danach werden 0,5 mCi [32 P]-ortho-Phosphat/ml Medium hinzugefügt und die Zellen nach 2 h geerntet.

3.2.15. Immunpräzipitation

Die zu erntenden Zellen wurden in PBS gewaschen und dann in Lysis-Puffer (für MAPK Ips RIPA: 25 mM Tris-HCl pH8; 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholat, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, 1 mM NaOVanadat, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin; für MLK3 Ips: 25 mM Tris-HCl pH7,5; 0,2% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 20 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM DTT, 1 mM NaOVanadat, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin oder aber für MEK (hier auch für MLK3 und Raf) Ips 50 mM HEPES pH7,5; 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM NaF, 100 µM β-Glycerophosphat, 1 mM NaOVanadat und Protease Inhibitor Cocktail D) lysiert, 10 Min. auf Eis inkubiert und schließlich die Lysate von unlöslichen Zelltrümmern durch 15-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C getrennt. Die Lysate werden dann mit spezifischen Antikörpern und 25 µl ProteinA-Agarose-Partikel in 1 ml Lysispuffer 2h bei 4°C inkubiert. Die Präzipitate werden anschließend zweimal mit Lysispuffer Puffer gewaschen und entweder direkt im SDS-Page analysiert oder für den Immunkomplex-Kinase-Assay verwendet, wobei sie noch zweimal in Kinase-Puffer (3.2.16.) gewaschen werden.

3.2.16. “*in vitro*” Kinase-Assay

Da Kinasen γ -Phosphatgruppen von ATP auf Substrate übertragen, ist es möglich, ihre Aktivität *in vitro* durch die Zugabe von [^{32}P - γ] ATP und eines geeigneten Substrats zu messen. Dazu werden die Kinasen wie oben beschrieben immunpräzipitiert, gewaschen und mit 5 μCi [^{32}P - γ] ATP, 2-5 μg Substrat in 20 – 30 μl Kinase-Puffer (30 mM HEPES pH7,0; 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0,1 mM NaOVanadat) bei RT für 20 Min. unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wird mit SDS-Ladepuffer gestoppt, die Proben bei 95°C 5 Min. erhitzt, die Agarosepartikel pelletiert und der Überstand durch SDS-PAGE, anschließender Autoradiographie und mittels Immunoblot weiter analysiert. Als Substrat für ERK wird 1 μg MBP, für JNK/SAPK 2 μg GST-c-Jun (1 – 135) und für MLK3 2 μg MEK1 K97M oder 5 μg GST SEK1 KR.

Mit Hilfe der phospho-spezifischen Antikörper ist es möglich Kinase Assays ohne Radioaktivität durchzuführen. Für MEK Ips wurden nach zweimaligem waschen mit Lysispuffer zweimal mit Kinase Puffer (50 mM Tris-HCl pH7,5; 100 mM NaCl, 1 mM MnCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 0,1 mM NaOVanadat, 1 mM DTT, 10 mM NaF) gewaschen und mit 500 μM ATP, 1-2 μg Substrat in 45 μl Kinase Puffer bei RT für 25 Min. unter leichtem Schütteln inkubiert und wie oben beschrieben weiterverfahren. Es wurde als Substrat für MLK3 1 μg GST-MEK1 wt und für MEK 1 μg His-ERK2 wt eingesetzt.

3.2.17. Luciferase Test

Der Luciferase-Aktivitätstest basiert darauf, dass Luciferase sein Substrat Luciferin unter Lumineszenzabgabe umsetzt, was quantitativ im Luminometer meßbar ist, wobei die Lumineszenz direkt proportional zur Menge der Luciferase-Aktivität ist.

Die Zellen werden mit Luci-Lysepuffer (50 mM Na-MES, 50 mM Tris-HCl pH7,8; 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100) 30 Min. lysiert, die Zelltrümmer pelletiert und 30 μg des Gesamtproteinextraktes in 50 μl Luci-Lysepuffer zusammen mit 50 μl Assay-Puffer (125 mM Na-MES, 125 mM Tris-HCl pH7,8; 25 mM Mg-Acetat, 2 mM ATP) für den Luciferase-Assay in 96-Napf-Mikrotiterplatten im Luminometer eingesetzt. 2 Sek. nach Zugabe von 50 μl Luciferin-Lösung (1 mM Luciferin in 5 mM KH_2PO_4) wird die Lumineszenz in einem Zeitraum von 5 Sek. gemessen. Die relative Lichtemission wird entweder auf Proteinkonzentration oder auf die β -Galaktosidase Aktivität im Lysat relativiert.

Von den Ergebnissen aller Experimente, wobei innerhalb eines Experiments jede Transfektion mindestens in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt wird, werden die Mittelwerte und Standardabweichung vom Mittelwert berechnet. Die Standardabweichung (SA) ergibt sich aus der Wurzel von $\{[\sum (x_i - m)^2] : n\}$, wobei m der Mittelwert von n Einzelwerten x_i ist.

3.2.18. **β -Galaktosidase Test**

Ein künstliches Substrat für das Enzym β -Galactosidase ist ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid). Bei dessen Spaltung durch das Enzym entsteht ein gelber Farbstoff. Durch Messung der Absorption kann die Transkriptionsaktivität der Zellen in Abhängigkeit von der Promotor Aktivität bestimmt werden.

Zu 500 μ l β -Gal-Assay-Puffer (100 mM Na-Phosphat-Puffer pH7,4; 10 mM KCL, 1 mM MgSO₄, 3,5 μ l/ml β -Mercaptoethanol) werden 10–20 μ l Zellextrakt (was ungefähr einer Gesamtproteinmenge von 12–15 μ g entspricht) und 100 μ l ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in 0,5 M Na-Phosphatpuffer pH7,0) gegeben. Danach folgt eine Inkubation bei 37°C bis eine deutliche Gelbfärbung der Lösung erkennbar wird. Zum Abstoppen der Reaktion werden 250 μ l Stoppuffer (1 M Na₂CO₃) hinzugefügt. Innerhalb der nächsten 30 Min. wird die Absorption bei Licht der Wellenlänge 420 nm gegen die Lehrwertkontrolle gemessen.

4. Ergebnisse

4.1. Identifizierung intrazellulärer MAPK Kaskaden, die durch MLK3 aktiviert werden

4.1.1. MLK3 aktiviert die Transkription von AP-1/Ets-abhängigen Promotoren

Für viele MAPKK Kinasen einschließlich solcher mit onkogenem Potential konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sie die Transkription von Promotoren mit AP-1/Ets Bindestellen regulieren können (Bruder et al. 1992; Wasylyk et al. 1998; Hagemann et al. 1999). Daher wurde die Fähigkeit der MAPKKK MLK3 getestet, Transkription vom pB4x Luciferase Reporter Konstrukt in HEK 293 Zellen zu aktivieren. Das verwendete Reporter Plasmid enthält 4 Kopien eines 'Onkogen induzierbaren Elements' des Polyomavirus Enhancers. Dieses wurde oberhalb des mit dem *Luciferase* Gen fusionierten β -Globin Promotors inseriert. Jedes der 4 Kopien enthält eine AP-1 Bindestelle, die mit einer Ets-1 Bindestelle überlappt (Wasylyk et al. 1998). Im verwendeten Zellsystem führte die Überexpression von Wild Typ MLK3 zu einem 25-fachen Anstieg der Transkription des Reporter Konstrukts verglichen mit dem Leervektor. Überexpression von aktiviertem C-Raf (Raf-BXB), welches als Positivkontrolle diente, resultierte in einer 36-fachen Induktion. Wurde hingegen die Kinase inaktive MLK3 Mutante K144A verwendet, so konnte pB4x nicht stimuliert werden und führte sogar zu einer Reduktion der basalen Transkription um ca. 50% (Abb. 4.1). Dieses Experiment zeigt deutlich, dass MLK3 Ap-1/Ets-abhängige Transkription aktiviert, wofür die Kinasedomäne von MLK3 verantwortlich ist. Außerdem ist alleinige Überexpression von Wild Typ MLK3 ausreichend, um Transkription vom Reporter Plasmid zu aktivieren.

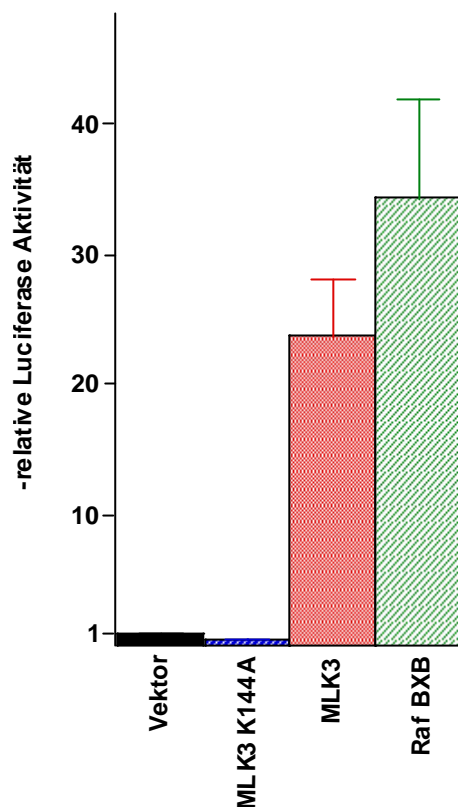


Abb. 4.1: MLK3 induziert Transkription von einem AP-1/Ets-1-abhängigen Promotor in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden transient mit 0,5 μ g pB4X Luciferase Reporter-genkonstrukt, 0,5 μ g eines RSV- β -Galaktosidase Expressionsplasmids und 2 μ g KRSPA, RSV MLK3 K144A, RSV MLK3 oder RSV Raf-BXB transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit 0,3% Serum gehungert, nach 36 h geerntet und β -Galaktosidase wie Luciferase Analysen durchgeführt. Die Luciferase Aktivitäten wurden ermittelt und auf die β -Galaktosidase Aktivität standardisiert. Die relative Luciferase Aktivität bezieht sich auf die Luciferase Aktivität der Vektorkontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 3 unabhängigen Transfektionsexperimenten.

4.1.2. Überexpression von MLK3 führt zur Raf-unabhängigen Aktivierung der MAPK ERK1

Da in früheren Arbeiten bereits gezeigt wurde, dass Aktivierung der Familie der AP-1 und Ets Transkriptionfaktoren, die an das Onkogen-induzierbare Element binden, abhängig von den MAP Kinasen ERK und JNK/SAPK ist (Treisman 1996; Wasylyk et al. 1998), wurde im gleichen Zellsystem untersucht, ob Überexpression von MLK3 diese MAP Kinasen aktiviert. Zuerst wurde analysiert, ob Überexpression von MLK3 ERK aktivieren kann. Dazu wurde Haemaglutininepitop (HA) fusioniertes ERK1 zusammen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden in HEK 293 Zellen kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die MAP Kinase immunpräzipitiert und die Aktivität in einem *in vitro* Kinase Assay mit MBP als Substrat gemessen. Wie aus Abb. 4.2 hervorgeht, führt die Koexpression von MLK3

ebenso wie die von Raf-BXB zu einer deutlichen Aktivierung von ERK1. Kinase inaktive MLK3 hatte, wie erwartet, keinerlei Effekt auf die Kinaseaktivität von ERK. Um zu testen, ob dieser Effekt auch in anderen Zellsystemen zu beobachten ist, wurden die gleichen Experimente parallel dazu in Hela, Cos7 und NIH3T3 Zellen durchgeführt. In jedem der vier getesteten Zellsysteme führte die transiente Überexpression von MLK3 zu einer Aktivierung der MAPK ERK1, die aber im Vergleich zur Raf-BXB vermittelten ERK Aktivierung immer schwächer war (Daten nicht gezeigt).

C-Raf wird für die Serum-induzierte Aktivierung von ERK benötigt (Troppmair et al. 1994). Deswegen wurde analysiert, ob dies auch für MLK3 der Fall ist. In Zellen, die mit Serum stimuliert wurden, konnte allerdings keine Inhibierung der ERK Aktivität durch Koexpression von Kinase inaktiver MLK3 nachgewiesen werden, im Gegensatz zu der dominant negativen Mutante von C-Raf, Raf-C4B (Abb. 4.2).

Um zu testen, ob MLK3-induzierte ERK Aktivierung Ras/Raf abhängig ist, wurde es zusammen mit C-Raf und Raf-C4B, welches Ras Funktion durch Interaktion mit der Effektdomäne blockiert, koexprimiert. In keinem der Versuche konnte ein Effekt auf MLK3-induzierte ERK Aktivierung gemessen werden (Abb. 4.2). Daraus folgt, dass MLK3-induzierte ERK Aktivierung unabhängig von Raf und Ras ist.

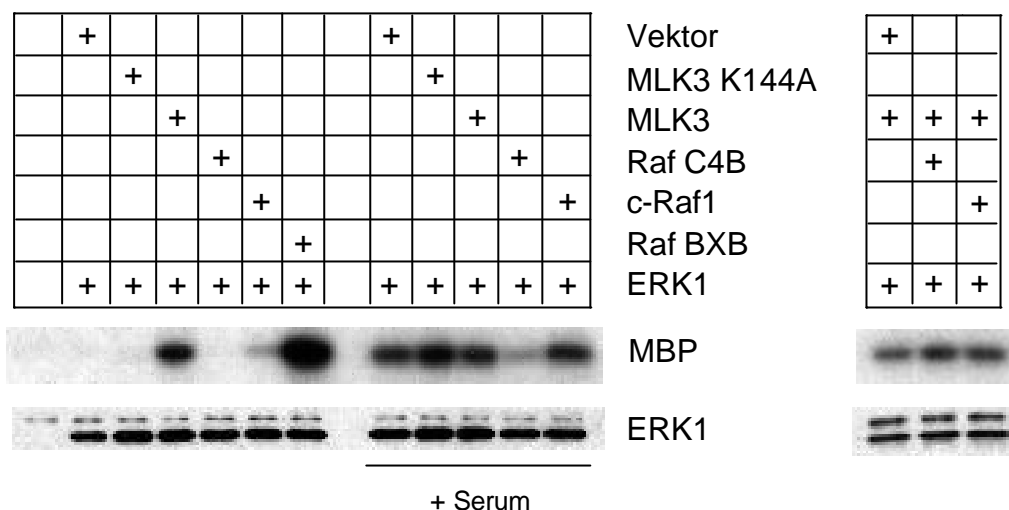


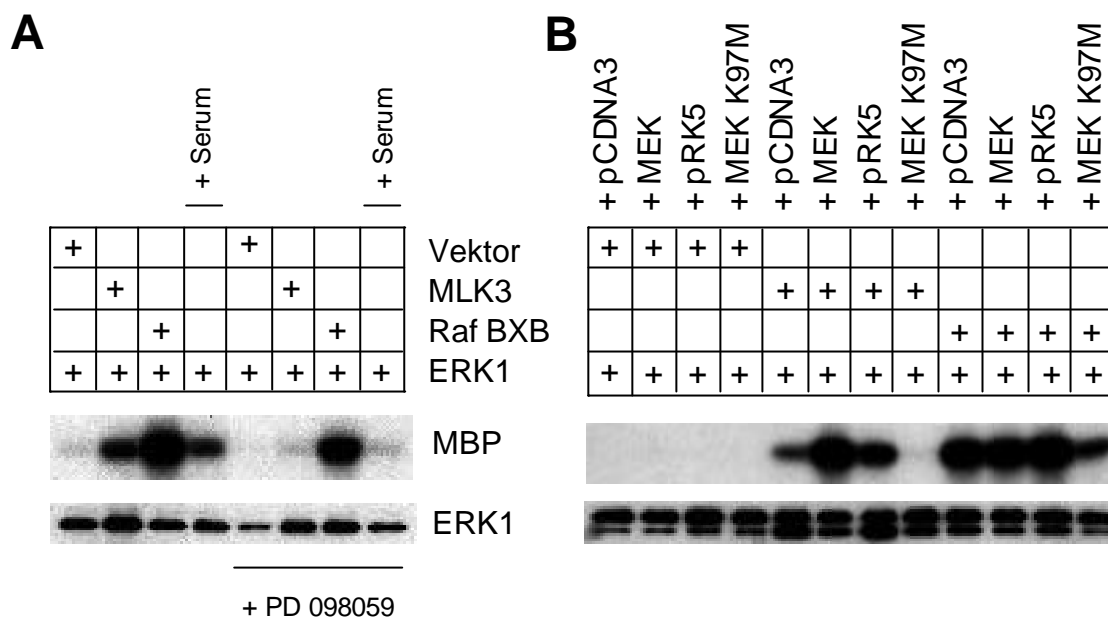
Abb. 4.2: MLK3-induzierte ERK1 Aktivierung ist Raf unabhängig.

HA-Epitop fusioniertes ERK1 (1 µg) wurde zusammen mit 2 µg der entsprechenden Expressionsplasmiden kotransfiziert. HEK 293 Zellen wurden 36 h vor dem Ernten mit 0,3% Serum gehungert und die ERK1 Aktivität wurde anschließend in einem Immunkomplex-Kinase-Assay mit MBP als Substrat gemessen. Zellen wurden 10 Minuten vor der Zellyse mit Serum stimuliert, so dass es eine Endkonzentration von 10% erreicht wurde. HA-ERK1 detektierende Immunoblots wurden als Expressionskontrolle verwendet.

4.1.3. MLK3-induzierte ERK Aktivierung ist abhängig von MEK

Aktivierung der MAPKKK Raf führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAPKKs MEK1/2 (Kyriakis et al. 1992). Um zu analysieren, ob MLK3 wie Raf ebenfalls MEK phosphoryliert und aktiviert, wurde der spezifische MEK Inhibitor PD 098059 eingesetzt (Dudley et al. 1995), der die Phosphorylierung von MEK verhindert und dadurch die Aktivierung blockiert. Wie in Abb. 4.3A dargestellt, blockt dieser Inhibitor MLK3- und Serum-induzierte ERK Aktivierung beinahe komplett, während in diesem Experiment Raf-BXB-induzierte Aktivierung der MAPK nur partiell gehemmt wurde. Diese nur partielle ERK Inhibition im Falle von Raf-BXB läßt sich durch die hohe Überexpression der Kinase erklären, denn es wurde bereits gezeigt, dass der verwendete Inhibitor Raf-BXB-vermittelte MEK Aktivierung blockt (Alessi et al. 1995).

Um die MEK Abhängigkeit der MLK3-induzierten ERK Aktivierung weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene MEK Mutanten eingesetzt und dabei folgende Ergebnisse erhalten: i) Koexpression von MLK3 und Wild Typ MEK1 führte zu einer synergistischen ERK Aktivierung und ii) Kinase inaktive MEK1 (K97M) blockierte die MLK3-induzierte Aktivierung der MAPK ERK beinahe komplett (Abb. 4.3B). Diese Daten zeigen, dass MLK3-induzierte ERK Aktivierung abhängig von MEK ist und mechanistisch ähnlich wie Raf vermittelte MEK-ERK Aktivierung funktioniert.

Abb. 4.3: A) MLK3-vermittelte ERK1 Aktivierung wird durch einen synthetischen MEK Inhibitor (PD 098059)

geblockt. B) Koexpression von Wild Typ MEK und MLK3 führt zu einer synergistischen ERK1 Aktivierung, während Kinase inaktive MEK K97M MLK3-induzierte ERK1 Aktivierung blockt.

Immunkomplex-Kinase-Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Der synthetische MEK Inhibitor PD 098059 wurde in einer Endkonzentration von 30 μM verwendet. HEK 293 Zellen wurden direkt nach der Transfektion mit 0,3% Serum gehungert und mit dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle oder dem PD Inhibitor inkubiert. Kontrolle der Expression von HA-ERK1 wurde mit HA detektierenden Antikörpern durchgeführt.

4.1.4. MLK3 aktiviert die MAPK JNK/SAPK

Um zu testen, ob MLK3 Überexpression ebenfalls zur Aktivierung von JNK/SAPK führt, wurde wie zuvor beschrieben ein *in vitro* Kinase Assay mit HA fusionierter SAPK β und GST-c-Jun (1-135) als Substrat durchgeführt. Wie in Abb. 4.4 dargestellt, führt die Überexpression von MLK3 ähnlich wie die Verwendung des bekannten JNK/SAPK Aktivators Arsenit (Cavigelli et al. 1996) zu einer starken Aktivierung von JNK/SAPK, gemessen als Fähigkeit der MAP Kinase c-Jun zu phosphorylieren. Die durch Arsenit-induzierte JNK/SAPK Aktivierung konnte jedoch nicht durch Überexpression einer Kinase inaktiven MLK3 geblockt werden. Dieses Experiment zeigt, dass obwohl MLK3 ein starker Aktivator von JNK/SAPK ist, kann es Arsenit-induzierte JNK/SAPK Aktivierung in HEK 293 Zellen nicht blocken, was vorschlägt, dass Arsenit einen MLK3 unabhängigen Signalweg benutzt, um JNK/SAPK zu aktivieren.

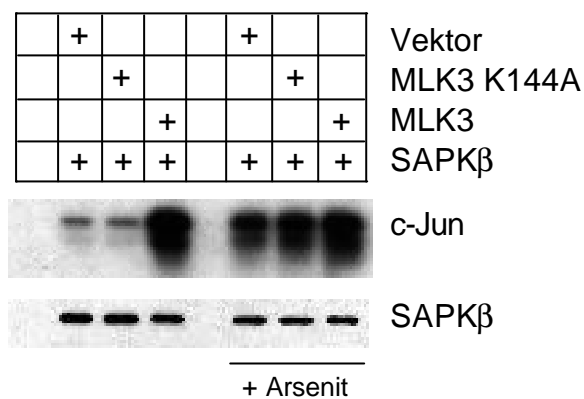


Abb. 4.4: MLK3 aktiviert JNK/SAPK, blockiert aber nicht Arsenit-induzierte JNK/SAPK Aktivierung.

HA-Epitop fusioniertes SAPK β wurde mit den entsprechenden Expressionsplasmiden koexprimiert und die Aktivität der MAPK wurde nach 36 h Hungern mit 0,3% Serum in einem Immunkomplex-Kinase-Assay mit GST-c-Jun als Substrat ermittelt. HEK 293 Zellen wurden 45 min vor der Zellyse mit Arsenit stimuliert, so dass die Endkonzentration 50 μ M betrug. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm und den HA detektierenden Immunoblot der präzipitierten Kinase.

4.1.5. MLK3 phosphoryliert MEK1 und SEK1 *in vitro*

Die bisherigen Experimente legen nahe, dass die MAPKKK MLK3 die MAP Kinasen ERK und JNK/SAPK durch Phosphorylierung der 'upstream' liegenden dual spezifischen MAPK Kinasen MEK1/2 und SEK1 aktiviert. Um zu analysieren, ob MLK3 MEK1 und SEK1 direkt *in vitro* phosphorylieren kann, wurde Flag-Epitop fusioniertes MLK3 oder HA-fusioniertes Raf-BXB transient in HEK 293 Zellen exprimiert, aus den Zellextrakten durch Immunpräzipitation isoliert und gewaschen. Danach wurden die Kinasen mit gereinigtem, rekombinantem Kinase inaktiven His-MEK1 bzw. GST-SEK1 in Anwesenheit von [γ - 32 P] ATP inkubiert. Raf-BXB diente als Kontrolle, da bereits bekannt war, dass es MEK1, aber nicht SEK1 direkt phosphorylieren kann (Yan et al. 1994). Wild Typ MLK3, aber nicht Kinase inaktive MLK3 phosphoryliert sowohl His-MEK1 als auch GST-SEK1 *in vitro*. Immunpräzipitierte MLK3 ist dabei im Gegensatz zu Raf-BXB stark phosphoryliert und in dem MLK3 Präzipitat befindet sich zusätzlich noch ein unbekanntes und ebenfalls phosphoryliertes 50-55 kDa Protein (Abb. 4.5).

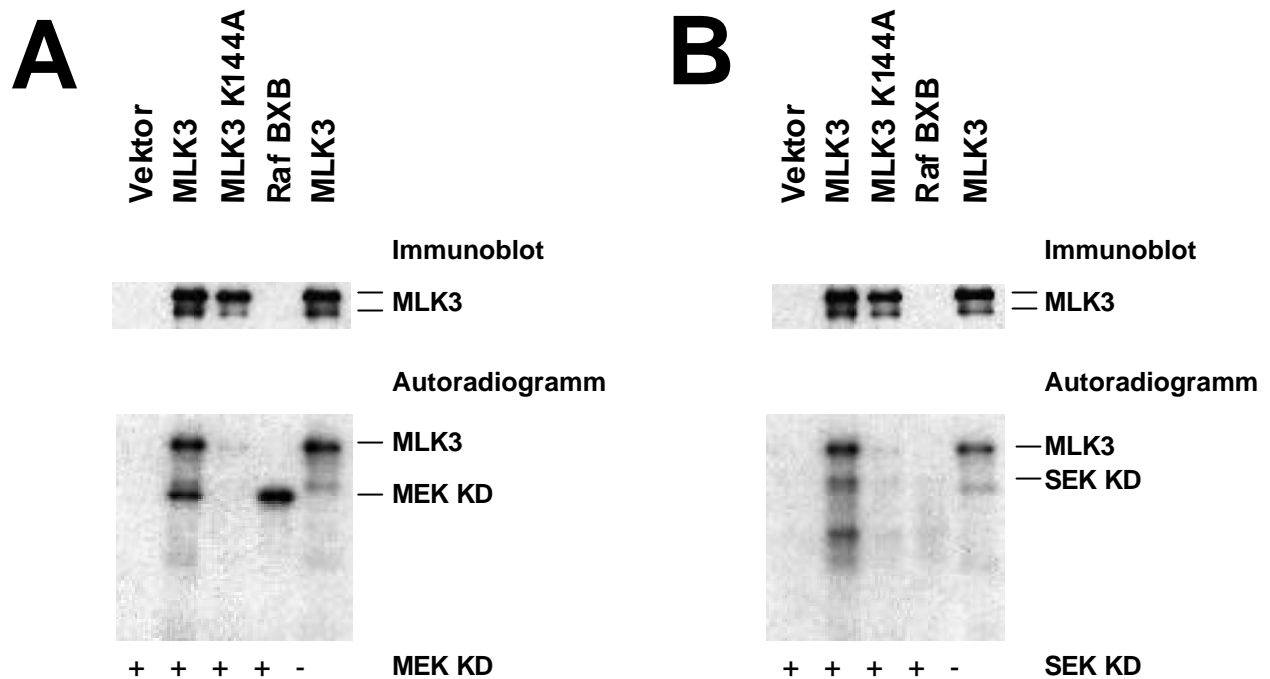


Abb. 4.5: Direkte MEK1 und SEK1 Phosphorylierung durch MLK3 *in vitro*.

HEK 293 Zellen wurden mit je 5 μg pCMV5, pCMV5-Flag-MLK3, pCMV5-Flag-MLK3 K144A und pCDNA3-HA-Raf-BXB transfiziert, nach 48 h geerntet und immunpräzipitiert. Für die Flag Epitop markierten Proteine wurde der monoklonale M2 Antikörper und für HA-Raf-BXB wurde der monoklonale HA Antikörper 12CA5 verwendet. Die immobilisierten Kinasen wurden zweimal mit NP40 Lysispuffer gewaschen und anschließend noch zweimal mit Kinase Puffer. Um die Autophosphorylierung zu reduzieren, wurden die Immunpräzipitate mit 100 μM ATP enthaltenden Kinase Puffer 15 min bei RT vorinkubiert. 1 μg bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes His-MEK1 K97M oder GST-SEK1 K167R wurden anschließend als Substrat zusammen mit den immobilisierten Proteinen in der Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ für 20 min bei RT inkubiert. Expression der MLK3 Konstrukte wurde mittels Immunoblot kontrolliert.

4.1.6. MLK3 ist ein schwacher MEK-, aber ein starker SEK-Aktivator

Um zu zeigen, dass die oben gezeigten Phosphorylierungen der jeweiligen MAPK Kinasen auch zu ihrer Aktivierung *in vitro* führen, wurde ein gekoppelter Kinasetest durchgeführt. Hierbei wurden GST-MEK1 wt und Kinase inaktives His-ERK1 K52R als Substrate angeboten. Wie in Abb. 4.6A zu sehen, führt nur Raf-BXB-vermittelte MEK Phosphorylierung zu einer deutlichen Phosphorylierung von His-ERK1. Obwohl sowohl MLK3 als auch Raf-BXB MEK1 phosphorylieren, ist die Aktivierung von MEK, gemessen an der Phosphorylierung des für MEK angebotenen Substrats His-ERK1 K52R sehr viel niedriger im Fall von MLK3 als Raf-BXB.

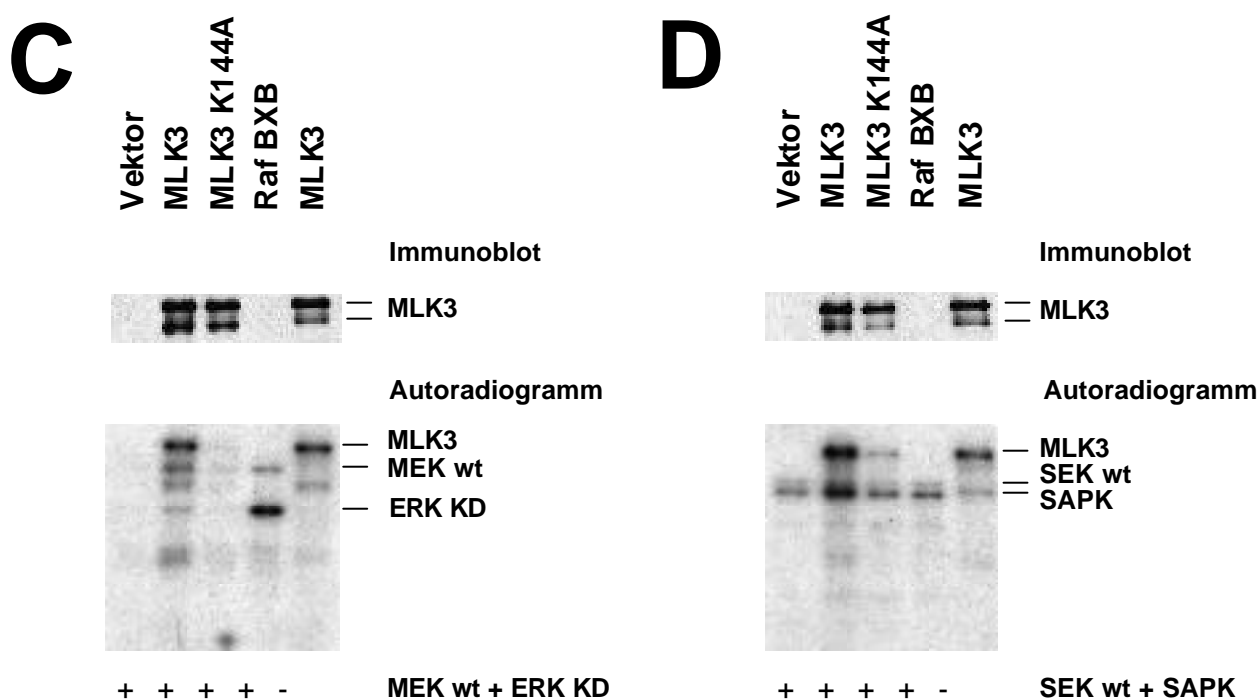


Abb. 4.6: MLK3 aktiviert MEK1 im Gegensatz zu SEK1 nur schwach.

Dieses Experiment wurde genau wie unter 4.1.5 beschrieben durchgeführt. Als Substrate wurden in A) Wild Typ GST-MEK1 zusammen mit Kinase inaktivem His-ERK1 K52R und in B) Wild Typ GST-SEK1 zusammen mit Wild Typ SAPK α angeboten. Die Expression von MLK3 Konstrukten wurde im Immunoblot überprüft.

Im gekoppelten Versuch mit SEK1 und JNK/SAPK führte die MLK3-induzierte Phosphorylierung hingegen zu einer Aktivierung von SEK1, da GST-SEK1 wt nur in diesem Fall rekombinantes SAPK α wt verglichen mit der Vektorkontrolle deutlich stärker phosphoryliert (Abb. 4.6B).

4.1.7. Enge Korrelation zwischen MLK3 vermittelter MEK1 Substratphosphorylierung *in vitro* und MEK1/2 Phosphorylierung auf Ser 217/221

Auch für die MAPKK Kinase MEKK1 ist beschrieben worden, dass sie MEK *in vitro* phosphoryliert, ohne es merklich zu aktivieren, obwohl es die gleichen Phosphorylierungsstellen auf MEK benutzt (Xu et al. 1995) wie Raf (Alessi et al. 1994). Daher wurde das unter 4.1.5 beschriebene Experiment wiederholt und die MEK1 Phosphorylierung wurde auf dem gleichen Blot mit einem Phospho-spezifischen MEK1/2 Ser 217/221 Antikörper verglichen. Dieser erkennt nach Herstellerangaben ausschließlich Ser 217/221 und Ser 217 phosphoryliertes, doch nur schwach Ser 221 phosphoryliertes MEK1/2. Als zusätzliche Kontrolle wurde außerdem noch aktivierte PAK1 T423E verwendet, für welche beschrieben worden ist, dass sie Ser 298 außerhalb der Aktivierungsschleife auf MEK1 phosphoryliert (Frost et al. 1997), und daher diese Phosphorylierungsstelle von dem Phospho-spezifischen MEK1/2 Antikörper nicht erkannt werden sollte. Während immunpräzipitiertes PAK T423E MEK1 nur sehr schwach phosphoryliert und diese Phosphorylierung wie erwartet nicht von dem Phospho-spezifischen MEK Antikörper erkannt wird, führt die von MLK3 und Raf vermittelte MEK1 Phosphorylierung zu einer vergleichbar starken Erkennung durch den Phospho-MEK1/2 Antikörper. Diese Beobachtung legt nahe, dass MLK3, ebenso wie für Raf und MEKK1 gezeigt, ausschließlich die MEK1/2 Serine 217/221 phosphoryliert.

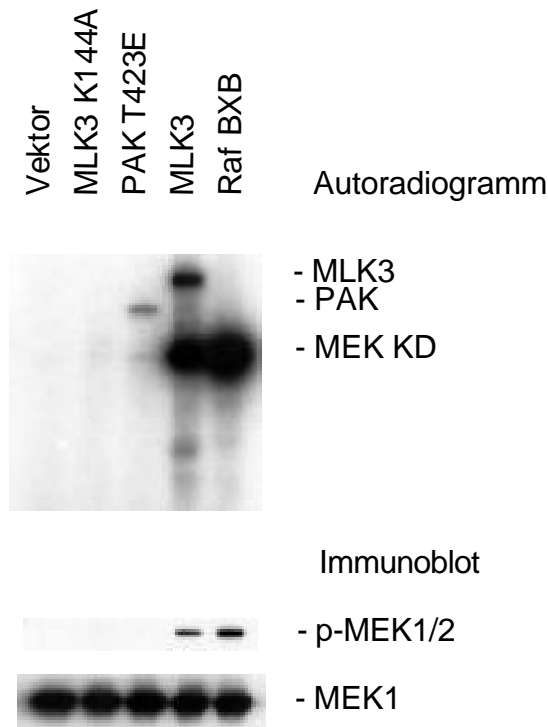


Abb. 4.7: MLK3-vermittelte MEK1 Phosphorylierung *in vitro* korreliert mit der Intensität der Ser 217/221 Phosphorylierung. HEK 293 Zellen wurden wie beschrieben mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert, geerntet und immunopräzipitiert. pCMV6-Myc-PAK T423E wurde dabei mit dem monoklonalen Myc 9E10 Antikörper immunopräzipitiert. Direkt nach den Waschschrritten wurde 1 μ g Kinase inaktives His-MEK1 K97M (KD) im Kinase Assay als Substrat bei RT für 20 min verwendet. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm, den Phospho-MEK1/2 Blot, so wie die Immunoblotkontrolle des Substrats MEK1. Alle Analysen wurden auf dem gleichen Blot durchgeführt.

4.1.8. MLK3 phosphoryliert MEK1/2 *in vivo*

Nachdem MEK1 von MLK3 *in vitro* stark phosphoryliert wird, ohne merklich aktiviert zu werden, stellte sich jetzt die Frage, ob MLK3 MEK1/2 auch *in vivo* phosphoryliert. Aus diesem Grund wurden HeLa Zellen mit MLK3 und Raf-BXB Expressionsplasmiden transfiziert und mit [32 P]-ortho-Phosphat *in vivo* markiert. Immunpräzipitiertes MEK1 zeigt vor allem in MLK3 transfizierten Zellen einen verstärkten Phosphateinbau im Vergleich zur Vektorkontrolle, während in Raf-BXB transfizierten und Arsenit stimulierten Zellen Phosphateinbau in MEK1 nur schwach gegenüber der Vektorkontrolle erhöht ist (Abb. 4.8A). Phosphateinbau in MEK1 korreliert wie *in vitro* mit dem Phospho MEK1/2 Antikörpersignal und ist im Fall von MLK3 transfizierten Zellen am stärksten (Abb. 4.8A). Die Effekte der transfizierten Kinasen auf MEK2 Phosphorylierung sind verglichen mit MEK1 geringer, was wahrscheinlich daran liegt, dass MEK2 basal stärker als MEK1 phosphoryliert ist. Arsenit

diente für MEK2 als Positivkontrolle, da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Arsenit Stimulation zu einer starken MEK2 Phosphorylierung in HeLa Zellen führt (siehe Abb. 4.12). Verglichen mit der Arsenit-induzierten MEK2 Phosphorylierung ist der von MLK3-vermittelte Phosphateinbau in MEK2 etwa vergleichbar stark. Aus diesen Daten folgt, dass MLK3 MEK1/2 ebenso wie Raf *in vivo* phosphoryliert.

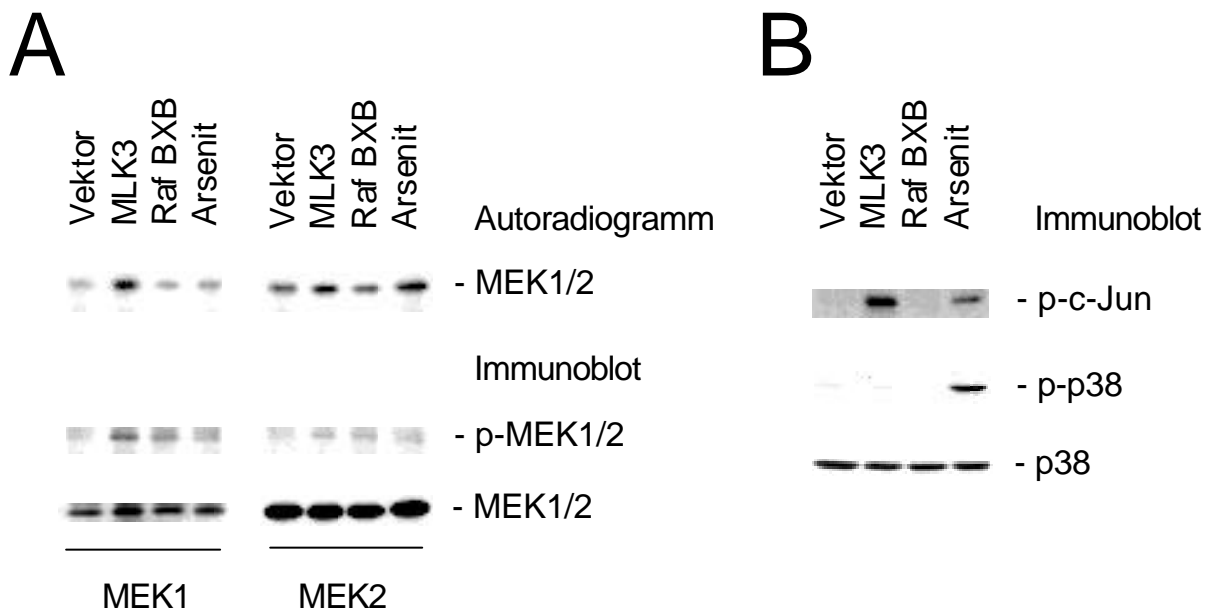


Abb. 4.8: MLK3 induziert MEK1/2 Phosphorylierung *in vivo*.

HeLa Zellen wurden mit 800ng pCMV5, pCMV5 MLK3 oder RSV Raf-BXB transfiziert (Transfektionseffizienz: 70-80%). Zellen wurden 6 h vor der Lyse in Serum freien Medium gehungert und 2 h vorher mit 0,5 mCi [³²P]-ortho-Phosphat/Ansatz *in vivo* markiert. Arsenit Stimulation wurde 45 min bei einer Endkonzentration von 0,5 μ M durchgeführt. Im Anschluß an die Zellyse wurden aus den Zellysaten endogenes MEK1 und MEK2 mit spezifischen Antikörpern, die an ProteinA-Agarosebeads gebunden waren, immunpräzipitiert. Die Abbildung A) zeigt das Autoradiogramm, den Phospho MEK1/2 und die MEK 1 und 2 Immunoblots.

In Abbildung 4.8B) wurden HeLa Zellen wie in Abb 4.8A) transfiziert, 6 h gehungert, mit 0,5 μ M Arsenit 45 min stimuliert und lysiert. Die Abbildung zeigt den Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho c-Jun, Phospho p38 und p38 als Ladekontrolle.

In Abbildung 4.8B ist die unterschiedliche Fähigkeit von MLK3, Raf-BXB und Arsenit, Stress aktivierte MAP Kinase Signalwege in HeLa Zellen zu aktivieren dargestellt. Während Arsenit sowohl den p38, als auch den JNK/SAPK Signalweg aktiviert, führt MLK3 Überexpression nur zu einer JNK/SAPK-, aber nicht zu einer p38-Aktivierung. Die Fähigkeit JNK/SAPK zu aktivieren wurde in diesem Experiment durch Verwendung eines Phospho c-Jun spezifischen Antikörpers gezeigt. Raf-BXB hingegen hat in diesem Zellsystem wie erwartet keinerlei Effekt auf die beiden Stress aktivierten Proteinkinasekaskaden.

4.1.9. Modulation von MLK3-vermittelter ERK Aktivierung durch MEK1 Mutanten

Um die Fähigkeit von MLK3, im Zusammenhang mit MEKs die ERK MAP Kinase Kaskade zu aktivieren, näher zu charakterisieren, wurden zwei verschiedene MEK1 Punktmutanten eingesetzt und ihr Effekt auf MLK3- und Raf-BXB-vermittelte ERK Aktivierung verglichen. Raf aktiviert MEK1 durch Phosphorylierung von Serin 217 und Serin 221 in der katalytischen Domäne (Alessi et al. 1994; Zheng and Guan 1994). MEK1 Punktmutanten, bei denen Serin 217 oder Serin 221 durch ein Alanin ersetzt wurden (LIDAMANS, LIDSMANA), inhibieren ERK Aktivierung *in vivo*, während die MAPK Kinase nach Austausch beider Serine durch Glutaminsäure (LIDEMANE) ERK konstitutiv aktiviert (Alessi et al. 1994). In Abb. 4.9A) ist die Fähigkeit von MLK3 mit Raf-BXB verglichen, nach Koexpression der verschiedenen MEK1 Effektorpunktmutanten ERK *in vivo* zu phosphorylieren. Während MLK3 im Vergleich zu Raf-BXB in den Vektor kotransfizierten Zellen nur ein sehr schwacher ERK Aktivator ist, führt Koexpression von Wild Typ MEK1 zu einem starken Anstieg der MLK3-vermittelten ERK Aktivität (siehe auch Abb. 4.3B). Expression der konstitutiv aktiven MEK LIDEMANE Mutante führt zu einer starken ERK Phosphorylierung, die weder durch Koexpression von Raf-BXB noch durch MLK3 moduliert werden kann, was zusätzliche MLK3-vermittelte negative regulatorische Phosphorylierungsstellen auf MEK1 ausschließt. Die Mutante LIDA hingegen kann durch MLK3 noch schwach und überraschenderweise durch Raf-BXB stark aktiviert werden. Diese Daten legen nahe, dass beide MAPKKs sowohl Serin 217 als auch Serin 221 phosphorylieren, und sich lediglich im Ausmaß der Phosphorylierung Unterschiede zeigen (Abb. 4.9A).

In Abbild 4.9B) wurden aus den HEK 293 Zellsaten des gleichen Experiments (siehe Abb. 4.9A) die His-fusionierten MEK1 Konstrukte immunpräzipitiert und anschließend ein *in vitro* Kinase Assay mit Wild Typ ERK2 als Substrat durchgeführt. Die dargestellten Resultate spiegeln dabei das Ergebnis der ERK Phosphorylierung *in vivo* (Abb. 4.9A) wider. Wild Typ MEK1 läßt sich durch Koexpression mit MLK3 und Raf-BXB stark aktivieren. Dieser Effekt tritt in einem geringeren Ausmaß auch bei der MEK1 LIDAMANS auf, während das immunpräzipitierte MEK LIDEMANE bereits voll aktiviert ist und sich in seiner Aktivität wie *in vivo* auch in diesem *in vitro* Versuch durch die Koexpression der aktivierenden MAPKKs nicht mehr modulieren läßt. Zusätzlich wurde mit dem Phospho MEK1/2 Antikörper der Phosphorylierungsstatus der immunpräzipitierten MEK1 Proteine überprüft. Hierbei zeigte sich, dass Wild Typ MEK1 kotransfiziert mit MLK3 oder Raf-BXB stark phosphoryliert ist, während die dominant negative Punktmutante MEK1 LIDAMANS,

kotransfiziert mit diesen beiden Kinasen, sehr viel schwächer phosphoryliert ist. Diese Daten legen nahe, dass beide untersuchten MAPKK Kinasen MEK1 dual phosphorylieren, aber zusätzlich auch in der Lage sind, MEK LIDA an Serin 221 alleine zu phosphorylieren und dessen Aktivität weiter zu steigern. Die aktivierte MEK1 Punktmutante LIDEMANE hingegen reagiert nicht mit diesem Antikörper, da beide Serine hier gegen Glutaminsäure ausgetauscht wurden. Diese Analysen zeigen, dass, obwohl MLK3 ein schwächerer MEK Aktivator ist, es die gleichen regulatorischen Phosphorylierungsstellen benutzt wie Raf. Weiterhin ist immer dann eine starke MLK3-vermittelte ERK Aktivierung *in vivo* zu beobachten, wenn 'downstream' Komponenten der ERK Kaskade, das heißt entweder Wild Typ MEK oder ERK (siehe Abb. 4.2), zusätzlich kotransfiziert und damit überexprimiert werden. Schließlich ist noch zu bemerken, dass in allen Analysen die Expression der Punktmutante LIDA um den Faktor 2-5 schwächer, als die der beiden anderen MEK Konstrukte war, was sich wahrscheinlich mit dem negativen Einfluß dieser Punktmutante auf die ERK Transduktionskaskade und damit auch auf das Zellwachstum zurückführen läßt (Kolch et al. 1991; Cowley et al. 1994).

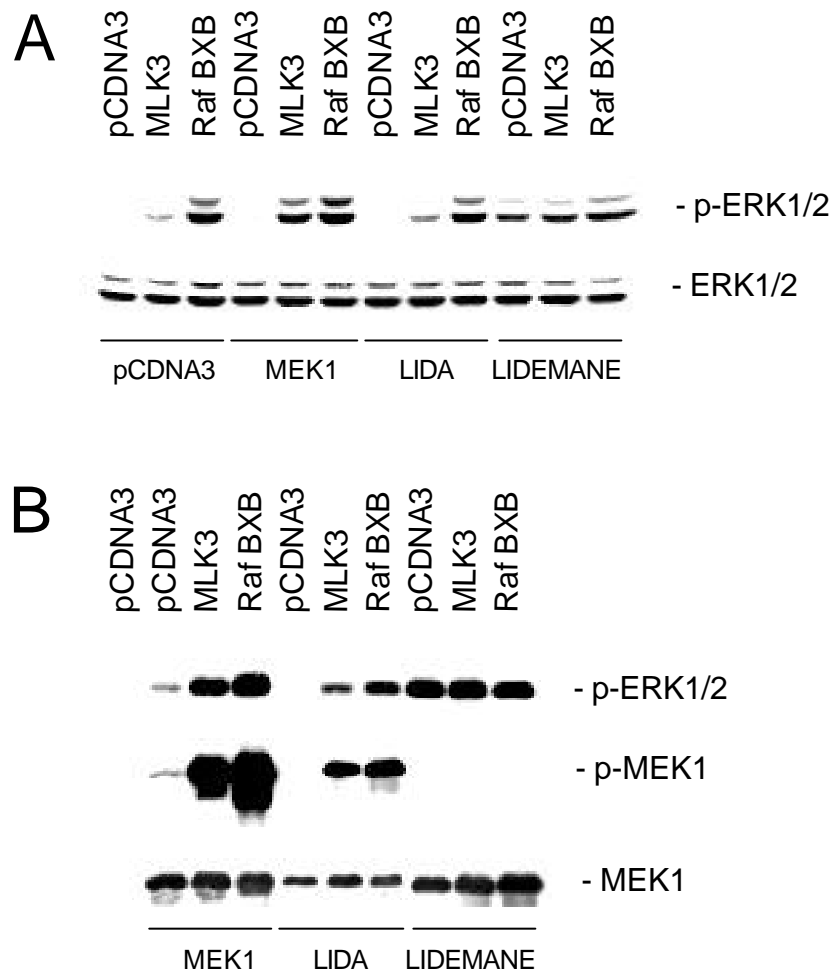


Abb. 4.9.: Modulation der MLK3-vermittelten ERK Aktivierung durch MEK1 Punktmutanten.

HEK 293 Zellen wurden mit je 300 ng pCDNA3, pCDNA3 Wild Typ His-MEK1, pCDNA3 His-MEK1 LIDA oder pCDNA3 His-MEK1 LIDEMANE und je 700 ng pCDNA3, pCMV5 MLK3 oder pCDNA3 Raf-BXB kotransfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet, wobei diese die letzten 24 h vor der Lyse mit 0,1% Serum gehungert wurden. Direkt nach dem Ernten wurde ein Teil des Lysats sofort mit Lämmli Puffer aufgekocht und weiter analysiert (siehe Abb. 4.9A). Mit dem anderen Teil des Lysats wurde mit Hilfe von Nickel-Agarose die His-fusionierten MEK1 Konstrukte immunpräzipitiert, gewaschen und ein *in vitro* Kinase Assay mit je 1 µg Wild Typ ERK2 20 min bei RT durchgeführt (siehe Abb. 4.9B). Dargestellt sind in Abb. 4.9A) die Phospho ERK1/2 und ERK detektierenden Immunoblots, sowie in Abb. 4.9B) die Phospho MEK1/2, Phospho ERK1/2 und MEK1 Immunoblots nach der Immunpräzipitation.

4.1.10. MLK3 blockiert die Assoziation von MEK mit ERK

In einem zusätzlichen Versuchsansatz, die MLK3 vermittelte MEK Phosphorylierung qualitativ zu untersuchen, wurde MEK zuerst *in vitro* von C-Raf und MLK3 phosphoryliert, dann immunpräzipitiert und in einem zweiten Kinase Assay mit ERK als Substrat die Aktivität der MEK gemessen. Dieser Ansatz wurde gewählt, um auszuschließen, dass das MLK3 Präzipitat die Signalweiterleitung von aktiviertem MEK zu ERK unterbindet. Als Kontrolle wurde der gekoppelte Versuch mit GST-MEK1 wt und ERK2 wt als Substrat mitaufgetragen (siehe Abb. 4.10A). Während GST-MEK1 durch MLK3 und Raf-BXB etwa gleich stark phosphoryliert wird, führt im Falle von MLK3-vermittelter MEK1 Phosphorylierung diese im Gegensatz zu Raf-BXB, wie unter Abb 4.6 bereits gezeigt, nicht zu einer vergleichbaren ERK2 Phosphorylierung. Wenn allerdings der Versuch in zwei Schritten (erst MEK Phosphorylierung, dann IP, dann ERK Phosphorylierung) durchgeführt wurde, resultierte dies unter drei verschiedenen Immunpräzipitationsbedingungen (phospho-MEK Antikörper, Glutathion Sepharose oder MEK1 Antikörper) auch im Fall von MLK3 zu einer maximalen ERK2 Phosphorylierung. Dieser Versuch belegt deutlich, dass MLK3 ebenso wie Raf MEK phosphoryliert und auch aktiviert. Es stellte sich aber jetzt die Frage, warum die Signalweiterleitung im gekoppelten Versuch vom aktiven MEK zu ERK in Anwesenheit von MLK3 gestört ist. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die ERK2 Substratbindung von MLK3-aktiviertem MEK1 unterbunden ist. Zu diesem Zweck wurde nach Durchführung des gekoppelten Kinase Assay GST-MEK1 mit Hilfe von Glutathion Sepharose immunpräzipitiert, gewaschen und auf denaturierenden Proteingelen analysiert. Wie in Abb. 4.10B dargestellt, ist die Substratanheftung von ERK2 an MEK1 im MLK3 Präzipitat blockiert. MLK3 vermittelt daher MEK Aktivierung aber verhindert gleichzeitig die Signalweiterleitung von aktiviertem MEK zu ERK durch Blockierung der MEK-ERK Interaktion.

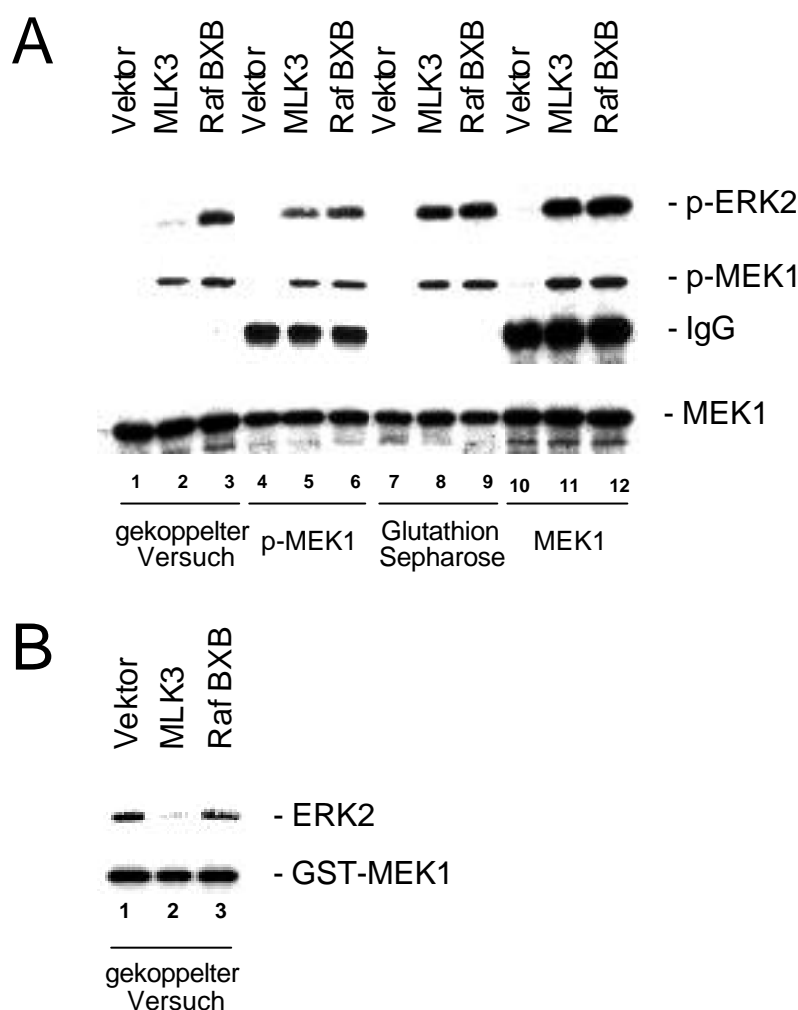


Abb. 4.10: MLK3 blockiert Interaktion und Signalweiterleitung von aktiviertem MEK zu ERK.

HEK 293 Zellen wurden mit dem Vektor, pCMV5-Flag-MLK3 und pCDNA3-HA-Raf-BXB transfiziert, nach 48 h lysiert und MLK3 und Raf-BXB mit M2 bzw. HA Antikörpern immunpräzipitiert und gewaschen. Je 1 µg GST-MEK1 wt und ERK2 wt wurden im gekoppelten Versuch zusammen als Substrat angeboten (Laufspur 1-3). Im anderen Telexperiment (Laufspur 4-12) wurde zuerst je 1 µg GST-MEK1 wt als Substrat angeboten, mit phospho MEK1/2, MEK1 Antikörpern oder Glutathion Sepharose immunpräzipitiert und anschließend in einem zweiten *in vitro* Kinase Versuch je 1 µg ERK2 wt als Substrat angeboten. Kinase Assays wurden 25 min bei RT durchgeführt. Dargestellt sind die phospho MEK1/2, phospho ERK1/2 und MEK1 detektierenden Immunoblots (Abb. 4.10A). In Abb. 4.10B wurde GST-MEK1 wt nach Durchführung des gekoppelten Versuchs (Laufspur 1-3) mit Glutathion Sepharose immunpräzipitiert und gewaschen. Dargestellt sind hier die MEK1 und ERK2 detektierenden Immunoblots.

4.1.11. MLK3-phosphoryliertes endogenes MEK1/2 ist inaktiv

Es stellte sich hierauf die Frage, ob MLK3 aktiviertes endogenes MEK1/2 aus HEK 293 Zellen in einem *in vitro* Kinase Versuch nach Immunpräzipitation ERK2 phosphorylieren kann, wie das unter 4.1.9 schon für überexprimiertes Wild Typ MEK1 gezeigt wurde. In Laufspur 1 + 2 der Abb. 4.11 ist ein Aliquot des Lysats aufgetragen um die unterschiedlichen Fähigkeiten der beiden transfizierten MAPKKs ERK *in vivo* zu aktivieren unter diesen Versuchsbedingungen zu dokumentieren. Weiterhin ist dann aber deutlich zu beobachten,

dass obwohl MLK3 in 293 Zellen MEK1/2 *in vivo* wie Raf-BXB phosphoryliert, kommt es im Fall von MLK3 induzierter MEK1/2 Phosphorylierung nach Immunpräzipitation der MEK Kinasen und anschließendem Kinase Assay mit ERK2 als Substrat nicht zu einer Phosphorylierung der MAPK. Als Kontrolle führt Raf-induzierte MEK1/2 Phosphorylierung nach deren Immunpräzipitation zur Phosphorylierung von ERK2. Nachdem bereits gezeigt wurde, dass überexprimiertes durch MLK3 aktiviertes MEK1 im anschließenden Kinase Assay unter den gleichen Bedingungen aktiv ist (Abb. 4.9), und zusätzlich unter Abb. 4.10 gezeigt werden konnte, dass MLK3 phosphoryliertes GST-MEK1 *in vitro* aktiv ist, legen diese Daten den Schluß nahe, dass im Fall der MLK3-vermittelten MEK Phosphorylierung endogenes MEK1/2 in einem Proteinkomplex vorliegt, der auch nach der Immunpräzipitation das Phosphorylieren des Substrats verhindert.

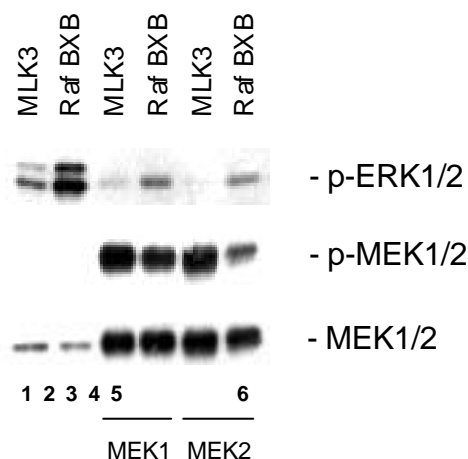


Abb. 4.11: MLK3-vermittelte MEK1/2 Phosphorylierung führt zu einem inaktiven MEK Komplex.

HEK 293 Zellen wurden mit je 1 µg pCMV5-Flag-MLK3 und pCDNA3-HA-Raf-BXB transfiziert und nach 48 h lysiert. Vor der Immunpräzipitation wurde ein Aliquot des Lysats aufgekocht und weiter analysiert (Laufspur 1 und 2). Anschließend wurde endogenes MEK1 und 2 immunpräzipitiert, gewaschen und ein *in vitro* Kinase Assay mit ERK2 als Substrat durchgeführt. Dieser wurde 25 min bei RT durchgeführt. In der Abbildung sind die phospho MEK1/2 und phospho ERK1/2 detektierenden Immunblots dargestellt. Für die Kontrolle der MEK1/2 Expression im Zellysat (Laufspur 1 und 2) und nach der Immunpräzipitation (Laufspur 3 bis 6) wurde ein Antikörpermix aus MEK1 und 2 verwendet.

4.1.12. IL1 β und andere JNK/SAPK Aktivatoren entkoppeln MEK Phosphorylierung von ERK Aktivierung *in vivo*

Um einen Hinweis zu erhalten, ob die von ERK Aktivierung entkoppelte MLK3-vermittelte MEK Phosphorylierung einen physiologischen Bezug in Zellen hat, wurden subkonfluente HeLa Zellen mit den unterschiedlichen Faktoren stimuliert und auf denaturierenden Proteingelen mit den phospho MEK1/2 und phospho ERK1/2 Antikörpern analysiert. Mitogene Stimuli wie Serum, TPA und TPA/Ionomycin führen, wie nicht anders erwartet, zu einer starken Aktivierung der MEK-ERK Signaltransduktionskaskade (Abb. 4.12). Zytokine wie IL1 β und TNF α hingegen haben nur ein sehr geringes Potential ERK zu aktivieren. Überraschenderweise ist jedoch in HeLa Zellysaten, die mit diesen beiden Zytokinen stimuliert wurden, eine MEK2 Phosphorylierung nach 45 min zu beobachten, die von der ERK Aktivierung entkoppelt ist. Der Effekt bei TNF α ist hierbei im Vergleich zu IL1 β wesentlich schwächer, doch auch hier kommt es zu einer Akkumulation von phosphoryliertem MEK2 nach 45 min. Als zusätzliche Stimuli wurden noch Anisomycin, Sorbitol und Arsenit eingesetzt. Während bei Anisomycin und Arsenit Behandlung ERK Aktivierung zumindest teilweise von der wieder auftretenden starken MEK2 Phosphorylierung entkoppelt ist, scheint diese Entkoppelung in Sorbitol behandelten HeLa Zellen nicht so stark aufzutreten, obwohl auch hier die MEK2 Phosphorylierung nach 45 min akkumuliert. Diese Daten zeigen, dass es unter physiologischen Bedingungen zu einer MEK Phosphorylierung kommt, die von ERK Aktivierung entkoppelt ist. Allerdings ist dieser Effekt in HeLa Zellen unter den gewählten Bedingungen nur für MEK2 und nicht bei MEK1 zu beobachten.

Zusätzlich wurde in den stimulierten Lysaten auch endogenes MLK3 analysiert. Hehner et al. konnten kürzlich zeigen, dass endogenes MLK3 in Jurkat T-Zellen nach Rezeptorkostimulation in denaturierenden Proteingelen "geshiftet" vorliegt, dass heißt, es wandert mit einer geringeren Geschwindigkeit. Es konnte zusätzlich demonstriert werden, dass dieses veränderte Laufverhalten aufgrund von Serin/Threonin Phosphorylierung zustande kommt, denn nach Inkubation dieses Proteinextrakts mit Serin/Threonin spezifischer λ Phosphatase ist der "Mobilitätsshift" abgeschafft (Hehner et al. 2000). Dieser Shift der Kinase wurde von den Autoren mit der Aktivierung der Kinase korreliert. Anders als in Jurkat T-Zellen führt in HeLa Zellen Stimulation mit Mitogenen, wie auch mit allen ausgewählten Stressestimuli zu einem "Mobilitätsshift" der endogenen Kinase.

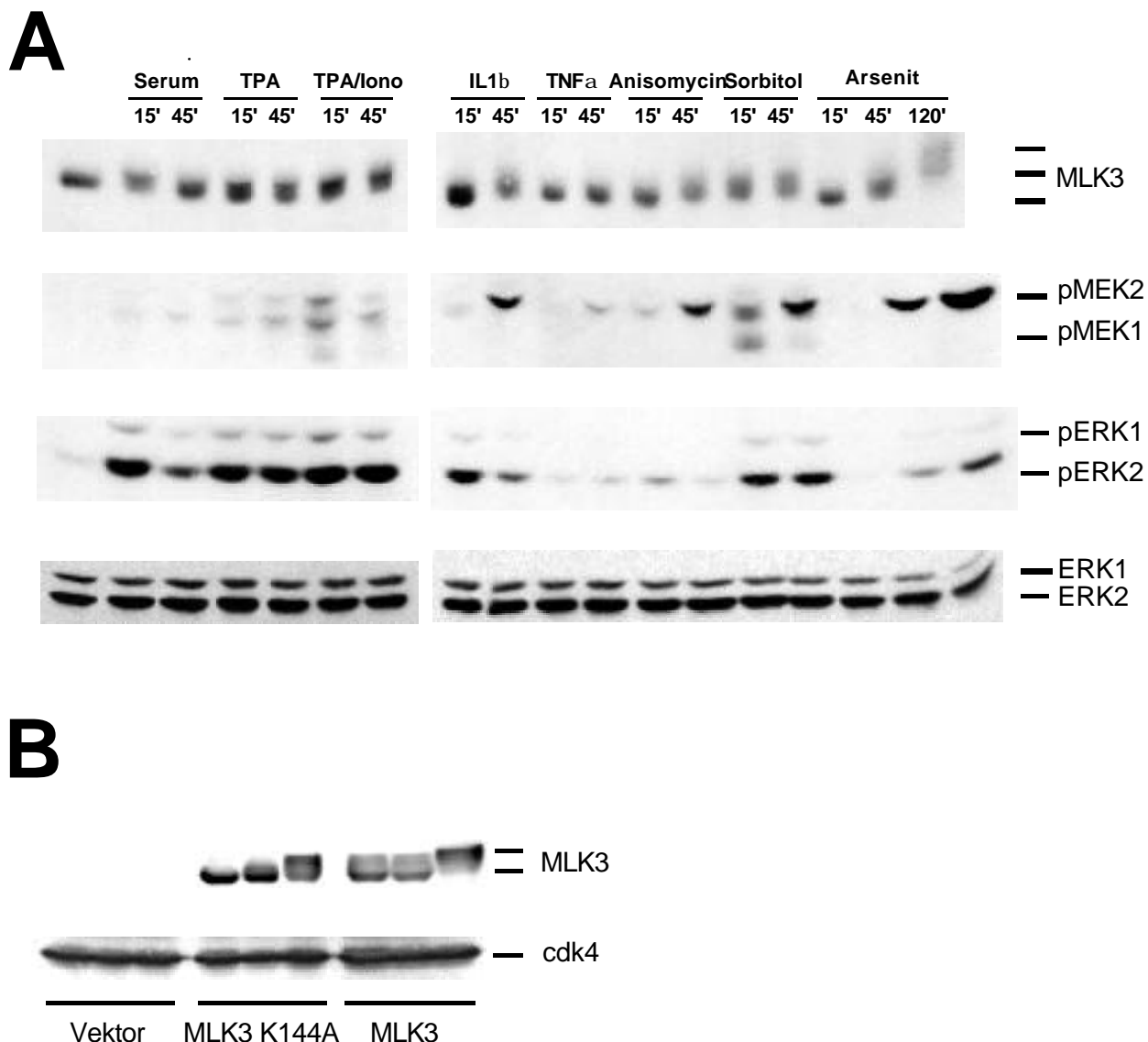


Abb. 4.12: Stress Stimuli entkoppeln MEK Aktivierung von ERK Aktivierung *in vivo*.

A) HeLa Zellen wurden subkonfluent 36 h mit 0,05% Serum gehungert und anschließend stimuliert. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die Endkonzentrationen: 10% Serum, 100 ng/ml TPA, 5 μ M Ionomycin, 10 ng/ml IL1 β , 20 ng/ml TNF α , 10 μ g/ml Anisomycin, 450 mM Sorbitol und 0,5 μ M Arsenit. Anschließend wurden die Zellen lysiert und auf denaturierenden Proteingelen weiter analysiert. Dargestellt sind in Abb. 4.12 der MLK3, phospho MEK1/2, phospho ERK1/2 und der ERK1/2 detektierende Immunoblot.

B) HeLa Zellen wurden mit je 1 μ g KRSPA, RSV MLK3 K144A oder RSV MLK3 transfiziert und 36 h später lysiert. Zellen wurden 24 h vor dem Ernten mit 0,05% Serum gehungert. Stimulationen mit TPA (100 ng/ml)/ 5 μ M Ionomycin oder mit 0,5 μ M Arsenit wurden für die angegebenen Zeiten durchgeführt. Dargestellt ist der Flag Immunoblot gegen exogenes MLK3 und der cdk4 Blot als Ladekontrolle.

Überexpression von Wild Typ MLK3 *per se* führt wie gezeigt zu einer Aktivierung der Kinase. Wenn der “Mobilitätsshift” für MLK3 Aktivierung nötig ist, sollte überexprimiertes MLK3 bereits geshiftet vorliegen und Kinase inaktives MLK3 dementsprechend nicht. Um dies zu überprüfen, wurden HeLa Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und direkt vor der Zellyse mit TPA/Ionomycin oder mit Arsenit stimuliert. Diese Stimulatoren wurden ausgewählt, da sie in HeLa Zellen wie oben gezeigt einen “Shift” des endogenen Proteins induzieren. Aus dem Experiment geht eindeutig hervor, dass Wild Typ MLK3 teilweise bereits in einer ‘geshifteten’ Form vorliegt, während dies für die Kinase inaktive MLK3 K144A nicht der Fall ist. Stimuliert man die Zellen mit TPA/Ionomycin oder Arsenit “shiftet” Kinase inaktive MLK3 ähnlich wie endogenes Protein, während nur Arsenit Stimulation im Fall von überexprimiertem MLK3 den “Shift” noch verstärken kann.

4.1.13. MLK3 Aktivierung durch die Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 führt zu einer JNK/SAPK Aktivierung und einer von ERK entkoppelten MEK Phosphorylierung

Sämtliche MLK Kinasen haben eine CRIB (Cdc42/Rac interactive binding sequence) Domäne, die für Bindung an aktiviertes Cdc42 oder Rac benötigt wird (Burbelo et al. 1995). Böck et al. konnten kürzlich zeigen, dass Koexpression von aktiviertem Cdc42 und MLK3 die Kinase Aktivität von MLK3 verstärkt (Bock et al. 2000) und zusätzlich führt Koexpression beider Proteine zu einer synergistischen JNK/SAPK Aktivierung (Teramoto et al. 1996). Diese Beobachtung sollte in HeLa Zellen überprüft werden, um dann den Effekt auf JNK/SAPK Aktivierung auf den Status der Phosphorylierung von MEK und ERK zu untersuchen. Da für aktiviertes Rac1 und Cdc42, sowie für MLK3 eine Aktivierung des JNK/SAPK Signalweges nach Überexpression bekannt war, mußten die Proteine so austitriert werden, dass die Menge des Proteins nicht ausreichend für JNK/SAPK Aktivierung war. Als Kontrolle wurden zusätzlich aktiviertes Ras und RhoA verwendet, für die kein direkter Effekt auf MLK3 Aktivierung beschrieben wurde. In Abbildung 4.13 ist deutlich zu erkennen, dass aktiviertes Rac1 und Cdc42 in Kombination mit MLK3 einen starken synergistischen Effekt auf ein zelluläres Substrat von JNK/SAPK haben. Diese starke Induktion der c-Jun Phosphorylierung ist dabei wie zu erwarten nicht mit der Kombination von RhoA L61 oder Ras V12 mit MLK3 zu erreichen, obwohl eine leichte Induktion bei einer Koexpression von RhoA und MLK3 zu erkennen ist. Bei einer Koexpression der aktivierten GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA mit MLK3 ist kein zusätzlicher Synergismus auf c-Jun Phosphorylierung zu

beobachten, was nahelegt, dass MLK3 Aktivierung direkt für die Rac/Cdc42 vermittelte Aktivierung des JNK/SAPK Signalwegs verantwortlich ist. Kürzlich konnte für G-Proteine der Rho Familie von GTPasen gezeigt werden, dass sie den ERK Signalweg aktivieren (Frost et al. 1997). Im Gegensatz zu diesen Analysen zeigen die hier gewonnenen Daten, dass unter den gewählten Bedingungen keine Aktivierung von endogenem ERK1/2 zu beobachten ist. Unter den gleichen Bedingungen die einen synergistischen Effekt auf die JNK/SAPK Aktivierung haben, kommt es jedoch zu einer MEK1/2 Phosphorylierung, die von ERK Aktivierung entkoppelt ist. Diese Daten zeigen, dass entkoppelte MEK Aktivierung *in vivo* durch Cdc42 und Rac1 vermittelte MLK3 Aktivierung auftritt.



Abb.4.13: Die Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 aktivieren MLK3 und induzieren dadurch synergistische Effekte in c-Jun Phosphorylierung und entkoppelter MEK1/2 Phosphorylierung.

HeLa Zellen wurden mit je 300 ng pRK5 Rac1 L61, pRK5 Cdc42 L61, pRK5 RhoA L63, pT22 Ras V12 oder pRK5 transfiziert, wobei die DNA Menge auf 700 ng mit dem Leervektor aufgefüllt wurde. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen noch mit 100 ng pCMV5 MLK3 oder einer entsprechenden Menge an Vektor DNA kotransfiziert. Die Zellen wurden 12 h vor der Lyse mit 0,05% Serum gehungert und nach 24 h lysiert. In der Abbildung 4.13 sind die phospho MEK1/2, phospho ERK1/2, ERK1/2 und phospho c-Jun detektierenden Immunoblots dargestellt.

4.2. Überexpression von Wild Typ MLK3 transformiert NIH 3T3 Fibroblasten

4.2.1. NIH 3T3 Fibroblasten, die MLK3 überexprimieren, sind morphologisch transformiert und bilden Kolonien in Soft Agar

Um das transformierende Potential von MLK3 zu testen, wurden Wild Typ MLK3 und die Kinase inaktive Mutante in den retroviralen Vektor pBabe puro kloniert und anschließend in NIH 3T3 Zellen transfiziert, wobei der Leervektor als Negativkontrolle diente. Da sich auf dem pBabe puro Vektor ein Puromycin Resistenzgen befindet, konnten transfizierte Fibroblasten durch Verwendung dieses Zellgifts selektiert werden. 12–15 Tage, nachdem Puromycin-resistente Kolonien konfluent gewachsen waren, wurden isolierte Foci von 100–250 Zellen in der Wild Typ MLK3 transfizierten Population sichtbar (Abb. 4.14). Morphologisch sind die MLK3 transformierten Fibroblasten eher mit Raf, als mit Ras transfizierten NIH 3T3 Zellen zu vergleichen, welche rund sind. Wie bei Raf haben MLK3 transformierte Fibroblasten einen langgezogenen spindelförmigen Zellkörper, wobei der Zellkern das Zellvolumen fast komplett ausfüllt (Abb. 4.15 und Daten nicht gezeigt). Die Expression der Flag fusionierten MLK3 Proteine wurde mit Western Blot Analyse überprüft (Abb. 4.16).

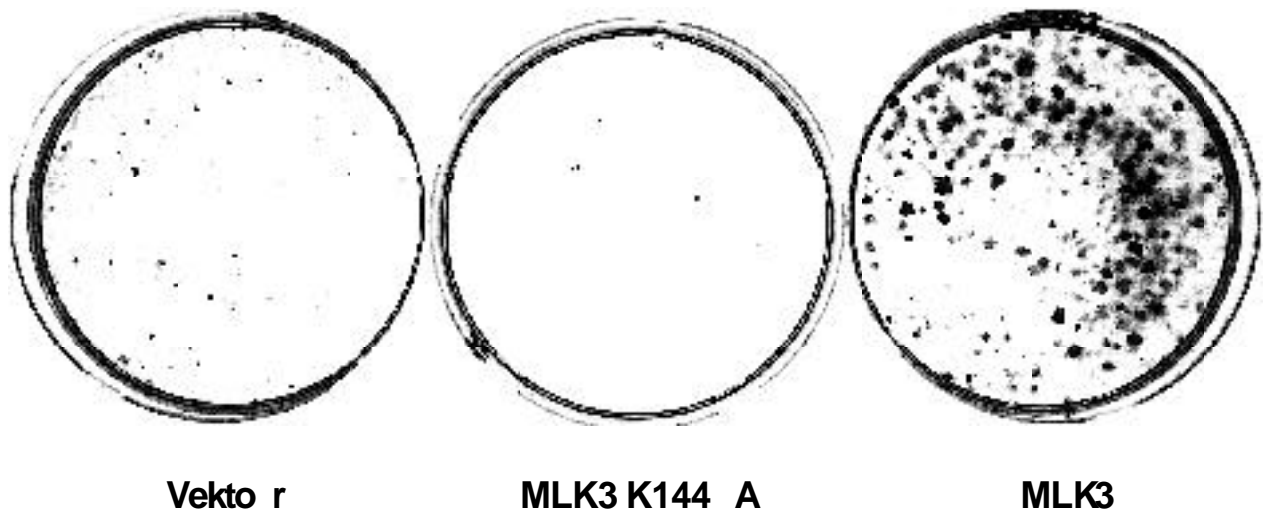


Abb. 4.14: Überexpression von Wild Typ MLK3 ist ausreichend, um NIH 3T3 Fibroblasten zu transformieren. NIH 3T3 Zellen wurden mit dem Vektor (pBabe puro) als Kontrolle, oder den Expressionsplasmiden für Kinase inaktive (pBabe puro MLK3 K144A) und Wild Typ MLK3 (pBabe puro MLK3) transfiziert und anschließend mit Puromycin selektioniert. 24 Tage nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie fixiert und die entstandenen Foci mit Giemsa-Färbung sichtbar gemacht.

Als zusätzliches Transformationskriterium wurde Verankerungs-unabhängiges Wachstum analysiert. Zu diesem Zweck wurden NIH 3T3 Zellen, die MLK3 überexprimierten, in Soft Agar inkubiert. MLK3 exprimierende Fibroblasten bildeten hierbei Kolonien, die nach 15 Tagen ein Ausmaß erreicht hatten, das man sie mit dem Auge detektieren konnte (4.15). Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert waren, bildeten wie erwartet keine Kolonien (Daten nicht gezeigt). Daraus schlußfolgert, dass Überexpression von MLK3 ausreichend ist, NIH 3T3 Fibroblasten morphologisch zu transformieren und Kolonien in Soft Agar zu formen.

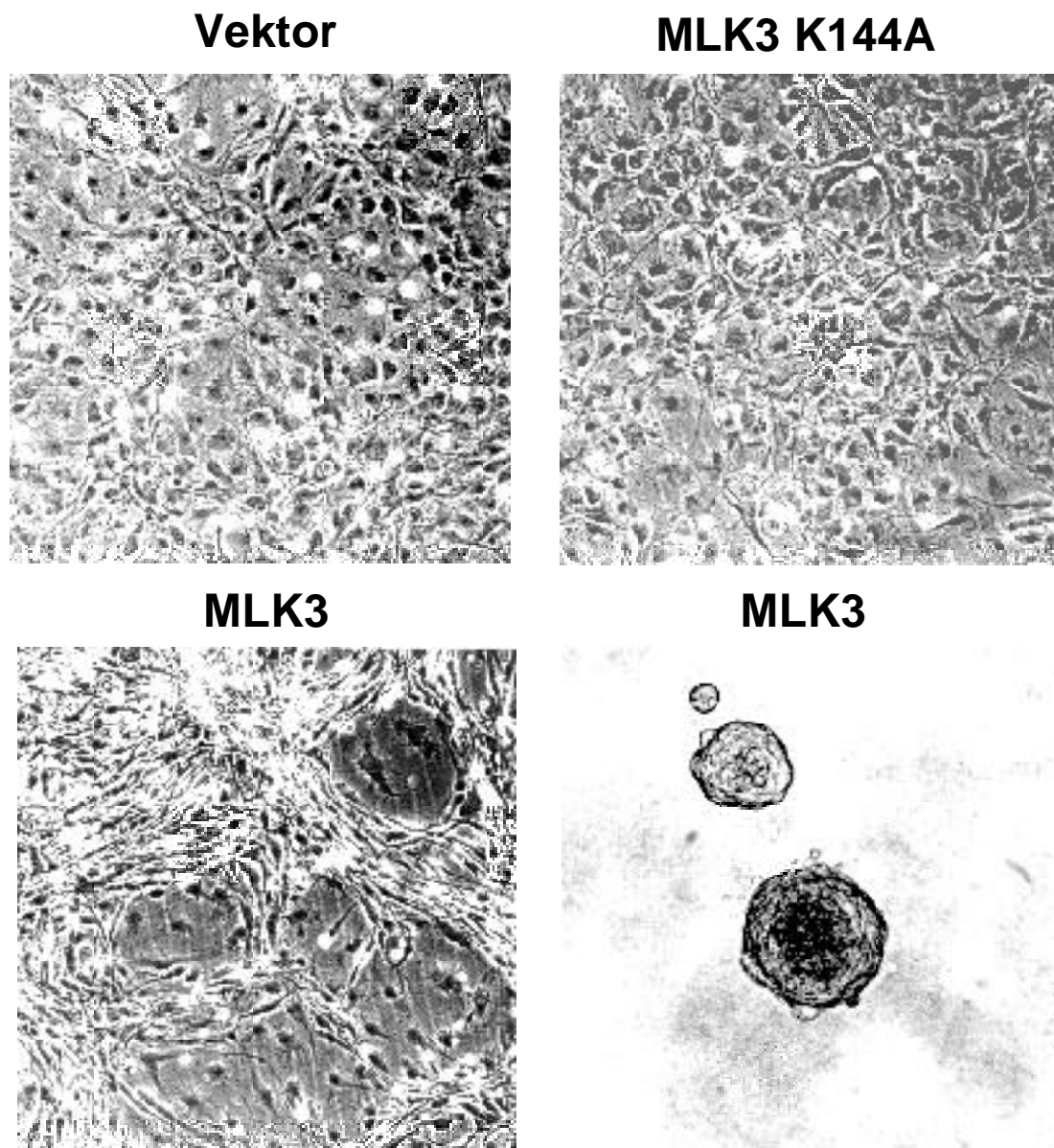


Abb. 4.15: Morphologie von MLK3 transformierten Fibroblasten.

Vergleich der Morphologie von NIH 3T3 Zellen die (A) mit dem Vektor, (B) Kinase inaktiver MLK3 (K144A) oder (C) Wild Typ MLK3 transfiziert worden sind. MLK3 transformierte Zellen wachsen übereinander und haben eine langgezogene spindelige Zellform. MLK3 infizierte NIH 3T3 formen Kolonien in Soft Agar (D), während Vektor transfizierte Zellen nicht im Soft Agar wachsen (Daten nicht gezeigt).

4.2.2. MEK und c-Jun sind konstitutiv phosphoryliert in MLK3 transformierten NIH 3T3 Fibroblasten

Um zu analysieren, ob in MLK3 transformierten NIH 3T3 Fibroblasten die gleichen Signaltransduktionskaskaden aktiviert sind wie in den zuvor beschriebenen Experimenten, wurden unterschiedliche Zelllinien auf den Aktivierungsstatus verschiedener Signaltransduktionsproteine mit Phospho-spezifischen Antikörpern untersucht. Vektor-, MLK3 K144A-, MLK3- und v-Raf- stabil transfizierte NIH 3T3 Zellen (Abb. 4.16 Laufspur 1-3,6,7) und zwei hochexprimierende MLK3 Klone (Laufspur 4,5), die aus den Soft Agar Experimenten gewonnen wurden, wurden subkonfluent 36 h mit 0,05% Serum gehungert und anschließend lysiert. Exogenes Flag-Epitop fusioniertes MLK3 ist nur in den stabilen MLK3 exprimierenden Zellen nachzuweisen. Eine signifikante Überexpression des exogenen Proteins verglichen mit endogenem MLK3 ist nur in den beiden klonalen Zelllinien (Laufspur 4,5) zu detektieren. JNK/SAPKs phosphorylieren den Transkriptionsfaktor c-Jun effizienter als ERKs (Derijard et al. 1994; Minden et al. 1994), wohingegen ERKs, aber nicht JNK/SAPKs, den c-Jun Promotor aktivieren (Rapp et al. 1994; Leppa et al. 1998). Serum gehungerte Fibroblasten exprimieren geringe Mengen von c-Jun (Laufspur 1), welches nach Arsenit Stimulation im Wanderungsverhalten "geshiftet" ist (Laufspur 7). In den MLK3 überexprimierenden klonalen Zelllinien ist c-Jun stark expremiert und "geshiftet", während in der v-Raf Zelllinie nur die Expression verstärkt ist. Um zu bestätigen, dass das verzögerte Laufverhalten von c-Jun auf Phosphorylierung zurückzuführen ist, wurde ein c-Jun Antikörper verwendet, der nur das phosphorylierte Protein erkennt. Wie nicht anders zu erwarten, ist in den Zelllinien, in denen c-Jun "geshiftet" vorliegt (Laufspur 4-7), das Protein auch phosphoryliert, wobei das Ausmaß der Phosphorylierung mit dem "Shift" korreliert. Die starke c-Jun Phosphorylierung in den MLK3 Klonen (Laufspur 4,5) ist dabei auf eine starke konstitutive JNK/SAPK Aktivierung in diesen Zellen zurückzuführen (Daten nicht gezeigt).

Um den Status der MEK und ERK Aktivität in diesen Zellen zu bestimmen, wurden Phosphorylierungs-spezifische Antikörper verwendet, die ausschließlich mit der aktivierten Form von MEK, bzw. ERK reagieren. Unsere Daten zeigen, dass, obwohl MEK in den MLK3 überexprimierenden Klonen stark phosphoryliert ist, kann in beiden Fällen keine ERK Aktivierung beobachtet werden. In der v-Raf Zelllinie hingegen liegen sowohl MEK als auch ERK in der aktivierten Form vor (Laufspur 6). In NIH 3T3 Fibroblasten, die transient mit MLK3 transfiziert worden sind, kommt es dagegen im Gegensatz zu den stabilen Zellen zu einer Aktivierung von ERK (Daten nicht gezeigt), was beweist, dass MLK3 in diesem

Zellsystem ERK aktivieren kann. In der MLK3 Zelllinie, die durch Selektion mit Puromycin generiert wurde und nur geringe Mengen des Transgens exprimiert, ist keine Phosphorylierung von c-Jun oder MEK nachzuweisen. Dies korreliert mit einer sehr geringen Zahl morphologisch transformierter Zellen in dieser Population. Die Fibroblasten, die über Soft Agar kloniert worden sind, weisen dagegen starke Überexpression des Transgens auf (Laufspur 4,5). Hieraus läßt sich folgern, dass Verankerungs-unabhängiges Wachstum und morphologische Transformation eine starke MLK3 Überexpression benötigen.

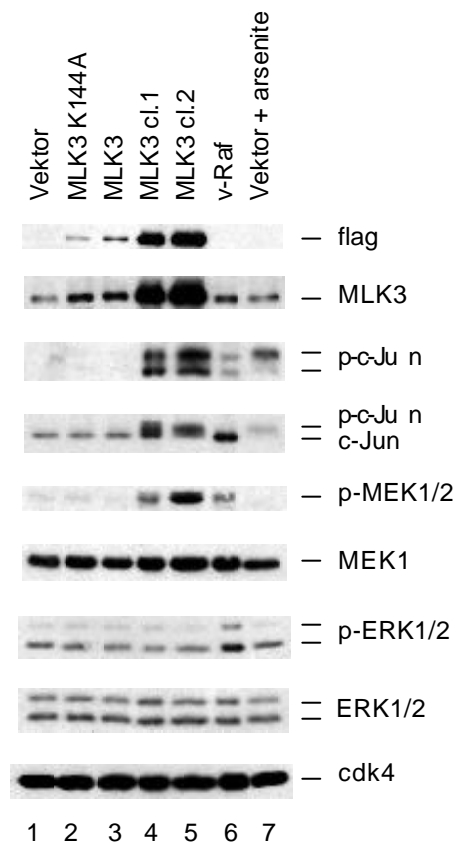


Abb. 4.16: Regulation von MEK1/2, ERK1/2 und c-Jun in MLK3 transformierten NIH 3T3 Fibroblasten.

NIH 3T3 Fibroblasten die mit dem pBabe Vektor (Laufspur 1), pBabe MLK3 K144A (Laufspur 2) und pBabe MLK3 (Laufspur 3) transfiziert worden sind und zwei klonale MLK3 exprimierende Klone (MLK3 Kl.1 +2), die durch Soft Agar Klonierung generiert worden sind, wurden mit einer klonalen v-Raf transformierten NIH 3T3 Zelllinie, bezüglich Ihrer Fähigkeit MEK, ERK und c-Jun zu phosphorylieren, verglichen. Die Zellen wurden 48 h subkonfluent mit 0,05% Serum gehungert. Vektor transfizierte Zellen wurden zusätzlich 45 min vor der Zellyse mit Arsenit stimuliert, so dass die Endkonzentration 0,5 μ M betrug (Laufspur 7). Gleiche Mengen der Proteinextrakte wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt. Expression der angegebenen Proteine wurde durch Immunoblots analysiert, wobei cdk4 als Ladekontrolle diente.

4.2.3. Der MEK Inhibitor PD 098059 revertiert die transformierte Morphologie MLK3-exprimierender NIH 3T3 Fibroblasten partiell

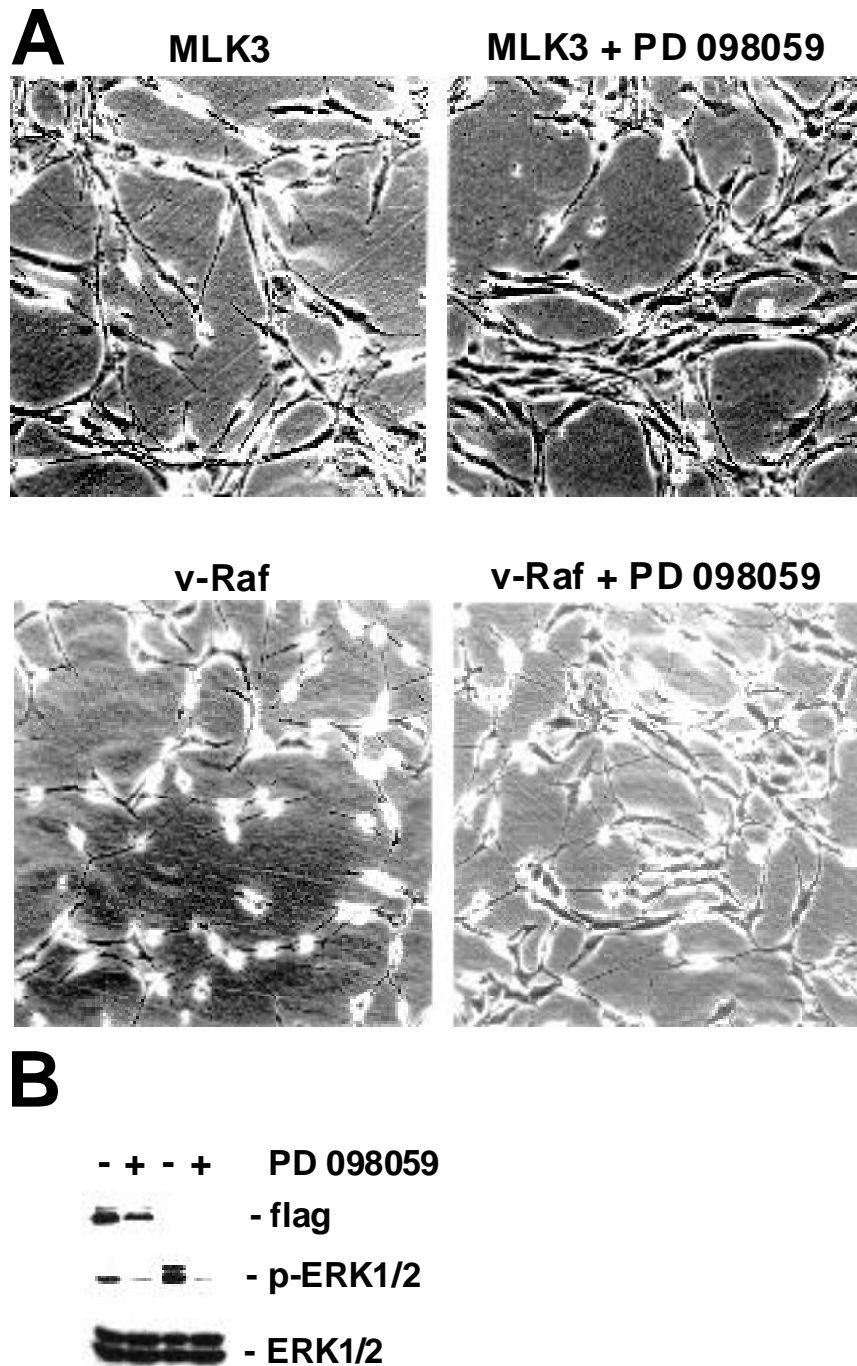


Abb. 4.17: Der synthetische MEK Inhibitor PD 098059 revertiert MLK3-transformierte Zellen teilweise.

A) Klonale MLK3 und v-Raf exprimierende Zelllinien, die über Soft Agar Klonierung gewonnen wurden, wurden 42 h mit dem PD 098059 MEK Inhibitor oder dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle unter subkonfluenten Bedingungen bei einer Endkonzentration von 15 μ M inkubiert. B) Gleiche Mengen der Proteinextrakte der entsprechend behandelten Zelllinien wurden auf denaturierenden Proteingelen analysiert. Dargestellt sind der flag detektierende Immunoblot gegen überexprimiertes MLK3, der phospho-ERK1/2 und der ERK1/2 Immunoblot als Ladekontrolle.

Um die Rolle des Raf-MEK-ERK Signalwegs bei der MLK3-induzierten Transformation zu ermitteln, wurde der MEK spezifische Inhibitor PD 098059 eingesetzt. MLK3 transformierte Fibroblasten haben eine langgezogene spindelförmige Struktur. Inkubiert man die Zellen mit dem MEK Inhibitor PD 098059 breiten sich die Zellen jedoch wieder aus und ihre Morphologie ähnelt nun mehr parentalen NIH 3T3 Fibroblasten. V-Raf transformierte Fibroblasten wurden als Positivkontrolle verwendet und zeigten eine noch stärkere Reversion. In MLK3 und v-Raf transformierten Zellen, die mit dem Inhibitor inkubiert waren, ist basale ERK1,2 Phosphorylierung stark reduziert, während die Expression von ERK1,2 nicht beeinflusst ist.

4.2.4. Synergistische Focibildung durch MLK3 und aktivierter MEK1

Schwach transformierende Onkogene kooperieren mit anderen schwachen Onkogenen in ihrer Fähigkeit Fibroblasten zu transformieren. So konnte für die beiden Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 gezeigt werden, dass sie mit schwach aktiviertem Raf in der Focusbildung kooperieren. Es sollte daher analysiert werden, ob das schwach transformierende MLK3 als ein Rac1/Cdc42 Effektor mit dem Raf-MEK-ERK Signalweg kooperiert. Da bereits gezeigt werden konnte, dass MLK3 die Aktivität der konstitutiv aktiven MEK1 Mutante LIDEMANE nicht modulieren kann, wurden einmal stabil MLK3 überexprimierende NIH 3T3 Zellen mit MEK1 LIDEMANE und in einem zweiten Versuchsansatz beide Expressionsplasmide in parentale NIH 3T3 Zellen transfiziert. In beiden Versuchsansätzen zeigte sich ein starker Synergismus bei der Kotransfektion. In Abbildung 4.18 sind pBabe, pBabe MLK3 K144A und MLK3 Zelllinien transfiziert mit MEK1 LIDEMANE dargestellt. Als Kontrolle ist die MLK3 Zelllinie transfiziert mit dem Vektor abgebildet. Während alle drei Zelllinien transfiziert mit dem Vektor nach 12 Tagen keine Foci generiert haben (MLK3 Zelllinien bilden bei einer Experimentdauer > 20 Tage Foci), zeigen pBabe Zelllinien transfiziert mit MEK1 LIDEMANE einige Foci. Im Unterschied hierzu ist im Fall der Kotransfektion von MLK3 und MEK1 LIDEMANE (Daten nicht gezeigt) und der Transfektion von MEK1 LIDEMANE die Ausbeute der Foci ca. um den Faktor 10 erhöht (siehe Abb 4.18). Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass MLK3 ERK unabhängige Signalwege aktiviert, die für die Transformation von NIH 3T3 Fibroblasten wichtig sind.

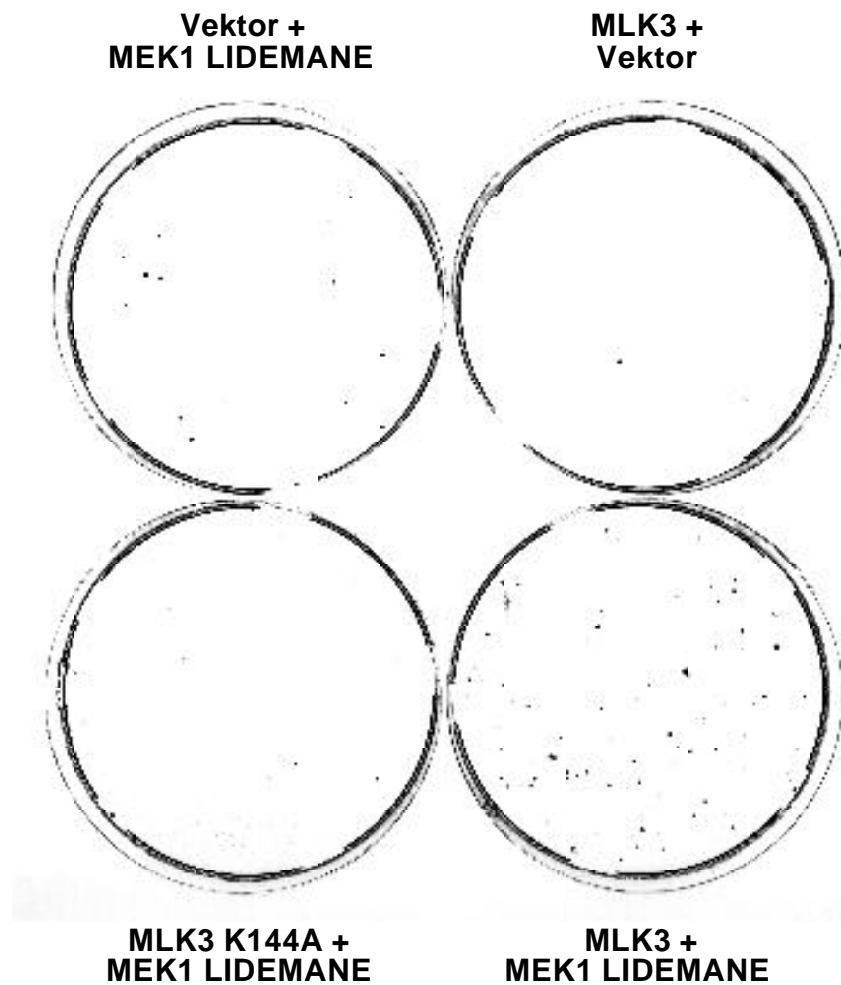


Abb. 4.18: MLK3 und MEK1 LIDEMANE kooperieren in ihrer Fähigkeit Fibroblasten zu transformieren. Generierung der stabilen Zelllinien wurde unter 4.2.1 näher beschrieben. Diese Zellen wurden dann subkonfluent mit 1 μg p Babe MEK1 LIDEMANE oder 1 μg Vektor transfiziert. Die Zellen wurden 36 h später trypsinisiert und in 100 mm Schalen überführt. Die Fibroblasten wurden 12 Tage nach Erreichen der Konfluenz mit Giemsa gefärbt.

4.2.5. Reduzierte ERK1/2 Aktivierung durch mitogene Stimuli in MLK3 transformierten Zellen

AP-1 Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Zelltransformation (Shaulian and Karin 2001; Vogt 2001). Nachdem in Abbildung 4.18 gezeigt werden konnte, dass MLK3 ERK unabhängige Signalwege für die Transformation von NIH 3T3 Fibroblasten benutzt, wurden die klonalen MLK3 Zelllinien auf ihre Fähigkeit, andere AP-1 Faktoren außer c-Jun (siehe Abb. 4.16) zu induzieren, analysiert. Für MLK3 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in allen analysierten Zellsystemen die JNK/SAPK Signalkaskade aktiviert. Auch das Transaktivierungspotential von JunD und JunB ist abhängig von JNK/SAPK (Kallunki et al. 1996), wenn auch nicht so stark wie das von c-Jun (Binetruy et al. 1991). Aus diesem Grund wurde das Potential der MLK3 Klone mit NIH 3T3 Fibroblasten verglichen, die Transkription von Proteinen der Jun Familie (JunB, JunD, c-Jun) zu verstärken. Neben einer starken Transaktivierung des c-Jun Proteins (siehe auch Abb. 4.16) ist dieser Effekt auch bei JunD in den MLK3 transformierten Zellen zu beobachten. Stimulation der gehungerten Zellen mit Serum führt im Fall von c-Jun zu einer Verstärkung der Transaktivierung während im Fall von JunD kein zusätzlicher Effekt zu beobachten ist. JunB reguliert im Gegensatz zu c-Jun Zellwachstum negativ und ist als ein Antagonist von c-Jun und JunD beschrieben worden (Shaulian and Karin 2001). In gehungerten Fibroblasten und den MLK3 Klonen ist kein JunB Protein zu detektieren, doch nach Serum Stimulation kommt es zu einer starken Induktion des Proteins in NIH 3T3 Zellen, die in den hochexprimierenden MLK3 Klonen beinahe komplett blockiert ist. Neben c-Jun ist also in MLK3 transformierten NIH 3T3 Zellen auch JunD aktiviert und zusätzlich ist JunB Aktivierung nach Serum Stimulation blockiert. Zusätzliche Analysen haben ferner gezeigt, dass auch der zur Fos Familie zählende Transkriptionsfaktor Fra-1 in MLK3 exprimierenden Fibroblasten um den Faktor 2-3 hochreguliert ist (Daten nicht gezeigt). Nachdem eine Serum induzierte JunB Aktivierung in den MLK3 transformierten Fibroblasten blockiert ist, wurde in diesem Zellsystem untersucht, ob die Aktivierung der MAPK ERK nach Stimulation mit Mitogenen, wie Serum und TPA, in den transformierten Zellen geblockt ist. Es stellte sich heraus, dass in den MLK3 Klonen ERK1/2 Aktivierung sowohl durch Serum als auch durch TPA partiell geblockt ist. Dieser Effekt tritt dabei stärker bei Klon 2 auf. Interessanterweise ist in diesem Klon die Expression von MLK3 stärker als in Klon 1, was zusätzlich mit einer stärkeren MEK1/2 Phosphorylierung unter den gleichen Bedingungen korreliert (siehe Abb. 4.16). Diese Daten belegen, dass in MLK3 transformierte Fibroblasten Mitogen aktivierte ERK1/2 Aktivierung partiell blockiert ist.

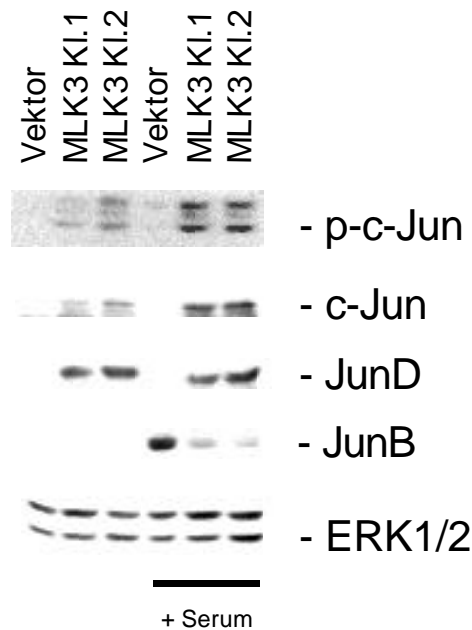
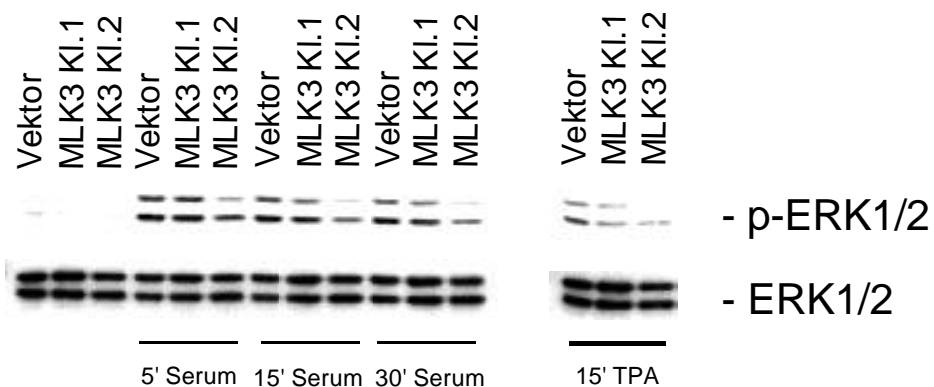
A**B**

Abb. 4.19: In MLK3 transformierten Zellen ist Serum-induzierte JunB Aktivierung und Mitogen induzierte ERK Aktivierung partiell geblockt.

NIH 3T3 Zellen und MLK3 Klone (siehe Abb. 4.16) wurden 70% konfluent wachsen gelassen und anschließend mit 0,05% Serum 24 h gehungert. A) Stimulation mit Serum wurde bei einer Endkonzentration von 20% durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Lysate nach Auftrennung auf denaturierenden Proteingelen mit den folgenden Antikörpern analysiert: phospho c-Jun, c-Jun, JunD, JunB und ERK1/2 wurde als Ladekontrolle verwendet. B) Fibroblasten wurden zusätzlich mit 100 ng TPA für die angegebene Zeit stimuliert, lysiert und auf Proteingelen mit dem phospho ERK1/2 und ERK1/2 Antikörpern analysiert.

4.2.6. MLK3 induzierte MEK Phosphorylierung blockiert Wachstumsfaktor-induzierte MEK Aktivierung

Um zu überprüfen, ob die partielle Blockierung der Serum- und Wachstumsfaktor-induzierten ERK1/2 Aktivierung in den MLK3 transformierten klonalen Zelllinien auch in anderen Zellsystemen auftritt, wurden HeLa Zellen mit MLK3 und Raf-BXB transfiziert (Transfektionseffizienz ca. 80%). Dieses Zellsystem wurde gewählt, da schon in der *in vivo* Markierung in HeLa Zellen gezeigt wurde, dass MLK3 Überexpression zu einer MEK1/2 Phosphorylierung führt. Beide dualspezifischen Kinasen wurden je aus den gleichen Lysaten immunpräzipitiert, um die Effekte direkt korrelieren zu können. In Abbild 4.18 ist zu sehen, dass MEK1 und MEK2 sowohl durch Serumstimulation wie auch durch Raf-BXB aktiviert werden. Weder MEK1 noch MEK2 sind dagegen, gemessen an ihrer Fähigkeit ERK2 *in vitro* zu phosphorylieren, in MLK3 transfizierten HeLa Zellen aktiviert. Dieser Effekt ist auch schon in HEK 293 Zellen mit endogenem MEK1/2 beschrieben worden (siehe Abb. 4.11). Serum-induzierte MEK2 und in einem geringeren Ausmaß auch MEK1 Aktivierung ist in MLK3 transfizierten HeLa Zellen dagegen blockiert. Diese Daten zeigen, dass die Effekte die in den klonalen MLK3 überexprimierenden Fibroblasten beobachtet wurden (Abb. 4.17), durchaus auch in anderen Zellsystemen auftreten.

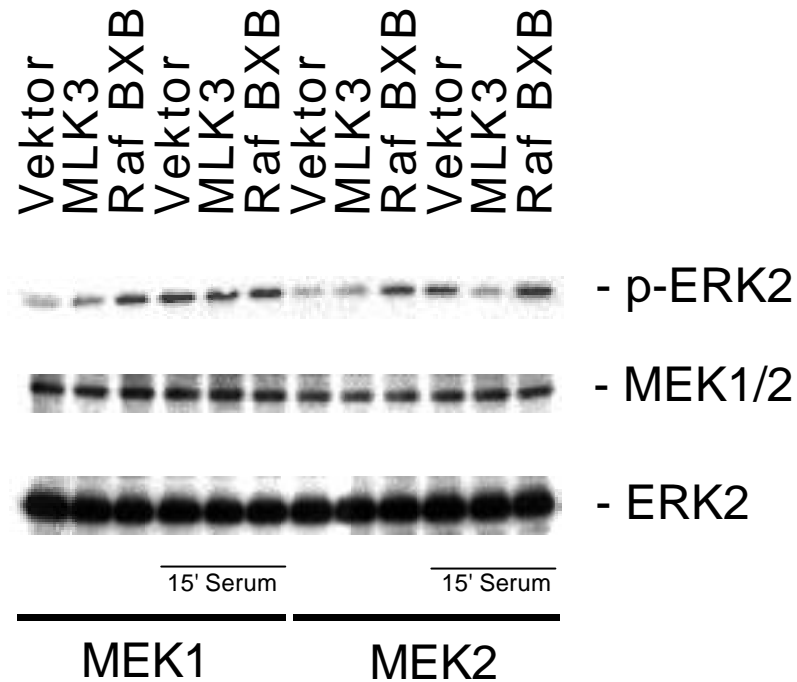


Abb. 4.20: Serum-induzierte MEK Aktivierung ist in MLK3-exprimierenden HeLa Zellen inhibiert.

HeLa Zellen wurden mit je 800 ng pCMV5 MLK3, pCDNA3 Raf-BXB oder der Vektorkontrolle transfiziert und 24 h nach der Transfektion lysiert. Zellen wurden 12 h vor der Zellyse mit 0,05% Serum gehungert. MEK1 und 2 wurden aus dem Proteinlysate immunpräzipitiert, gewaschen und ein *in vitro* Kinase Assay mit ERK2 als Substrat durchgeführt. Dieser wurde 25 min bei RT durchgeführt. In der Abbildung sind der phospho ERK1/2 detektierende Immunoblot zusammen mit den Kontrollblots für die MEK Immunpräzipitation und der ERK1/2 Kontrollblot dargestellt.

5. Diskussion

5.1. MLK3 aktiviert JNK/SAPK und phosphoryliert und entkoppelt gleichzeitig die MAPK Kinasen MEK1/2 von ERK1/2 Aktivierung

Individuelle MAPK Kaskaden üben ihre Funktion im allgemeinen unabhängig voneinander aus und diese Spezifität manifestiert sich in unterschiedlichen physiologischen Antworten. Dies ist besonders in der Hefe *S. cerevisiae* offensichtlich. Hier löst ein spezifisches extrazelluläres Ereignis die Aktivierung einer einzigen MAP Kinase aus und diese initiiert dann ein distinktes zelluläres Programm (Herskowitz 1995; Madhani and Fink 1998). Stimulation der Hefe mit Pheromonen führt z.B. zur Aktivierung der STE11-STE7-FUS3 Signaltransduktionskaskade, welche zum Zellzyklusarrest und zur Induktion spezieller 'Paarungs' Gene führt. Verwandte MAP Kinasen, welche Signaltransduktionskomponenten mit dem FUS3 Signalweg teilen, werden dagegen nicht durch Pheromone stimuliert, sondern nur durch ihr spezifisches Signal. Hohe Salzkonzentrationen führen z.B. zu einer STE11 vermittelten Hog1 Aktivierung, die nicht zur Transkription von 'Paarungs'-spezifischen Genen führt. Diese Beobachtungen schlagen vor, dass Hefe Zellen einen effizienten Mechanismus entwickelt haben, um die Spezifität einzelner Kaskaden zu gewährleisten und 'cross talk' zu unterbinden, sogar wenn einzelne Komponenten wie STE11 in mehr als einem Signalweg partizipieren.

In mehrzelligen Organismen gestaltet sich dieses Problem komplexer, denn jede einzelne Zelle ist gleichzeitig einer Vielzahl von extrazellulären Signalen ausgesetzt und sie muß diese Signale integrieren, um eine geeignete Antwort zu wählen. MAPK Kaskaden in höheren Organismen sind im Gegensatz zu Hefen nicht selten miteinander verknüpft. So benötigen spezielle biologische Antworten hier oft mehr als einen einzigen Stimulus. Um aber eine geeignete zelluläre Antwort zu generieren, müssen die aktivierten Signalwege koordiniert und anschließend integriert werden. Um dies zu erreichen, haben MAPK Signalwege Strategien entwickelt, um miteinander zu kommunizieren. Durch diesen 'cross talk' kann der Informationsfluß und dadurch die Spezifität der beteiligten Signalwege verändert werden. So konnte z.B. für die MAPKK Kinase Tpl-2/Cot gezeigt werden, dass sie sowohl den ERK als auch den JNK/SAPK Signalweg aktivieren kann (Salmeron et al. 1996; Hagemann et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass die Serin/Threonin Kinase MLK3 durch die Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 aktiviert wird. Diese Aktivierung führt auf der einen Seite zur Aktivierung des JNK/SAPK Signalwegs und einer damit verbundener Induktion von AP-1 Faktoren wie c-Jun und JunD *in vivo*. Auf der anderen Seite phosphoryliert MLK3 MEK1/2 an den für die Aktivierung dieser dualspezifischen Kinasen benötigten Serin-Resten und ist in Immunkomplex-Kinase-Versuchen, bei denen entweder MEK oder ERK überexprimiert wurden, zusätzlich ein Aktivator der MAP Kinase ERK. Im Gegensatz zu diesen Analysen zeigte sich dann aber, dass MLK3 in verschiedenen Zellsystemen endogenes ERK1/2 nicht aktivieren kann. Weitere Experimente demonstrierten deutlich, dass obwohl MLK3 endogenes MEK1/2 auch an den für die Aktivierung wichtigen Serinen 217/221 phosphoryliert, eine Signalweiterleitung dieser aktivierten MEK1/2 zu ERK1/2 sowohl *in*

in vivo wie auch *in vitro* unterbunden ist. Vielmehr ist in Zellen, die MLK3 überexprimieren, sogar Wachstumsfaktor-induzierte ERK1/2 Aktivierung blockiert. Diese Daten zeigen, dass MLK3 neben seiner Funktion in der JNK/SAPK Aktivierung zusätzlich den ERK Signalweg negativ durch eine Entkoppelung der aktivierten MEK1/2 von ERK1/2 Aktivierung moduliert. Dieser Befund zeigt, dass eine Kinase in mehrzelligen Organismen unter den gleichen Bedingungen einen MAPK Signalweg positiv und den anderen negativ regulieren kann.

Die Fähigkeit von MLK3 die Stress aktivierte MAPK JNK/SAPK in unterschiedlichen Zellsystemen zu aktivieren, ist sehr gut dokumentiert. Erste Analysen zeigten, dass MLK3 JNK/SAPK durch direkte Phosphorylierung und Aktivierung von MKK4/SEK1 aktiviert (Rana et al. 1996; Teramoto et al. 1996; Tibbles et al. 1996; Hartkamp et al. 1999). Eine zweite dualspezifische Kinase, die ebenfalls JNK/SAPK aktiviert, konnte mit MKK7 kloniert werden. Diese bindet zusammen mit MLK3 und JNK/SAPK an die JIP1/2 'scaffold' Proteine (Gerüstproteine) (Whitmarsh et al. 1998; Yasuda et al. 1999). Nähere Analysen belegten dann, dass JIP1/2 MLK3 induzierte JNK/SAPK Aktivierung potentieren kann. Interessanterweise konnte für MKK4/SEK1 gezeigt werden, dass es JNK/SAPK präferentiell an Threonin und MKK7 präferentiell an Tyrosin phosphoryliert (Lawler et al. 1998). Eine maximale JNK/SAPK Aktivierung benötigt jedoch beide Phosphorylierungen, was der Zelle ermöglicht, die Effekte unterschiedlicher extrazellulärer Stimuli zu integrieren (Lawler et al. 1998). In Gen Knockoutstudien konnte anschließend gezeigt werden, dass sowohl MKK7 als auch MKK4/SEK1 für optimale JNK/SAPK Aktivierung nach UV Stimulation nötig sind, während inflammatorische Zytokine wie IL1 β und TNF α präferentiell MKK7 benötigen (Tournier et al. 2001). Nachdem MLK3 sowohl MKK4/SEK1 als auch MKK7 aktiviert, ist der starke Effekt von MLK3 auf JNK/SAPK Aktivierung besser einzuordnen. In MLK3 exprimierenden HeLa Zellen (Abb. 4.8B) und in MLK3 transformierten NIH 3T3 Fibroblasten (Abb. 4.16) ist die JNK/SAPK Aktivität, gemessen an der Phosphorylierung des Substrats c-Jun, deutlich höher, als im Vergleich zu Arsenit stimulierten Zellen, welches ein starker JNK/SAPK Aktivator ist. Neben dieser Aktivierung des JNK/SAPK Signalweges, ist auch eine MKK3/6 abhängige Aktivierung der p38 Signalkaskade von Tibbles et al. publiziert worden (Tibbles et al. 1996). Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass in den hier analysierten Zellsystemen keine Aktivierung von p38 stattfindet (Abb. 4.8B, Daten nicht gezeigt), was auch von anderen Arbeiten bestätigt wurde (Teramoto et al. 1996).

Sämtliche Mitglieder der Familie der Mixed Lineage Kinasen haben eine Cdc42 and Rac interactive binding sequence (CRIB) Bindedomäne. Über diese konservierte Domäne binden MLK2/3 spezifisch an die aktivierten Versionen der Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 (Burbelo et al. 1995; Nagata et al. 1998; Tapon et al. 1998). Für diese beiden Rho GTPasen konnte vorher bereits gezeigt werden, dass sie den JNK/SAPK Signalweg aktivieren können (Coso et al. 1995; Minden et al. 1995). Weiterhin konnten Teramoto et al. anschließend zeigen, dass eine inaktive MLK3 Mutante Rac1- und Cdc42-induzierte JNK/SAPK Aktivierung blockiert (Teramoto et al. 1996). Koexpression von aktiviertem Cdc42 und MLK3 verstärkt zusätzlich MLK3 Kinaseaktivität. Vergleichende Phosphopeptid Analysen demonstrierten ferner, dass Koexpression von aktivierter Cdc42 und MLK3 *in vivo* das Serin/Threonin Phosphorylierungsmuster von MLK3 verändert, was nahelegt, dass Cdc42 die katalytische Aktivität von MLK3 durch eine Veränderung der phosphorylierten Aminosäuren verstärkt

(Bock et al. 2000). In der hier vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass Koexpression von Rac1 oder Cdc42 mit MLK3 zu einer starken synergistischen Aktivierung des JNK/SAPK Signalweges *in vivo* führt (Abb. 4.13). Diese Daten belegen eindeutig die Relevanz der beiden Rho GTPasen als direkte Aktivatoren von MLK3.

Sowohl Rac als auch Cdc42 kooperieren zusätzlich mit Raf in der Aktivierung der ERK Signaltransduktionskaskade (Frost et al. 1997; Tang et al. 1999). Dieser kooperative Effekt hängt hier von der MAPKKK Kinase PAK1 ab, die MEK1 in einer Prolin-reichen Region phosphoryliert, welches die Affinität von MEK zu C-Raf verstärkt (Frost et al. 1997). Für PAK3 konnte kürzlich gezeigt werden, dass es C-Raf Aktivierung durch Phosphorylierung an Serin 338 positiv reguliert (King et al. 1998). Diese Daten belegen eindeutig das Konzept der 'cross-cascade' Kommunikation zwischen Aktivatoren der JNK/SAPK und der ERK MAP Kinase Kaskade. In Abb. 4.13 ist der kooperative Effekt von aktiviertem Rac1 und Cdc42 koexprimiert mit MLK3 auf die Aktivierung des ERK Signalweges dargestellt. Aus diesem Grund mußten die eingesetzten DNA Mengen vorher so titriert werden, dass durch die alleinige Expression nicht schon eine maximale Aktivierung der Signalwege erreicht wurde. Interessanterweise ist nur ein kooperativer Effekt auf MEK1/2 Phosphorylierung zu beobachten, während keine Aktivierung von ERK zu beobachten ist. Diese Daten legen den Schluß nahe, dass die durch Rac1-/Cdc42-vermittelte MLK3 Aktivierung zu einer Phosphorylierung von MEK1/2 führt, die von ERK1/2 Aktivierung entkoppelt ist (Abb 4.13). Erste Analysen hatten dagegen gezeigt, dass MLK3 Überexpression ERK aktiviert (Abb 4.2). Diese ERK Aktivierung konnte mit MEK spezifischen Inhibitoren oder einer Kinase inaktiven MEK Mutante blockiert werden (Abb. 4.3). In *in vitro* Experimenten mit gereinigter MEK1 als Substrat konnte zusätzlich gezeigt werden, dass MLK3 MEK direkt phosphoryliert (Abb 4.5). Diese Daten belegten daher eindeutig, dass unter den gegebenen Experimentbedingungen MLK3 Überexpression zu einer MEK vermittelten ERK Aktivierung führt (Hartkamp et al. 1999). Diese Aussagen wurden ferner durch Nagata et al. unterstützt, die in ähnlichen Experimenten eine ERK Aktivierung durch Überexpression von MLK2 beobachtet hatten (Nagata et al. 1998).

Unterhalb von Ras phosphorylieren und aktivieren alle drei Raf Isoformen MEK1/2 (Daum et al. 1994; Morrison and Cutler 1997). Beide dualspezifischen Kinasen werden dabei durch Phosphorylierung der Serine 217/221 aktiviert (Alessi et al. 1994; Huang and Erikson 1994; Zheng and Guan 1994). Obwohl auch für andere MAPKK Kinasen wie MEKK1, Mos oder Tpl-2/Cot gezeigt wurde, dass sie die gleichen Serine phosphorylieren, gelten Raf Isoformen als wichtigste MEK Aktivatoren in den meisten Zelltypen (Daum et al. 1994; Schaeffer and Weber 1999). Um die MLK3 vermittelten Phosphorylierungsstellen auf MEK näher zu charakterisieren, wurde gereinigtes MEK1 mit aktiviertem PAK, MLK3 oder Raf phosphoryliert. Im Vergleich des Autoradiogramms mit dem Immunoblot gegen Serin 217/221 phosphoryliertes MEK1 korrelierte die Intensität der MLK3- und Raf-vermittelten MEK1 Phosphorylierung mit der Intensität des phospholierungsspezifischen Antikörpersignals, während PAK Überexpression hier nicht zur MEK Phosphorylierung führte (Abb. 4.7). Diese Analyse lieferte den ersten Hinweis, dass MLK3 die gleichen Phosphorylierungsstellen auf MEK wie Raf benutzt. Zusätzliche Hinweise, dass MLK3 MEK1/2 an den für die Aktivierung wichtigen Serine 217/221 phosphoryliert, ergaben sich aus Analysen mit MEK Punktmutanten (Abb. 4.9). Weder koexprimiertes Raf-BXB noch

MLK3 sind in der Lage eine aktivierte MEK1 Mutante, bei der beide Serine gegen Glutaminsäure ausgetauscht wurden (LIDEMANE), in ihrer Aktivität *in vivo* oder *in vitro* zu modulieren. Koexpression von Wild Typ MEK1 und zu einem geringeren Ausmaß auch der MEK1 Mutante, bei der ein Serin durch Alanin ersetzt worden war (LIDA), führten besonders mit MLK3 zu einer starken ERK Aktivierung *in vivo* wie auch *in vitro*, wobei das Ausmaß der [³²P]-Inkorporation mit der Stärke des Signals im Immunoblot mit dem Phosphorylierungsspezifischen Antikörper korrelierte. Auffällig in diesem Versuch ist besonders der starke synergistische Effekt von MLK3 auf ERK Aktivierung, wenn Wild Typ MEK1 koexprimiert wurde. Während alleinige Raf-BXB Überexpression bereits zu einer starken ERK Aktivierung *in vivo* führte, ist dies im Fall von MLK3 Überexpression nicht zu beobachten. Wir stellen fest, dass wir immer dann eine MLK3-vermittelte ERK Aktivierung beobachten, wenn entweder MEK oder ERK (siehe Abb. 4.2) zusätzlich exprimiert wurden. Erste *in vitro* Analysen hatten jedoch bereits gezeigt, dass in einem gekoppelten Versuch, in dem MLK3 sowohl Wild Typ MEK, als auch Kinase inaktive ERK als Substrat angeboten wurde, die MLK3-vermittelte MEK Phosphorylierung nicht zu einer Phosphorylierung von ERK führte (Abb. 4.6) (Hartkamp et al. 1999). Diese Daten wurden in Abb. 4.10 (Laufspur 1-3) noch einmal reproduziert und warfen die Frage auf, warum MLK3-vermittelte MEK Aktivierung *in vivo* nach MEK Koexpression zu einer ERK Aktivierung führte (Abb. 4.9), die sich *in vitro* nicht reproduzieren läßt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Proteine, die sich im MLK3 Präzipitat befinden eine Interaktion zwischen MEK und ERK blockieren, wurde Wild Typ GST-MEK1 in einem Kinase Assay *in vitro* zuerst von MLK3 und Raf-BXB als Kontrolle phosphoryliert, und anschließend wurde MEK mit unterschiedlichen Methoden isoliert und ein erneuter *in vitro* Kinase Assay mit ERK als Substrat durchgeführt. Hier zeigte sich jetzt eindeutig, dass nach der Immunpräzipitation die MLK3-vermittelte MEK Phosphorylierung verglichen mit der durch Raf-BXB in der Tat zu einer vollen ERK Phosphorylierung führte (Abb. 4.10 Laufspur 4-12). Zusätzliche Analysen unterstützten dann die Vermutung, dass in dem gekoppelten Versuch tatsächlich Faktoren des MLK3 Präzipitats die Interaktion von aktivierter MEK mit ERK verhindern (Abb. 4.10B). Diese Daten zeigen, dass MLK3 phosphoryliertes MEK voll aktiv ist und erklären außerdem, warum MLK3-vermittelte MEK Aktivierung *in vitro* im gekoppelten Versuch nicht zur ERK Phosphorylierung führt. Dennoch lassen sich durch die gewonnenen Daten bezüglich der blockierten MEK-ERK Interaktion keine Rückschlüsse auf die zelluläre Situation ziehen. Hier konnte ja bereits gezeigt werden, dass MLK3 nach MEK Koexpression ein ERK Aktivator ist. Vielmehr läßt sich aus den in Abb. 4.2; 4.9 und 4.10 gewonnenen Daten der Schluß ziehen, dass MLK3 die Interaktion zwischen MEK-ERK *in vivo* nicht blockiert und daher die gestellten Versuchsbedingungen in dem gekoppelten Versuch so in der Zelle nicht vorzufinden sind.

Eine weitere wichtige Frage war, ob MLK3 endogenes MEK1/2 *in vivo* phosphorylieren kann. Aus diesem Grund wurden HeLa Zellen mit MLK3 transfiziert und vor der Zellyse und anschließender Immunpräzipitation von MEK1/2 zwei Stunden mit [³²P]-Phosphat markiert. Das Resultat zeigte, dass MLK3 Überexpression zu einer starken Phosphorylierung von MEK1 und 2 führte, die sogar stärker als in der Raf-BXB Positivkontrolle war. Die bis hierhin gewonnenen Daten zeigen, dass MLK3 MEK1/2 *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert. Diese Phosphorylierung findet ausschließlich an den beiden für die Aktivierung von MEK1/2

wichtigen Serinen 217/221 statt und führt dementsprechend nach Koexpression von MLK3 und Wild Typ MEK zu einer ERK Aktivierung. Es stellte sich jetzt aber die Frage, warum MLK3 nur im Fall von MEK Koexpression ein ERK Aktivator ist, während ja alleinige Überexpression kaum zu einer detektierbaren ERK Aktivierung führte (Abb. 4.9A Laufspur 1-3). Nachdem in Abb. 4.9 schon gezeigt worden ist, dass im Fall einer Koexpression von MLK3 und MEK diese nach Immunpräzipitation in einem *in vitro* Kinase Assay ähnlich aktiv ist wie in der Raf-BXB Kontrolle, sollte dieser Versuch auf endogenes MEK1/2 übertragen werden. Aus diesem Grund wurden HEK 293 Zellen mit Raf-BXB und MLK3 Expressionsplasmiden transfiziert und endogenes MEK1/2 mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Hier zeigte sich unter den gleichen Versuchsbedingungen ein anderes Bild. Obwohl endogenes MEK1 und MEK2 sowohl durch MLK3 wie auch durch Raf-BXB etwa gleich stark an den für die Aktivierung wichtigen Serinen phosphoryliert wurden, führte dies im Fall der MLK3-vermittelten MEK1/2 Phosphorylierung nicht zur anschließenden ERK Phosphorylierung, wie das bei Raf-BXB induzierter MEK1/2 Phosphorylierung zu beobachten ist (Abb. 4.11). Diese Beobachtung deckt sich mit den in Abb. 4.13 gewonnenen Beobachtungen, dass MLK3 nach Aktivierung zwar zu einer JNK/SAPK Aktivierung aber nur zu einer von ERK Aktivierung entkoppelten MEK Phosphorylierung führt. Zusammen betrachtet lassen diese Daten nur den Schluß zu, dass MLK3 vermittelte MEK1/2 Phosphorylierung die dualspezifischen Kinasen MEK1/2 in einen Komplex mit einem MEK Inhibitor dirigieren. Dies beinhaltet auch eine Erklärung für den Sachverhalt, dass MLK3 durch Koexpression von Wild Typ MEK ERK aktivieren kann, denn Überexpression von MEKs würde zwangsläufig den postulierten endogenen Inhibitor austitrieren. Um die Präsenz einer von ERK Aktivierung entkoppelten MEK Phosphorylierung *in vivo* zu demonstrieren, wurden gehungerte HeLa Zellen mit einer Reihe verschiedener Stimuli behandelt und anschließend auf denaturierenden Proteingelen analysiert (Abb. 4.12). Während Mitogene wie Serum oder TPA zu einer MEK induzierten ERK Aktivierung führten, konnte mit verschiedenen Stresstimuli eine von ERK Aktivierung entkoppelte MEK2 Aktivierung beobachtet werden. So führte Stimulation von HeLa Zellen mit $\text{I}\text{I}\text{I}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ oder Anisomycin in der Abwesenheit jeglicher ERK Phosphorylierung nach 45 Minuten zu einer Akkumulation von phosphorylierter MEK2. Dieser Versuch belegt eindeutig, dass die beobachtete MLK3 induzierte MEK Phosphorylierung, die es von ERK Aktivierung entkoppelt, auch in der Zelle unter physiologischen Bedingungen vorkommt.

5.2. In MLK3 transformierten NIH 3T3 Fibroblasten ist Wachstumsfaktor-induzierte ERK Aktivierung blockiert

MAPK Kaskaden spielen im Prozess der zellulären Transformation eine wichtige Rolle (siehe Einleitung Kap. 2.4). Nachdem erste Analysen eine Aktivierung von ERK und JNK/SAPK nach Überexpression von MLK3 gezeigt hatten, wurde das transformierende Potential der Kinase in NIH 3T3 Fibroblasten getestet. Es stellte sich bei diesen Experimenten heraus, dass MLK3 NIH 3T3 Fibroblasten transformiert und zusätzlich wachsen MLK3 transformierte Zellen Verankerungs-unabhängig in Soft Agar (Abb. 4.14 und Abb. 4.15). Vergleicht man jedoch das transformierende Potential oder die Fähigkeit Kolonien in Soft Agar zu bilden von MLK3 mit v-Raf, so kann MLK3 nur als ein schwaches Onkogen bezeichnet werden. Erstens dauert es ca. 3 Wochen bis konfluente MLK3 überexprimierende Fibroblasten deutlich sichtbar transformiert sind (Abb. 4.15), im Gegensatz zu nur 7-10 Tagen bei den Onkogenen v-Raf oder MEK1 LIDEMANE (Daten nicht gezeigt). Dies deutet bereits auf die Notwendigkeit für zusätzliche Ereignisse hin. Zweitens sind MLK3-exprimierende Kolonien die aus den Soft Agar Experimenten isoliert wurden, um etwa den Faktor 10 kleiner, als Kolonien die v-Raf überexprimieren, was auf ein verlangsamtes Wachstum dieser klonalen Zelllinien hindeutet. Bei der Analyse der aktivierten MAPK Signalwege in MLK3 transformierten Zellen stellte sich dann aber ebenfalls heraus, dass, obwohl MEK1/2 in den hochexprimierenden klonalen MLK3 Zelllinien stark phosphoryliert vorliegt, keine ERK Aktivierung im Vergleich zur Vektorkontrolle zu detektieren ist (Abb. 4.16). Dies korreliert mit den vorher diskutierten Daten, die eine von ERK Phosphorylierung entkoppelte MEK Phosphorylierung vorschlagen. Der JNK/SAPK Signalweg ist dagegen in den gleichen Zellen, hier gemessen an der Phosphorylierung des AP-1 Faktors c-Jun, stark aktiviert. Diese Analysen in einem dritten Zellsystem belegen wiederum, dass überexprimierte MLK3 zwar zu einer JNK/SAPK Aktivierung führt, aber nicht zu einer ERK Aktivierung. Um die Signalwege zu ermitteln, die für MLK3 induzierte Transformation verantwortlich sind, wurde in einer ersten Analyse der Effekt von zwei MEK1/2 spezifischen Inhibitoren auf die Morphologie von MLK3- und v-Raf-transformierten Fibroblasten untersucht. Überexpression von aktiver MEK ist ausreichend, um NIH 3T3 Fibroblasten zu transformieren (Cowley et al. 1994; Mansour et al. 1994). Für zwei synthetische Inhibitoren (PD 098059) (Dudley et al. 1995) und (UO126) (Favata et al. 1998) konnte gezeigt werden, dass sie Raf- und Ras-induzierte Transformation blockieren. Für beide Inhibitoren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie auch die Morphologie von MLK3-transformierten Fibroblasten partiell revertieren können, während dieser Effekt bei v-Raf deutlicher zu beobachten war (Abb. 4.17A). Die Revertierung der v-Raf transformierten Fibroblasten korreliert mit einer blockierten ERK Aktivierung (Abb. 4.17B), doch die partielle Revertierung in der Morphologie der MLK3 transformierten Zellen läßt sich so nicht erklären. Zwar ist auch in diesem Fall in den mit dem Inhibitor behandelten Zellen weniger aktiviertes ERK als in der Kontrolle vorhanden (Abb. 4.17B), doch hierbei handelt es sich um eine Inhibierung basaler ERK Aktivität, denn ERK Aktivität ist im Vergleich zur Vektorkontrolle gar nicht erhöht (Abb. 4.16). Eine Erklärung für den revertierenden Effekt wäre, dass Aufrechterhaltung einer basalen ERK Aktivität für MLK3 Transformation zwar nötig ist, aber keine direkte Rolle bei der Generierung des transformierten Phänotyps im Soft Agar spielt. Ein Hinweis hierauf ist

die Tatsache, dass hochexprimierende MLK3 NIH 3T3 Zellen nur über das Soft Agar Klonieren gewonnen wurden, während transfizierte NIH 3T3 Fibroblasten nur geringe Mengen an exogenem MLK3 überexprimieren. Dies deutet darauf hin, dass unter Bedingungen, in denen nicht auf Verankerungs-unabhängiges Wachstum selektioniert wurde, gegen hohe MLK3 Überexpression selektioniert wird, was erneut gegen einen aktivierenden Effekt von MLK3 auf ERK hindeutet, denn dies würde MLK3 Überexpression im Zellwachstum begünstigen. Neben dieser Erklärung würde auch ein unspezifischer Effekt des Inhibitors auf andere Signalkaskaden den revertierenden Effekt erklären. Ein alternatives MEK Substrat neben ERK, welches eine Rolle in der Transformation spielt, ist dagegen eher unwahrscheinlich, denn die starke Akkumulation von MEK1/2 Phosphorylierung, die mit dem phospho Serin 217/221 Antikörper in den transformierten klonalen Zelllinien detektiert wurde (Abb. 4.16), deutet eher darauf hin, dass MEK kein geeignetes Substrat vorliegt. Um weiter zu analysieren, welche für Zelltransformation wichtige Signalwege durch MLK3 aktiviert werden, wurde MLK3 mit aktiviertem MEK in NIH 3T3 Zellen koexprimiert und auf einen Synergismus im transformierenden Potential hin analysiert. Kooperierende Onkogene haben einen synergistischen Effekt im Prozess der Zelltransformation (Blasi et al. 1985; Rapp et al. 1985). Zusätzlich konnte für die schwach transformierenden MLK3 Aktivatoren Cdc42 und Rac1 gezeigt werden, dass sie mit schwach aktiviertem Raf in der Zelltransformation kooperieren (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997; Zohn et al. 1998). Der oben vorgestellte Ansatz wurde gewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass MLK3 MEK1 LIDEMANE Aktivität nicht modulieren kann und daher ein Einfluß von MLK3 auf den ERK Signalweg ausgeschlossen werden konnte (Abb. 4.9). In unterschiedlichen Experimentansätzen konnte deutlich gezeigt werden, dass MLK3 einen starken synergistischen Effekt auf das transformierende Potential von aktivierter MEK ausübt (4.18). Diese Daten liefern einen eindeutigen Hinweis darauf, dass MLK3 einen ERK-unabhängigen für Zelltransformation wichtigen Signalweg aktiviert. MLK3 Überexpression führt zu einer starken Aktivierung des JNK/SAPK Signalwegs in allen analysierten Zellsystemen (Abb. 4.13 und Abb. 4.16.). *Ha-ras* induzierte Transformation von Maus Fibroblasten benötigt *c-Jun* Expression (Johnson et al. 1996) und *c-jun* kooperiert mit *Ha-ras* in REF Transformation (Schutte et al. 1989a; Schutte et al. 1989b), wobei Expression von onkogenem *Ha-ras* zur Aktivierung von ERK und JNK/SAPK führt, welches somit zur verstärkten transkriptionellen Aktivität von Fos Proteinen durch ERK und N-terminaler *c-Jun* Phosphorylierung durch JNK/SAPK führt (Karin 1995). Diese Daten deuten auf eine wichtige Rolle des JNK/SAPK Signalweges und damit verbundener Aktivierung von AP-1 Faktoren im Prozess der Zelltransformation (siehe Einl. Kap. 2.4). Eine Erklärung des synergistischen Effekts von MLK3 und aktivierter MEK wäre somit durch Aktivierung von ERK durch MEK und Induzierung von *c-Jun* Expression durch MLK3 gegeben. Zusätzlich inhibierte Überexpression von Kinase inaktiver MLK3 Transformation durch aktivierter MEK1 (Abb. 4.18). Es konnte hiermit übereinstimmend wie schon für C-Raf gezeigt werden, dass es ebenso wie Ras *c-Jun* zur Transformation benötigt (Rapp et al. 1994), obwohl weder Raf noch MEK direkt JNK/SAPK aktivieren können (Troppmair et al. 1998). Alleinige Überexpression von *c-Jun* transformiert Rat1a Fibroblasten (Schutte et al. 1989a), nicht aber NIH 3T3 Fibroblasten. Da klonale MLK3 Zelllinien aber morphologisch transformiert sind, müssen andere Faktoren neben *c-Jun* noch eine Rolle spielen. So konnte interessanterweise für NIH 3T3 Zellen gezeigt werden, dass *c-Jun* in

Kombination mit Fra-1 Zelltransformation auslöst (Mechta et al. 1997). Aus diesem Grund wurden die hochexprimierenden MLK3 Klone auf ihre Fähigkeit, andere AP-1 Faktoren neben c-Jun zu aktivieren, analysiert. In Abb. 4.19A ist das Potential gehungerter und Serum stimulierter Zelllinien verglichen, Expression und damit die Aktivität von Mitgliedern der Jun Familie zu modulieren. Während die Transaktivierung von c-Jun stark von JNK/SAPK Aktivität ist (Binetruy et al. 1991), sind hiervon sowohl JunB als auch JunD weniger stark abhängig (Kallunki et al. 1996). Die Daten in Abb 4.19A zeigen, dass neben c-Jun auch JunD in MLK3 transformierten Zellen exprimiert ist, während keinerlei JunB Expression in gehungerten Zellen zu beobachten ist. Serum-stimulierte JunB Expression dagegen ist in MLK3 transformierten Zellen im Gegensatz zu c-Jun und JunD blockiert. Während c-Jun und in einigen Zellsystemen auch JunD einen positiven Einfluß auf Zellwachstum haben, konnte JunB als ein negativer Regulator von Zellproliferation identifiziert werden (Shaulian and Karin 2001). So schwächt JunB z.B. das transformierende Potential von c-Jun ab (Schutte et al. 1989b). Diese Daten zeigen, dass in MLK3 transformierten Zellen c-Jun und JunD konstitutiv aktiviert sind, während die Expression eines Gegenspielers von c-Jun, JunB, inhibiert ist. Diese Inhibierung könnte für das transformierende Potential von MLK3 eine wichtige Rolle spielen. Neben Mitgliedern der Jun Familie konnte auch für ein Mitglied der Fos Familie ein leichte Aktivierung in MLK3 transformierten Zellen gezeigt werden. Fra1 ist um den Faktor 2-3 in den klonalen MLK3 Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle überexprimiert (Daten nicht gezeigt). Da Fra1 in Kombination mit c-Jun NIH 3T3 Zellen transformiert (Mechta et al. 1997), könnte die starke Transaktivierung von c-Jun und JunD zusammen mit einer leichten Aktivierung von Fra1 eine Erklärung für das transformierende Potential von MLK3 sein. Nachdem hochexprimierende MLK3 Fibroblasten Serum induzierte JunB Expression blockieren (Abb. 4.19A), wurde in einer zusätzlichen Analyse untersucht, ob in diesen Zellen Wachstumsfaktor induzierte ERK Aktivierung blockiert ist. Überraschenderweise ist in MLK3 transformierten NIH 3T3 Zellen Serum und TPA induzierte ERK1/2 Aktivierung partiell blockiert. Die beobachtete Inhibierung ist dabei um so größer, je stärker MLK3 überexprimiert und MEK1/2 hyperphosphoryliert in der Zelle vorliegt (Abb. 4.19B und Abb. 4.16). Dieser beobachtete Effekt legte jetzt die Vermutung nahe, dass MLK3 MEK1/2 nicht nur von ERK Aktivierung entkoppelt, sondern auch Wachstumsfaktor-induzierte ERK Aktivierung blockiert. Um diese Daten in einem anderen Zellsystem zu bestätigen wurden MLK3 transient transfizierte HeLa Zellen mit Serum stimuliert und MEK1/2 auf ihre Fähigkeit analysiert, ERK2 *in vitro* zu phosphorylieren. In diesem Zellsystem stellte sich heraus, dass MLK3 im Gegensatz zu Raf-BXB Überexpression weder im Fall von endogener MEK1 noch MEK2 diese im Bezug auf ERK Aktivierung stimuliert, wie dies auch für HEK 293 Zellen bereits gezeigt wurde (Abb 4.11). Serum induzierte MEK2 Aktivierung ist in MLK3 transfizierten HeLa Zellen komplett blockiert, während dies für MEK1 nicht beobachtet werden konnte. Diese Daten korrelieren mit den Analysen in HeLa Zellen, in denen nach Stimulation mit Zytokinen nur eine von ERK entkoppelte MEK2 Hyperphosphorylierung aufgetreten war (Abb. 4.12). Diese Analysen müssen jedoch auf andere Zellsysteme übertragen werden, um eine spezifische Wachstumsfaktor-induzierte MEK2 Entkoppelung durch MLK3 oder anderen Kinasen nach Stress Stimulation zu belegen. Sie würden aber erklären, warum Wachstumsfaktor-induzierte ERK1/2 Aktivierung in MLK3 transformierten NIH 3T3 Zellen nur partiell blockiert ist,

wenn MLK3 nur auf MEK2 einen negativen Einfluß hat. Diese Erklärungsmöglichkeit könnte auch die starke Blockierung von JunB Expression nach Serum Stimulation erklären, wenn diese hauptsächlich durch einen MEK2 abhängigen Signalweg reguliert werden würde. Bisherige Analysen gehen allerdings in den meisten Fällen davon aus, dass MEK1 und 2 sowie ERK1 und 2 funktionell äquivalent sind. Wenige Ausnahmen hiervon sind bisher beschrieben wurden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Ras aktiviertes C-Raf präferentiell mit MEK1 interagiert und dieses aktiviert (Jelinek et al. 1994). Frühe Expressionsanalysen in Mäusen hatten zudem nahegelegt, dass MEK2 der hauptsächliche ERK1/2 Aktivator während der Entwicklung ist und MEK1 dagegen eine Hauptfunktion bei der Wachstumskontrolle in erwachsenen Tieren spielt (Alessandrini et al. 1997). Diese Daten belegen, dass unter bestimmten Umständen beide MEK Isoformen unterschiedlich reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit haben wir gezeigt, dass MLK3 MEK1/2 an den für die Aktivierung wichtigen Serinen phosphoryliert und dieses auch zur starken Aktivierung von überexprimierter MEK *in vitro* wie auch *in vivo* führte. Im Gegensatz dazu führte MLK3 nicht zu einer Aktivierung von endogener ERK1/2 in mehreren Zellsystemen, obwohl endogene MEK1/2 stark phosphoryliert vorlag. Zusätzlich korrelierte eine MLK3-vermittelte MEK Hyperphosphorylierung mit einer Blockierung von Wachstumsfaktor-induzierten ERK1/2 Aktivierung. Um die beobachteten Daten zu erklären, postulieren wir, dass MLK3 MEK Isoformen nach ihrer Phosphorylierung in einen Proteinkomplex überführen, der weder *in vitro* noch *in vivo* eine Signalweiterleitung zuläßt, die zu einer ERK Phosphorylierung führt.

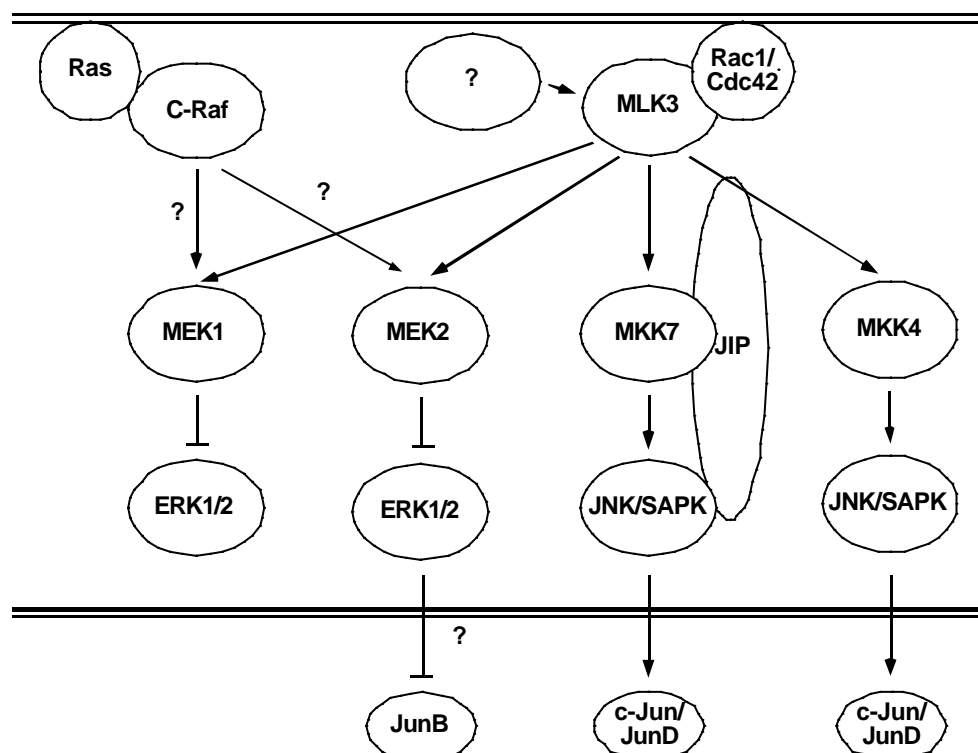


Abb. 5.1: Modell der von MLK3 regulierten MAPK Signalwege. Eine ausführliche Beschreibung findet sich im Text.

Alle Komponenten des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges interagieren miteinander. Dennoch vertraut die Zelle nicht alleine auf die Affinität der Proteine untereinander. So gewährleisten

Gerüstproteine (scaffolds) Spezifität der Signaltransduktionswege in Hefen (Schaeffer and Weber 1999). Auf der Suche nach Homologen in höheren Organismen konnte mit KSR (kinase suppressor of Ras) ein Kandidat für ein scaffold der ERK Kaskade identifiziert werden. KSR wurde von drei Gruppen unabhängig voneinander in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* als ein Genprodukt identifiziert, welches den Phänotyp von aktiviertem Ras unterdrücken kann (Downward 1995). Obwohl sowohl für C-Raf wie auch für ERK gezeigt werden konnte, dass sie an KSR binden (Michaud et al. 1997; Denouel-Galy et al. 1998; Yu et al. 1998), scheinen MEKs die hauptsächlichen Bindepartner zu sein. MEKs binden an die Kinasedomäne von KSR, die eine dominant negative Funktion, wahrscheinlich durch abkapseln von MEKs, ausüben (Michaud et al. 1997; Joneson et al. 1998). Biochemische Analysen von KSR Bindeproteinen zeigten, dass neben MEK1/2 noch Hsp90, Hsp70, Cdc37 und 14-3-3 Proteine assoziiert sind (Stewart et al. 1999) und einen Proteinkomplex bilden. Überexpression von KSR blockiert Wachstumsfaktor-induzierte ERK Aktivierung (Joneson et al. 1998) und als physiologische Funktion wurde ein Bereitstellen von MEKs für unterschiedliche Aktivatoren vorgeschlagen. Nachdem MLK3 Überexpression ähnliche Effekte erzielt wie für KSR beschrieben, könnte eine Erklärungsmöglichkeit sein, dass MLK3-induzierte MEK Phosphorylierung einen Zugang von ERK1/2 zu den aktivierten MEKs blockiert. Ebenso wäre es denkbar, dass MEK1/2 nach MLK3 Phosphorylierung einen spezifischen Inhibitor bindet, der MEK-ERK Interaktionen blockiert. Erste Vorversuche haben bereits gezeigt, dass immunpräzipitierte endogene MEKs, die durch C-Raf oder MLK3 phosphoryliert waren, mit mehreren Proteinen assoziiert sind. Nach Optimierung dieses Verfahrens soll dann nach Unterschieden bei den MEK1/2 Bindepartnern geschaut werden. Zusätzlich könnte man auch versuchen, einen etwaigen Inhibitor im MEK Präzipitat durch unterschiedliche Waschbedingungen zu entfernen.

Die hier vorgestellten Daten schlagen ein neues Bild der 'cross cascade' Kommunikation vor. Während man bislang davon ausging, dass Kinasen gleichzeitig mehrere MAPK Kaskaden aktivieren können, demonstrieren unsere Analysen eine Aktivierung des einen bei einer gleichzeitigen Entkoppelung eines anderen MAPK Signalwegs.

6. Literaturangaben

- Adams, R.H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Panelli, A. Valladares, L. Perez, R. Klein, and A.R. Nebreda. 2000. *Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. Mol Cell* **6**: 109-16.
- Adler, V., A. Polotskaya, F. Wagner, and A.S. Kraft. 1992. *Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. J Biol Chem* **267**: 17001-5.
- Alessandrini, A., B.K. Brott, and R.L. Erikson. 1997. *Differential expression of MEK1 and MEK2 during mouse development. Cell Growth Differ* **8**: 505-11.
- Alessi, D.R., A. Cuenda, P. Cohen, D.T. Dudley, and A.R. Saltiel. 1995. *PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. J Biol Chem* **270**: 27489-94.
- Alessi, D.R., Y. Saito, D.G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C.J. Marshall, and S. Cowley. 1994. *Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. Embo J* **13**: 1610-9.
- Andersson, S., D.L. Davis, H. Dahlback, H. Jornvall, and D.W. Russell. 1989. *Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. J Biol Chem* **264**: 8222-9.
- Angel, P. and M. Karin. 1991. *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-57.
- Antonyak, M.A., D.K. Moscatello, and A.J. Wong. 1998. *Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase by a mutant epidermal growth factor receptor. J Biol Chem* **273**: 2817-22.
- Aronheim, A., D. Engelberg, N. Li, N. al-Alawi, J. Schlessinger, and M. Karin. 1994. *Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. Cell* **78**: 949-61.
- Aspenstrom, P., U. Lindberg, and A. Hall. 1996. *Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. Curr Biol* **6**: 70-5.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1997. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc
- Avruch, J., X.F. Zhang, and J.M. Kyriakis. 1994. *Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. Trends Biochem Sci* **19**: 279-83.
- Bagrodia, S., B. Derijard, R.J. Davis, and R.A. Cerione. 1995a. *Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. J Biol Chem* **270**: 27995-8.
- Bagrodia, S., S.J. Taylor, C.L. Creasy, J. Chernoff, and R.A. Cerione. 1995b. *Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. J Biol Chem* **270**: 22731-7.
- Baichwal, V.R. and P.A. Baeuerle. 1997. *Activate NF-kappa B or die? Curr Biol* **7**: R94-6.
- Baldwin, A.S., Jr. 1996. *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol* **14**: 649-83.
- Behrens, A., W. Jochum, M. Sibilica, and E.F. Wagner. 2000. *Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. Oncogene* **19**: 2657-63.
- Berberich, I., G. Shu, F. Siebelt, J.R. Woodgett, J.M. Kyriakis, and E.A. Clark. 1996. *Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. Embo J* **15**: 92-101.
- Bhatt, R.R. and J.E. Ferrell, Jr. 1999. *The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytosolic factor activity. Science* **286**: 1362-5.
- Binetruy, B., T. Smeal, and M. Karin. 1991. *Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. Nature* **351**: 122-7.
- Bishop, J.M. 1987. *The molecular genetics of cancer. Science* **235**: 305-11.
- Blank, J.L., P. Gerwins, E.M. Elliott, S. Sather, and G.L. Johnson. 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**: 5361-8.

- Blasi, E., B.J. Mathieson, L. Varesio, J.L. Cleveland, P.A. Borchert, and U.R. Rapp. 1985. *Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a raf/myc recombinant murine retrovirus. Nature* **318**: 667-70.
- Bock, B.C., P.O. Vacratsis, E. Qamirani, and K.A. Gallo. 2000. *Cdc42-induced activation of the mixed-lineage kinase SPRK in vivo. Requirement of the Cdc42/Rac interactive binding motif and changes in phosphorylation. J Biol Chem* **275**: 14231-41.
- Boettner, B. and L. Van Aelst. 1999. *Rac and Cdc42 effectors. Prog Mol Subcell Biol* **22**: 135-58.
- Boguski, M.S. and F. McCormick. 1993. *Proteins regulating Ras and its relatives. Nature* **366**: 643-54.
- Bos, J.L. 1989. *ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res* **49**: 4682-9.
- Bos, J.L. 1998. *All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. Embo J* **17**: 6776-82.
- Bos, T.J., F.S. Monteclaro, F. Mitsunobu, A.R. Ball, Jr., C.H. Chang, T. Nishimura, and P.K. Vogt. 1990. *Efficient transformation of chicken embryo fibroblasts by c-Jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. Genes Dev* **4**: 1677-87.
- Bost, F., R. McKay, M. Bost, O. Potapova, N.M. Dean, and D. Mercola. 1999. *The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. Mol Cell Biol* **19**: 1938-49.
- Bost, F., R. McKay, N. Dean, and D. Mercola. 1997. *The JUN kinase/stress-activated protein kinase pathway is required for epidermal growth factor stimulation of growth of human A549 lung carcinoma cells. J Biol Chem* **272**: 33422-9.
- Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick. 1991. *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature* **349**: 117-27.
- Bradford, M.M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Bravo, R. 1990. *Growth factor-responsive genes in fibroblasts. Cell Growth Differ* **1**: 305-9.
- Bruder, J.T., G. Heidecker, and U.R. Rapp. 1992. *Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. Genes Dev* **6**: 545-56.
- Buday, L. and J. Downward. 1993. *Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. Cell* **73**: 611-20.
- Burbelo, P.D., D. Drechsel, and A. Hall. 1995. *A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. J Biol Chem* **270**: 29071-4.
- Campbell, S.L., R. Khosravi-Far, K.L. Rossman, G.J. Clark, and C.J. Der. 1998. *Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene* **17**: 1395-413.
- Camps, M., A. Nichols, and S. Arkininstall. 2000. *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. Faseb J* **14**: 6-16.
- Casanova, E., C. Garate, S. Ovalle, P. Calvo, and M.A. Chinchetru. 1996. *Identification of four splice variants of the mouse stress-activated protein kinase JNK/SAPK alpha-isoform. Neuroreport* **7**: 1320-4.
- Cavigelli, M., W.W. Li, A. Lin, B. Su, K. Yoshioka, and M. Karin. 1996. *The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. Embo J* **15**: 6269-79.
- Chan, A.M., S. Takai, K. Yamada, and T. Miki. 1996. *Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning. Oncogene* **12**: 1259-66.
- Chen, Y.R. and T.H. Tan. 2000. *The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). Int J Oncol* **16**: 651-62.
- Chen, Z., M. Hutchison, and M.H. Cobb. 1999. *Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase binding domain. J Biol Chem* **274**: 28803-7.
- Chou, M.M. and H. Hanafusa. 1995. *A novel ligand for SH3 domains. The Nck adaptor protein binds to a serine/threonine kinase via an SH3 domain. J Biol Chem* **270**: 7359-64.
- Clark, G.J., J.K. Westwick, and C.J. Der. 1997. *p120 GAP modulates Ras activation of Jun kinases and transformation. J Biol Chem* **272**: 1677-81.

- Coso, O.A., M. Chiariello, J.C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J.S. Gutkind. 1995. *The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. Cell* **81**: 1137-46.
- Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C.J. Marshall. 1994. *Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. Cell* **77**: 841-52.
- Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, H.W. Fries, J. Troppmair, and U.R. Rapp. 1994. *The ins and outs of Raf kinases. Trends Biochem Sci* **19**: 474-80.
- Denouel-Galy, A., E.M. Douville, P.H. Warne, C. Papin, D. Laugier, G. Calothy, J. Downward, and A. Eychene. 1998. *Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. Curr Biol* **8**: 46-55.
- Derijard, B., M. Hibi, I.H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R.J. Davis. 1994. *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell* **76**: 1025-37.
- Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I.H. Wu, J. Han, R.J. Ulevitch, and R.J. Davis. 1995. *Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. Science* **267**: 682-5.
- Dickens, M., J.S. Rogers, J. Cavanagh, A. Raitano, Z. Xia, J.R. Halpern, M.E. Greenberg, C.L. Sawyers, and R.J. Davis. 1997. *A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. Science* **277**: 693-6.
- DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, and M. Karin. 1997. *A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. Nature* **388**: 548-54.
- Diener, K., X.S. Wang, C. Chen, C.F. Meyer, G. Keesler, M. Zukowski, T.H. Tan, and Z. Yao. 1997. *Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9687-92.
- Dong, C., D.D. Yang, C. Tournier, A.J. Whitmarsh, J. Xu, R.J. Davis, and R.A. Flavell. 2000. *JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. Nature* **405**: 91-4.
- Dorn, P., L. DaSilva, L. Martarano, and D. Derse. 1990. *Equine infectious anemia virus tat: insights into the structure, function, and evolution of lentivirus trans-activator proteins. J Virol* **64**: 1616-24.
- Dorow, D.S., L. Devereux, E. Dietzsch, and T. De Kretser. 1993. *Identification of a new family of human epithelial protein kinases containing two leucine/isoleucine-zipper domains. Eur J Biochem* **213**: 701-10.
- Dorow, D.S., L. Devereux, G.F. Tu, G. Price, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, and R.J. Simpson. 1995. *Complete nucleotide sequence, expression, and chromosomal localisation of human mixed-lineage kinase 2. Eur J Biochem* **234**: 492-500.
- Downward, J. 1995. *KSR: a novel player in the RAS pathway. Cell* **83**: 831-4.
- Dudley, D.T., L. Pang, S.J. Decker, A.J. Bridges, and A.R. Saltiel. 1995. *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7686-9.
- Egan, S.E. and R.A. Weinberg. 1993. *The pathway to signal achievement. Nature* **365**: 781-3.
- English, J., G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu, and M.H. Cobb. 1999. *New insights into the control of MAP kinase pathways. Exp Cell Res* **253**: 255-70.
- Enslin, H., D.M. Brancho, and R.J. Davis. 2000. *Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. Embo J* **19**: 1301-11.
- Ezoe, K., S.T. Lee, K.M. Strunk, and R.A. Spritz. 1994. *PTK1, a novel protein kinase required for proliferation of human melanocytes. Oncogene* **9**: 935-8.
- Favata, M.F., K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. Van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, and J.M. Trzaskos. 1998. *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem* **273**: 18623-32.
- Freshney, N.W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala. 1994. *Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. Cell* **78**: 1039-49.
- Fritz, G., I. Just, and B. Kaina. 1999. *Rho GTPases are over-expressed in human tumors. Int J Cancer* **81**: 682-7.
- Frost, J.A., H. Steen, P. Shapiro, T. Lewis, N. Ahn, P.E. Shaw, and M.H. Cobb. 1997. *Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. Embo J* **16**: 6426-38.

- Gallo, K.A., M.R. Mark, D.T. Scadden, Z. Wang, Q. Gu, and P.J. Godowski. 1994. *Identification and characterization of SPRK, a novel src-homology 3 domain-containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity.* *J Biol Chem* **269**: 15092-100.
- Ganiatsas, S., L. Kwee, Y. Fujiwara, A. Perkins, T. Ikeda, M.A. Labow, and L.I. Zon. 1998. *SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6881-6.
- Garay, M., W. Gaarde, B.P. Monia, P. Nero, and C.L. Cioffi. 2000. *Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by an antisense oligonucleotide targeted to JNK1 in human kidney cells.* *Biochem Pharmacol* **59**: 1033-43.
- Gerwins, P., J.L. Blank, and G.L. Johnson. 1997. *Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway.* *J Biol Chem* **272**: 8288-95.
- Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, and P. Cohen. 1997. *Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases.* *Embo J* **16**: 3563-71.
- Graves, J.D., Y. Gotoh, K.E. Draves, D. Ambrose, D.K. Han, M. Wright, J. Chernoff, E.A. Clark, and E.G. Krebs. 1998. *Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1.* *Embo J* **17**: 2224-34.
- Graves, L.M., H.I. Guy, P. Kozlowski, M. Huang, E. Lazarowski, R.M. Pope, M.A. Collins, E.N. Dahlstrand, H.S. Earp, 3rd, and D.R. Evans. 2000. *Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase.* *Nature* **403**: 328-32.
- Gross, S.D., M.S. Schwab, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 1999. *Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by the protein kinase p90Rsk.* *Science* **286**: 1365-7.
- Gupta, S., T. Barrett, A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H.K. Sluss, B. Derijard, and R.J. Davis. 1996. *Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors.* *Embo J* **15**: 2760-70.
- Guttridge, D.C., C. Albanese, J.Y. Reuther, R.G. Pestell, and A.S. Baldwin, Jr. 1999. *NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1.* *Mol Cell Biol* **19**: 5785-99.
- Hagemann, C. and U.R. Rapp. 1999. *Isotype-specific functions of Raf kinases.* *Exp Cell Res* **253**: 34-46.
- Hagemann, D., J. Troppmair, and U.R. Rapp. 1999. *Cot protooncogene protein activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells.* *Oncogene* **18**: 1391-400.
- Hakem, R., A. Hakem, G.S. Duncan, J.T. Henderson, M. Woo, M.S. Soengas, A. Elia, J.L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S.A. Kaufman, S.W. Lowe, J.M. Penninger, and T.W. Mak. 1998. *Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo.* *Cell* **94**: 339-52.
- Hall, A. 1994. *A biochemical function for ras--at last.* *Science* **264**: 1413-4.
- Hall, A. 1998. *Rho GTPases and the actin cytoskeleton.* *Science* **279**: 509-14.
- Han, J., J.D. Lee, L. Bibbs, and R.J. Ulevitch. 1994. *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.* *Science* **265**: 808-11.
- Han, J., J.D. Lee, Y. Jiang, Z. Li, L. Feng, and R.J. Ulevitch. 1996. *Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6).* *J Biol Chem* **271**: 2886-91.
- Hartkamp, J., J. Troppmair, and U.R. Rapp. 1999. *The JNK/SAPK activator mixed lineage kinase 3 (MLK3) transforms NIH 3T3 cells in a MEK-dependent fashion.* *Cancer Res* **59**: 2195-202.
- Hehner, S.P., T.G. Hofmann, A. Ushmorov, O. Dienz, I. Wing-Lan Leung, N. Lassam, C. Scheidereit, W. Droge, and M.L. Schmitz. 2000. *Mixed-lineage kinase 3 delivers CD3/CD28-derived signals into the IkkappaB kinase complex.* *Mol Cell Biol* **20**: 2556-68.
- Heidecker, G., W. Kolch, D.K. Morrison, and U.R. Rapp. 1992. *The role of Raf-1 phosphorylation in signal transduction.* *Adv Cancer Res* **58**: 53-73.
- Heldin, C.H. 1995. *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction.* *Cell* **80**: 213-23.
- Herskowitz, I. 1995. *MAP kinase pathways in yeast: for mating and more.* *Cell* **80**: 187-97.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin. 1993. *Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain.* *Genes Dev* **7**: 2135-48.

- Hilberg, F., A. Aguzzi, N. Howells, and E.F. Wagner. 1993. *c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. Nature* **365**: 179-81.
- Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman. 1995. *The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. Cell* **81**: 1159-70.
- Hinz, M., D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, and M. Strauss. 1999. *NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. Mol Cell Biol* **19**: 2690-8.
- Hirai, S., M. Izawa, S. Osada, G. Spyrou, and S. Ohno. 1996. *Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. Oncogene* **12**: 641-50.
- Hirai, S., M. Katoh, M. Terada, J.M. Kyriakis, L.I. Zon, A. Rana, J. Avruch, and S. Ohno. 1997. *MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. J Biol Chem* **272**: 15167-73.
- Ho, F.M., S.H. Liu, C.S. Liau, P.J. Huang, and S.Y. Lin-Shiau. 2000. *High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. Circulation* **101**: 2618-24.
- Hoffmeyer, A., A. Avots, E. Flory, C.K. Weber, E. Serfling, and U.R. Rapp. 1998. *The GABP-responsive element of the interleukin-2 enhancer is regulated by JNK/SAPK-activating pathways in T lymphocytes. J Biol Chem* **273**: 10112-9.
- Holland, P.M., M. Suzanne, J.S. Campbell, S. Noselli, and J.A. Cooper. 1997. *MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. J Biol Chem* **272**: 24994-8.
- Holzman, L.B., S.E. Merritt, and G. Fan. 1994. *Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. J Biol Chem* **269**: 30808-17.
- Horii, Y., J.F. Beeler, K. Sakaguchi, M. Tachibana, and T. Miki. 1994. *A novel oncogene, ost, encodes a guanine nucleotide exchange factor that potentially links Rho and Rac signaling pathways. Embo J* **13**: 4776-86.
- Howe, L.R., S.J. Leever, N. Gomez, S. Nakielnny, P. Cohen, and C.J. Marshall. 1992. *Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. Cell* **71**: 335-42.
- Hu, M.C., W.R. Qiu, X. Wang, C.F. Meyer, and T.H. Tan. 1996. *Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade. Genes Dev* **10**: 2251-64.
- Huang, W. and R.L. Erikson. 1994. *Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8960-3.
- Hunter, T. 1995. *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell* **80**: 225-36.
- Hutchison, M., K.S. Berman, and M.H. Cobb. 1998. *Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. J Biol Chem* **273**: 28625-32.
- Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono, and Y. Gotoh. 1997. *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. Science* **275**: 90-4.
- Ing, Y.L., I.W. Leung, H.H. Heng, L.C. Tsui, and N.J. Lassam. 1994. *MLK-3: identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain. Oncogene* **9**: 1745-50.
- Ip, Y.T. and R.J. Davis. 1998. *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol* **10**: 205-19.
- Jelinek, T., A.D. Catling, C.W. Reuter, S.A. Moodie, A. Wolfman, and M.J. Weber. 1994. *RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. Mol Cell Biol* **14**: 8212-8.
- Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J.A. Gegner, S. Lin, and J. Han. 1996. *Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). J Biol Chem* **271**: 17920-6.
- Johnson, R., B. Spiegelman, D. Hanahan, and R. Wisdom. 1996. *Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. Mol Cell Biol* **16**: 4504-11.

- Joneson, T., J.A. Fulton, D.J. Volle, O.V. Chaika, D. Bar-Sagi, and R.E. Lewis. 1998. *Kinase suppressor of Ras inhibits the activation of extracellular ligand-regulated (ERK) mitogen-activated protein (MAP) kinase by growth factors, activated Ras, and Ras effectors.* *J Biol Chem* **273**: 7743-8.
- Joneson, T., M.A. White, M.H. Wigler, and D. Bar-Sagi. 1996. *Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of RAS.* *Science* **271**: 810-2.
- Kallunki, T., T. Deng, M. Hibi, and M. Karin. 1996. *c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions.* *Cell* **87**: 929-39.
- Kallunki, T., B. Su, I. Tsigelny, H.K. Sluss, B. Derijard, G. Moore, R. Davis, and M. Karin. 1994. *JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation.* *Genes Dev* **8**: 2996-3007.
- Karin, M. 1995. *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.* *J Biol Chem* **270**: 16483-6.
- Karin, M. and M. Delhase. 1998. *JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action?* *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9067-9.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. *AP-1 function and regulation.* *Curr Opin Cell Biol* **9**: 240-6.
- Katoh, M., M. Hirai, T. Sugimura, and M. Terada. 1995. *Cloning and characterization of MST, a novel (putative) serine/threonine kinase with SH3 domain.* *Oncogene* **10**: 1447-51.
- Katz, M.E. and F. McCormick. 1997. *Signal transduction from multiple Ras effectors.* *Curr Opin Genet Dev* **7**: 75-9.
- Kerkhoff, E. and U.R. Rapp. 1997. *Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1.* *Mol Cell Biol* **17**: 2576-86.
- Keyse, S.M. 2000. *Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling.* *Curr Opin Cell Biol* **12**: 186-92.
- Khosravi-Far, R., M. Chrzanoska-Wodnicka, P.A. Solski, A. Eva, K. Burrige, and C.J. Der. 1994. *Dbl and Vav mediate transformation via mitogen-activated protein kinase pathways that are distinct from those activated by oncogenic Ras.* *Mol Cell Biol* **14**: 6848-57.
- Khosravi-Far, R., P.A. Solski, G.J. Clark, M.S. Kinch, and C.J. Der. 1995. *Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation.* *Mol Cell Biol* **15**: 6443-53.
- King, A.J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia, and M.S. Marshall. 1998. *The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338.* *Nature* **396**: 180-3.
- Kinzler, K.W. and B. Vogelstein. 1997. *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers.* *Nature* **386**: 761, 763.
- Koide, H., T. Satoh, M. Nakafuku, and Y. Kaziro. 1993. *GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8683-6.
- Kolch, W., G. Heidecker, P. Lloyd, and U.R. Rapp. 1991. *Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells.* *Nature* **349**: 426-8.
- Kuan, C.Y., D.D. Yang, D.R. Samanta Roy, R.J. Davis, P. Rakic, and R.A. Flavell. 1999. *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development.* *Neuron* **22**: 667-76.
- Kuida, K., T.F. Haydar, C.Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M.S. Su, P. Rakic, and R.A. Flavell. 1998. *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9.* *Cell* **94**: 325-37.
- Kyriakis, J.M. 1999. *Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases.* *J Biol Chem* **274**: 5259-62.
- Kyriakis, J.M., H. App, X.F. Zhang, P. Banerjee, D.L. Brautigan, U.R. Rapp, and J. Avruch. 1992. *Raf-1 activates MAP kinase-kinase.* *Nature* **358**: 417-21.
- Kyriakis, J.M. and J. Avruch. 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**: 17355-63.

- Kyriakis, J.M. and J. Avruch. 1996. *Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. J Biol Chem* **271**: 24313-6.
- Kyriakis, J.M. and J. Avruch. 2001. *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev* **81**: 807-69.
- Kyriakis, J.M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E.A. Rubie, M.F. Ahmad, J. Avruch, and J.R. Woodgett. 1994. *The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. Nature* **369**: 156-60.
- Kyriakis, J.M., J.R. Woodgett, and J. Avruch. 1995. *The stress-activated protein kinases. A novel ERK subfamily responsive to cellular stress and inflammatory cytokines. Ann N Y Acad Sci* **766**: 303-19.
- Lamarche, N., N. Tapon, L. Stowers, P.D. Burbelo, P. Aspenstrom, T. Bridges, J. Chant, and A. Hall. 1996. *Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. Cell* **87**: 519-29.
- Land, H., L.F. Parada, and R.A. Weinberg. 1983. *Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature* **304**: 596-602.
- Lange-Carter, C.A., C.M. Pleiman, A.M. Gardner, K.J. Blumer, and G.L. Johnson. 1993. *A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. Science* **260**: 315-9.
- Lawler, S., Y. Fleming, M. Goedert, and P. Cohen. 1998. *Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. Curr Biol* **8**: 1387-90.
- Lechner, C., M.A. Zahalka, J.F. Giot, N.P. Moller, and A. Ullrich. 1996. *ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4355-9.
- Leevers, S.J. and C.J. Marshall. 1992. *Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. Embo J* **11**: 569-74.
- Leevers, S.J., H.F. Paterson, and C.J. Marshall. 1994. *Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. Nature* **369**: 411-4.
- Lenczowski, J.M., L. Dominguez, A.M. Eder, L.B. King, C.M. Zacharchuk, and J.D. Ashwell. 1997. *Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. Mol Cell Biol* **17**: 170-81.
- Leppa, S., R. Saffrich, W. Ansorge, and D. Bohmann. 1998. *Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. Embo J* **17**: 4404-13.
- Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn. 1998. *Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Li, K., Y. Li, J.M. Shelton, J.A. Richardson, E. Spencer, Z.J. Chen, X. Wang, and R.S. Williams. 2000. *Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. Cell* **101**: 389-99.
- Lin, A., A. Minden, H. Martinetto, F.X. Claret, C. Lange-Carter, F. Mercurio, G.L. Johnson, and M. Karin. 1995. *Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. Science* **268**: 286-90.
- Lin, R., S. Bagrodia, R. Cerione, and D. Manor. 1997. *A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. Curr Biol* **7**: 794-7.
- Lin, X., E.T. Cunningham, Jr., Y. Mu, R. Geleziunas, and W.C. Greene. 1999. *The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases. Immunity* **10**: 271-80.
- Lindahl, T. and R.D. Wood. 1999. *Quality control by DNA repair. Science* **286**: 1897-905.
- Liu, Z.G., H. Hsu, D.V. Goeddel, and M. Karin. 1996. *Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell* **87**: 565-76.
- Lloyd, A., N. Yancheva, and B. Wasylyk. 1991. *Transformation suppressor activity of a Jun transcription factor lacking its activation domain. Nature* **352**: 635-8.
- Ludwig, S., A. Hoffmeyer, M. Goebeler, K. Kilian, H. Hafner, B. Neufeld, J. Han, and U.R. Rapp. 1998. *The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. J Biol Chem* **273**: 1917-22.
- Madhani, H.D. and G.R. Fink. 1998. *The riddle of MAP kinase signaling specificity. Trends Genet* **14**: 151-5.
- Magnuson, N.S., T. Beck, H. Vahidi, H. Hahn, U. Smola, and U.R. Rapp. 1994. *The Raf-1 serine/threonine protein kinase. Semin Cancer Biol* **5**: 247-53.

- Malinin, N.L., M.P. Boldin, A.V. Kovalenko, and D. Wallach. 1997. *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1*. *Nature* **385**: 540-4.
- Maniatis, T. 1997. *Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex*. *Science* **278**: 818-9.
- Manser, E., T. Leung, H. Salihuddin, L. Tan, and L. Lim. 1993. *A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42*. *Nature* **363**: 364-7.
- Manser, E., T. Leung, H. Salihuddin, Z.S. Zhao, and L. Lim. 1994. *A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1*. *Nature* **367**: 40-6.
- Mansour, S.J., W.T. Matten, A.S. Hermann, J.M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G.F. Vande Woude, and N.G. Ahn. 1994. *Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase*. *Science* **265**: 966-70.
- Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman. 1993. *The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain*. *Cell* **73**: 381-93.
- Marshall, C.J. 1995. *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. *Cell* **80**: 179-85.
- Marshall, C.J. and E.A. Nigg. 1998. *Oncogenes and cell proliferation*. *Cancer genes: lessons from genetics and biochemistry*. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 11-3.
- Martin, G.A., G. Bollag, F. McCormick, and A. Abo. 1995. *A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20*. *Embo J* **14**: 1970-8.
- Matsui, N., G. Sarkar, T. Shuto, J. Marrs, J.T. Bronk, K. Mizuno, and M.E. Bolander. 1996. *Identification of a dual leucine zipper kinase involved in rat fracture repair*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 571-6.
- McCormick, F. 1993. *Signal transduction. How receptors turn Ras on*. *Nature* **363**: 15-6.
- Mechta, F., D. Lallemand, C.M. Pfarr, and M. Yaniv. 1997. *Transformation by ras modifies AP1 composition and activity*. *Oncogene* **14**: 837-47.
- Mercurio, F. and A.M. Manning. 1999. *Multiple signals converging on NF-kappaB*. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 226-32.
- Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, and A. Rao. 1997. *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. *Science* **278**: 860-6.
- Michaud, N.R., M. Therrien, A. Cacace, L.C. Edsall, S. Spiegel, G.M. Rubin, and D.K. Morrison. 1997. *KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12792-6.
- Michiels, F., G.G. Habets, J.C. Stam, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard. 1995. *A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion*. *Nature* **375**: 338-40.
- Miki, T., C.L. Smith, J.E. Long, A. Eva, and T.P. Fleming. 1993. *Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins*. *Nature* **362**: 462-5.
- Minden, A., A. Lin, F.X. Claret, A. Abo, and M. Karin. 1995. *Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs*. *Cell* **81**: 1147-57.
- Minden, A., A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis, and M. Karin. 1994. *c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases*. *Mol Cell Biol* **14**: 6683-8.
- Moodie, S.A., B.M. Willumsen, M.J. Weber, and A. Wolfman. 1993. *Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase*. *Science* **260**: 1658-61.
- Morgenstern, J.P. and H. Land. 1990. *Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line*. *Nucleic Acids Res* **18**: 3587-96.
- Moriguchi, T., H. Kawasaki, S. Matsuda, Y. Gotoh, and E. Nishida. 1995. *Evidence for multiple activators for stress-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinases. Existence of novel activators*. *J Biol Chem* **270**: 12969-72.
- Moriguchi, T., F. Toyoshima, N. Masuyama, H. Hanafusa, Y. Gotoh, and E. Nishida. 1997. *A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses*. *Embo J* **16**: 7045-53.
- Morrison, D.K. and R.E. Cutler. 1997. *The complexity of Raf-1 regulation*. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 174-9.

- Nagata, K., A. Puls, C. Futter, P. Aspenstrom, E. Schaefer, T. Nakata, N. Hirokawa, and A. Hall. 1998. *The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3*. *Embo J* **17**: 149-58.
- Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto. 1999. *The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway*. *Nature* **398**: 252-6.
- Nishina, H., C. Vaz, P. Billia, M. Nghiem, T. Sasaki, J.L. De la Pompa, K. Furlonger, C. Paige, C. Hui, K.D. Fischer, H. Kishimoto, T. Iwatsubo, T. Katada, J.R. Woodgett, and J.M. Penninger. 1999. *Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4*. *Development* **126**: 505-16.
- Nobes, C.D. and A. Hall. 1995. *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. *Cell* **81**: 53-62.
- Noselli, S. and F. Agnes. 1999. *Roles of the JNK signaling pathway in Drosophila morphogenesis*. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 466-72.
- Nur, E.K.M.S., J.M. Kamal, M.M. Qureshi, and H. Maruta. 1999. *The CDC42-specific inhibitor derived from ACK-1 blocks v-Ha-Ras-induced transformation*. *Oncogene* **18**: 7787-93.
- Olson, M.F., A. Ashworth, and A. Hall. 1995. *An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1*. *Science* **269**: 1270-2.
- Palmer, A., A.C. Gavin, and A.R. Nebreda. 1998. *A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1*. *Embo J* **17**: 5037-47.
- Payne, D.M., A.J. Rossomando, P. Martino, A.K. Erickson, J.H. Her, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, M.J. Weber, and T.W. Sturgill. 1991. *Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)*. *Embo J* **10**: 885-92.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M.H. Cobb. 2001. *Mitogen-activated protein (map) kinase pathways: regulation and physiological functions*. *Endocr Rev* **22**: 153-83.
- Plattner, R., M.J. Anderson, K.Y. Sato, C.L. Fasching, C.J. Der, and E.J. Stanbridge. 1996. *Loss of oncogenic ras expression does not correlate with loss of tumorigenicity in human cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6665-70.
- Polverino, A., J. Frost, P. Yang, M. Hutchison, A.M. Neiman, M.H. Cobb, and S. Marcus. 1995. *Activation of mitogen-activated protein kinase cascades by p21- activated protein kinases in cell-free extracts of Xenopus oocytes*. *J Biol Chem* **270**: 26067-70.
- Pombo, C.M., J.V. Bonventre, J. Avruch, J.R. Woodgett, J.M. Kyriakis, and T. Force. 1994. *The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion*. *J Biol Chem* **269**: 26546-51.
- Posas, F. and H. Saito. 1997. *Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK*. *Science* **276**: 1702-5.
- Potapova, O., M. Gorospe, R.H. Dougherty, N.M. Dean, W.A. Gaarde, and N.J. Holbrook. 2000. *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**: 1713-22.
- Prendergast, G.C., R. Khosravi-Far, P.A. Soltski, H. Kurzawa, P.F. Lebowitz, and C.J. Der. 1995. *Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras*. *Oncogene* **10**: 2289-96.
- Pulverer, B.J., J.M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J.R. Woodgett. 1991. *Phosphorylation of cjun mediated by MAP kinases*. *Nature* **353**: 670-4.
- Qiu, R.G., A. Abo, F. McCormick, and M. Symons. 1997. *Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation*. *Mol Cell Biol* **17**: 3449-58.
- Qiu, R.G., J. Chen, D. Kim, F. McCormick, and M. Symons. 1995a. *An essential role for Rac in Ras transformation*. *Nature* **374**: 457-9.
- Qiu, R.G., J. Chen, F. McCormick, and M. Symons. 1995b. *A role for Rho in Ras transformation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11781-5.

- Rana, A., K. Gallo, P. Godowski, S. Hirai, S. Ohno, L. Zon, J.M. Kyriakis, and J. Avruch. 1996. *The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1.* *J Biol Chem* **271**: 19025-8.
- Rapp, U.R., J.L. Cleveland, T.N. Fredrickson, K.L. Holmes, H.C. Morse, 3rd, H.W. Jansen, T. Patschinsky, and K. Bister. 1985. *Rapid induction of hemopoietic neoplasms in newborn mice by a raf(mil)/myc recombinant murine retrovirus.* *J Virol* **55**: 23-33.
- Rapp, U.R. and G.J. Todaro. 1978. *Generation of oncogenic type C viruses: rapidly leukemogenic viruses derived from C3H mouse cells in vivo and in vitro.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 2468-72.
- Rapp, U.R., J. Troppmair, T. Beck, and M.J. Birrer. 1994. *Transformation by Raf and other oncogenes renders cells differentially sensitive to growth inhibition by a dominant negative c-jun mutant.* *Oncogene* **9**: 3493-8.
- Reddy, U.R. and D. Pleasure. 1994. *Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain.* *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1494-5.
- Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao, and M. Rothe. 1997. *Identification and characterization of an IkappaB kinase.* *Cell* **90**: 373-83.
- Reinhard, C., B. Shamoon, V. Shyamala, and L.T. Williams. 1997. *Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2.* *Embo J* **16**: 1080-92.
- Rhodes, N., L. Connell, and B. Errede. 1990. *STE11 is a protein kinase required for cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast.* *Genes Dev* **4**: 1862-74.
- Ridley, A.J. and A. Hall. 1992. *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.* *Cell* **70**: 389-99.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.* *Cell* **70**: 401-10.
- Rizzo, M.A., K. Shome, S.C. Watkins, and G. Romero. 2000. *The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras.* *J Biol Chem* **275**: 23911-8.
- Roberts, T.M. 1992. *Cell biology. A signal chain of events.* *Nature* **360**: 534-5.
- Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A.R. Nebreda. 1994. *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.* *Cell* **78**: 1027-37.
- Roux, P., C. Gauthier-Rouviere, S. Doucet-Brutin, and P. Fort. 1997. *The small GTPases Cdc42Hs, Rac1 and RhoG delineate Raf-independent pathways that cooperate to transform NIH3T3 cells.* *Curr Biol* **7**: 629-37.
- Ruley, H.E. 1990. *Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes.* *Cancer Cells* **2**: 258-68.
- Sabapathy, K., W. Jochum, K. Hochedlinger, L. Chang, M. Karin, and E.F. Wagner. 1999. *Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2.* *Mech Dev* **89**: 115-24.
- Sakuma, H., A. Ikeda, S. Oka, Y. Kozutsumi, J.P. Zanetta, and T. Kawasaki. 1997. *Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain.* *J Biol Chem* **272**: 28622-9.
- Salmeron, A., T.B. Ahmad, G.W. Carlile, D. Pappin, R.P. Narsimhan, and S.C. Ley. 1996. *Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase.* *Embo J* **15**: 817-26.
- Sanchez, I., R.T. Hughes, B.J. Mayer, K. Yee, J.R. Woodgett, J. Avruch, J.M. Kyriakis, and L.I. Zon. 1994. *Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun.* *Nature* **372**: 794-8.
- Sambrook, J., E. F. Frisch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual, 2 Edition* (New York, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Schaeffer, H.J. and M.J. Weber. 1999. *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers.* *Mol Cell Biol* **19**: 2435-44.
- Schlessinger, J. 1993. *How receptor tyrosine kinases activate Ras.* *Trends Biochem Sci* **18**: 273-5.

- Schlessinger, J. 1994. *SH2/SH3 signaling proteins*. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 25-30.
- Schreiber, M., A. Kolbus, F. Piu, A. Szabowski, U. Mohle-Steinlein, J. Tian, M. Karin, P. Angel, and E.F. Wagner. 1999. *Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent*. *Genes Dev* **13**: 607-19.
- Schutte, J., J.D. Minna, and M.J. Birrer. 1989a. *Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2257-61.
- Schutte, J., J. Viallet, M. Nau, S. Segal, J. Fedorko, and J. Minna. 1989b. *jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun*. *Cell* **59**: 987-97.
- Sebolt-Leopold, J.S., D.T. Dudley, R. Herrera, K. Van Becelaere, A. Wiland, R.C. Gowan, H. Teclé, S.D. Barrett, A. Bridges, S. Przybranowski, W.R. Leopold, and A.R. Saltiel. 1999. *Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo*. *Nat Med* **5**: 810-6.
- Seeger, R. and E.G. Krebs. 1995. *The MAPK signaling cascade*. *Faseb J* **9**: 726-35.
- Shaulian, E. and M. Karin. 2001. *AP-1 in cell proliferation and survival*. *Oncogene* **20**: 2390-400.
- Smeal, T., B. Binetruy, D.A. Mercola, M. Birrer, and M. Karin. 1991. *Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73*. *Nature* **354**: 494-6.
- Stanbridge, E.J. 1990. *Human tumor suppressor genes*. *Annu Rev Genet* **24**: 615-57.
- Stein, B., H. Brady, M.X. Yang, D.B. Young, and M.S. Barbosa. 1996. *Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase cascade*. *J Biol Chem* **271**: 11427-33.
- Stewart, S., M. Sundaram, Y. Zhang, J. Lee, M. Han, and K.L. Guan. 1999. *Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization*. *Mol Cell Biol* **19**: 5523-34.
- Stokoe, D., S.G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons, and J.F. Hancock. 1994. *Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane*. *Science* **264**: 1463-7.
- Su, B., E. Jacinto, M. Hibi, T. Kallunki, M. Karin, and Y. Ben-Neriah. 1994. *JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes*. *Cell* **77**: 727-36.
- Su, Y.C., J. Han, S. Xu, M. Cobb, and E.Y. Skolnik. 1997. *NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain*. *Embo J* **16**: 1279-90.
- Suwa, H., G. Ohshio, T. Imamura, G. Watanabe, S. Arai, M. Imamura, S. Narumiya, H. Hiai, and M. Fukumoto. 1998. *Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas*. *Br J Cancer* **77**: 147-52.
- Symons, M. 1996. *Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond*. *Trends Biochem Sci* **21**: 178-81.
- Tamura, K., T. Sudo, U. Senftleben, A.M. Dadak, R. Johnson, and M. Karin. 2000. *Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis*. *Cell* **102**: 221-31.
- Tang, Y., J. Yu, and J. Field. 1999. *Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts*. *Mol Cell Biol* **19**: 1881-91.
- Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi, and E. Nishida. 2000. *A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators*. *Nat Cell Biol* **2**: 110-6.
- Tapon, N., K. Nagata, N. Lamarche, and A. Hall. 1998. *A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways*. *Embo J* **17**: 1395-404.
- Teramoto, H., O.A. Coso, H. Miyata, T. Igishi, T. Miki, and J.S. Gutkind. 1996. *Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family*. *J Biol Chem* **271**: 27225-8.
- Tibbles, L.A., Y.L. Ing, F. Kiefer, J. Chan, N. Iscove, J.R. Woodgett, and N.J. Lassam. 1996. *MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6*. *Embo J* **15**: 7026-35.
- Tournier, C., C. Dong, T.K. Turner, S.N. Jones, R.A. Flavell, and R.J. Davis. 2001. *MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines*. *Genes Dev* **15**: 1419-26.
- Tournier, C., P. Hess, D.D. Yang, J. Xu, T.K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S.N. Jones, R.A. Flavell, and R.J. Davis. 2000. *Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway*. *Science* **288**: 870-4.

- Tournier, C., A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R.J. Davis. 1997. *Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7337-42.
- Tournier, C., A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R.J. Davis. 1999. *The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases*. *Mol Cell Biol* **19**: 1569-81.
- Treinin, I., H.F. Paterson, S. Hooper, R. Wilson, and C.J. Marshall. 1999. *Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal to stimulate DNA synthesis*. *Mol Cell Biol* **19**: 321-9.
- Treisman, R. 1996. *Regulation of transcription by MAP kinase cascades*. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 205-15.
- Troppmair, J., J.T. Bruder, H. Munoz, P.A. Lloyd, J. Kyriakis, P. Banerjee, J. Avruch, and U.R. Rapp. 1994. *Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation*. *J Biol Chem* **269**: 7030-5.
- Troppmair, J., J. Hartkamp, and U.R. Rapp. 1998. *Activation of NF-kappa B by oncogenic Raf in HEK 293 cells occurs through autocrine recruitment of the stress kinase cascade*. *Oncogene* **17**: 685-90.
- Tung, R.M. and J. Blenis. 1997. *A novel human SPS1/STE20 homologue, KHS, activates Jun N-terminal kinase*. *Oncogene* **14**: 653-9.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger. 1990. *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. *Cell* **61**: 203-12.
- Van Aelst, L., M. Barr, S. Marcus, A. Polverino, and M. Wigler. 1993. *Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6213-7.
- Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey. 1997. *Rho GTPases and signaling networks*. *Genes Dev* **11**: 2295-322.
- van Leeuwen, F.N., R.A. van der Kammen, G.G. Habets, and J.G. Collard. 1995. *Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells*. *Oncogene* **11**: 2215-21.
- Vogt, P.K. 2001. *Jun, the oncoprotein*. *Oncogene* **20**: 2365-77.
- Vojtek, A.B., S.M. Hollenberg, and J.A. Cooper. 1993. *Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf*. *Cell* **74**: 205-14.
- Wang, X.S., K. Diener, D. Jannuzzi, D. Trollinger, T.H. Tan, H. Lichenstein, M. Zukowski, and Z. Yao. 1996. *Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase*. *J Biol Chem* **271**: 31607-11.
- Wang, X.S., K. Diener, T.H. Tan, and Z. Yao. 1998. *MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5*. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 33-7.
- Warne, P.H., P.R. Vician, and J. Downward. 1993. *Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro*. *Nature* **364**: 352-5.
- Wasserman, J.D. and M. Freeman. 1998. *An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the Drosophila egg*. *Cell* **95**: 355-64.
- Wasylyk, B., J. Hagman, and A. Gutierrez-Hartmann. 1998. *Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway*. *Trends Biochem Sci* **23**: 213-6.
- White, M.A., C. Nicolette, A. Minden, A. Polverino, L. Van Aelst, M. Karin, and M.H. Wigler. 1995. *Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation*. *Cell* **80**: 533-41.
- Whitmarsh, A.J., J. Cavanagh, C. Tournier, J. Yasuda, and R.J. Davis. 1998. *A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation*. *Science* **281**: 1671-4.
- Whitmarsh, A.J., P. Shore, A.D. Sharrocks, and R.J. Davis. 1995. *Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element*. *Science* **269**: 403-7.
- Woo, M., R. Hakem, M.S. Soengas, G.S. Duncan, A. Shahinian, D. Kagi, A. Hakem, M. McCurrach, W. Khoo, S.A. Kaufman, G. Senaldi, T. Howard, S.W. Lowe, and T.W. Mak. 1998. *Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes*. *Genes Dev* **12**: 806-19.
- Woronicz, J.D., X. Gao, Z. Cao, M. Rothe, and D.V. Goeddel. 1997. *IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK*. *Science* **278**: 866-9.
- Xia, Y., Z. Wu, B. Su, B. Murray, and M. Karin. 1998. *JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension*. *Genes Dev* **12**: 3369-81.

- Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, and M.E. Greenberg. 1995. *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science* **270**: 1326-31.
- Xu, S., D. Robbins, J. Frost, A. Dang, C. Lange-Carter, and M.H. Cobb. 1995. *MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6808-12.
- Xu, S., D.J. Robbins, L.B. Christerson, J.M. English, C.A. Vanderbilt, and M.H. Cobb. 1996. *Cloning of rat MEK kinase 1 cDNA reveals an endogenous membrane-associated 195-kDa protein with a large regulatory domain. Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5291-5.
- Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1995. *Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. Science* **270**: 2008-11.
- Yamauchi, J., Y. Kaziro, and H. Itoh. 1999. *Differential regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by signaling from G protein beta gamma subunit in human embryonal kidney 293 cells. J Biol Chem* **274**: 1957-65.
- Yan, M., T. Dai, J.C. Deak, J.M. Kyriakis, L.I. Zon, J.R. Woodgett, and D.J. Templeton. 1994. *Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. Nature* **372**: 798-800.
- Yang, D.D., C.Y. Kuan, A.J. Whitmarsh, M. Rincon, T.S. Zheng, R.J. Davis, P. Rakic, and R.A. Flavell. 1997. *Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. Nature* **389**: 865-70.
- Yao, Z., K. Diener, X.S. Wang, M. Zukowski, G. Matsumoto, G. Zhou, R. Mo, T. Sasaki, H. Nishina, C.C. Hui, T.H. Tan, J.P. Woodgett, and J.M. Penninger. 1997. *Activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal protein kinases (SAPKs/JNKs) by a novel mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem* **272**: 32378-83.
- Yao, Z., G. Zhou, X.S. Wang, A. Brown, K. Diener, H. Gan, and T.H. Tan. 1999. *A novel human STE20-related protein kinase, HGK, that specifically activates the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. J Biol Chem* **274**: 2118-25.
- Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A.M. Manning, J.S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, and Y. Ben-Neriah. 1998. *Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. Nature* **396**: 590-4.
- Yashar, B.M., C. Kelley, K. Yee, B. Errede, and L.I. Zon. 1993. *Novel members of the mitogen-activated protein kinase activator family in Xenopus laevis. Mol Cell Biol* **13**: 5738-48.
- Yasuda, J., A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, M. Sharma, and R.J. Davis. 1999. *The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. Mol Cell Biol* **19**: 7245-54.
- Yoshida, H., Y.Y. Kong, R. Yoshida, A.J. Elia, A. Hakem, R. Hakem, J.M. Penninger, and T.W. Mak. 1998. *Apafl is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell* **94**: 739-50.
- Yu, W., W.J. Fantl, G. Harrowe, and L.T. Williams. 1998. *Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. Curr Biol* **8**: 56-64.
- Yuasa, T., S. Ohno, J.H. Kehrl, and J.M. Kyriakis. 1998. *Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. J Biol Chem* **273**: 22681-92.
- Yujiri, T., S. Sather, G.R. Fanger, and G.L. Johnson. 1998. *Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. Science* **282**: 1911-4.
- Zandi, E., D.M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, and M. Karin. 1997. *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. Cell* **91**: 243-52.
- Zhang, S., J. Han, M.A. Sells, J. Chernoff, U.G. Knaus, R.J. Ulevitch, and G.M. Bokoch. 1995. *Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. J Biol Chem* **270**: 23934-6.

- Zhang, X.F., J. Settleman, J.M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S.J. Elledge, M.S. Marshall, J.T. Bruder, U.R. Rapp, and J. Avruch. 1993. *Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1*. *Nature* **364**: 308-13.
- Zhao, Q. and F.S. Lee. 1999. *Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta*. *J Biol Chem* **274**: 8355-8.
- Zheng, C.F. and K.L. Guan. 1994. *Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues*. *Embo J* **13**: 1123-31.
- Zohn, I.E., H. Yu, X. Li, A.D. Cox, and H.S. Earp. 1995. *Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase*. *Mol Cell Biol* **15**: 6160-8.
- Zohn, I.M., S.L. Campbell, R. Khosravi-Far, K.L. Rossman, and C.J. Der. 1998. *Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested*. *Oncogene* **17**: 1415-38.

Anhang

Abkürzungen

A	Adenin/Adenosin	N-terminal	aminoterminal
Abb.	Abbildung	NP-40	Nonidet P-40
APS	Ammoniumpersulfat	OD	optische Dichte
AS	Aminosäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ATP	Adenosintriphosphat	Raf	"rapidly accelerated fibrosarcoma"
bp	Basenpaare	RNA	Ribonukleinsäure
BSA	Rinderserumalbumin	rpm	Umdrehungen in der Min.
bzw.	beziehungsweise	RSV	Rous-Sarkom-Virus
C	Cytosin/Cytidin	RT	Raumtemperatur
C-terminal	carboxyterminal	s.	siehe
cDNA	copy DNA	s. o.	siehe oben
Ci	Curie	TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
CIP	"Calf Intestine Phosphatase"	U	Unit
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser	u.a.	unter anderem
d. h.	das heißt	V	Volt
DMSO	Dimethylsulfoxid	v	Volumen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	v.a.	vor allem
DTT	Dithiothreitol	vgl.	vergleiche
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat	w	Gewicht
FCS	fötales Kälberserum	z.B.	zum Beispiel
h	Stunde	Aminosäuren wurden im "Ein-Buchstaben-Code" abgekürzt	
HA	Hämagglutinin-Epitop		
Ig	Immunglobulin		
IL	Interleukin		
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid		
Kap.	Kapitel		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
M	mol/l		
m	milli		
Min.	Minute		
MES	2(N-Morpholina)-ethansulfonsäure		
mRNA	messenger RNA		

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. U. R. Rapp** danke ich für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit. Seine Ideen und Vorschläge trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei. Besonders dankbar bin ich über die Freiheit, meinen eigenen Interessen nachgehen zu dürfen und für die Schaffung einer kompetenten Forschungsatmosphäre im Institut.

Herrn **Prof. Dr. G. Krohne** danke ich für seine Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen und vor der biologischen Fakultät zu vertreten.

Ein ganz besonderes Lob gebührt **Dr. Jakob Troppmair**, der viel Enthusiasmus und fachliche Kompetenz zum Gelingen dieser Arbeit beigesteuert hat und der als diskussionsfreudiger Arbeitsgruppenleiter viel zu meinem wissenschaftlichen Fortschritten beigetragen hat. Ich schätze ihn dabei aber auch als Mensch, der sich jederzeit um andere kümmert und für sie einsetzt.

In einem studiumsbegleitenden Praktikum war es **Dr. Roland Houben** der mich mit viel Engagement betreute und überzeugte die Doktorarbeit am MSZ zu beginnen. Bei Ulrike Rennefahrt, Dr. Dorthe Matenia, Dr. Veronique Le Mallay, Alexander von Gise, Markus Tränkenschuh, Dr. Mirko Hekmann, Petra Lorenz und der Vakzinierungstruppe bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und die Offenheit im Umgang miteinander. Der ganzen AG Troppmair möchte ich für die phantastische Atmosphäre im Labor danken, was für mich immer in positiver Erinnerung bleiben wird.

Für rege Anteilnahme an meiner Arbeit und vielen guten Ratschlägen bedanke ich mich bei Dr. Stephan Ludwig, Dr. Christoph Weber, Dr. Eugen Kerkhoff und ganz besonders bei **Dr. Angelika Hoffmeyer** und **Dr. Andris Avots**.

Ein großes Lob gebührt Frau Pfränger für zahlreiche Dias und Bilder, sowie der gesamten Proteingruppe für technische Unterstützung, wobei ich besonders **Ludmilla Wixler** viele hilfreichen Tips verdanke.

Ganz herzlich danke ich auch den "gestressten" Mitarbeitern von Dr. Stephan Ludwig. **Dragomir Dinev** für seine kompetenten Vorschlägen bei Computerproblemen aller Art, **Bruce Jordan** als meinem geduldigen Englisch-Lehrer, **Bernd Neufeld** für die fleißige Hilfe beim Austesten von Reagenzien und **Christina Ehrhard** für den Schwimmunterricht außerhalb des Labors. Zusätzlich möchte ich mich bei Sandra Ruf, Dr. Kerstin Müller, Dr. Dima Sakkab, Catherine Bruel, Georgios Keramas, Guido Posern und Suzanna Petrovic für ihre Unterstützung, sowie für alle Aktivitäten außerhalb des Labors danken.

Bei **Gunther Tietsch** bedanke ich mich für den besten und stärksten Kaffee im MSZ, sowie seiner Art positiv zu denken und dies auf andere zu übertragen.

Allen anderen Mitarbeitern und Kollegen, die nicht namentlich genannt wurden, aber an der Entstehung dieser Arbeit mitgeholfen haben, danke ich hiermit herzlich.

Ganz besonders bedanke ich mich bei **meinen Eltern**, die mir das Studium erst ermöglicht haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Hartkamp
Vorname: Jörg Dietrich Heinrich
Geburtsdatum: 14.05.1969
Geburtsort: Sulingen/Niedersachsen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung

1975 - 1979 Grundschule Lemförde

2. Grundschule Diepholz

1979 - 1981 Orientierungsstufe Diepholz

1981 - 1986 Gymnasium Diepholz

1986 - 1990 Gymnasium Lohne

Mai 1990 Abitur

1990 - 1991 Wehrdienst: Luftwaffenübernahme/Materialdepot 21

1991 - 1997 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Januar 1997 Biologie-Diplom

Hauptfach: Biochemie

Nebenfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie; Genetik

Diplomarbeit bei Prof. Dr. U. R. Rapp im Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung

Titel der Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Aktivierung und Regulation der Serin/Threonin Kinase MLK3/SPRK"

1997 - 2001 Doktorarbeit bei Prof. Dr. U. R. Rapp

Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Verzeichnis eigener Publikationen

1. **Hartkamp J.**, Troppmair J. and Rapp U. R.: *MLK3 uncouples MEK2 from growth-factor induced ERK1/2 activation. in Vorbereitung*
2. Offenhäusser M., **Hartkamp J.**, Herr A. S., Wauben M., Magnus T., Grauer O., Seubert S., Weishaupt A., Toyka K. V., Gold R. and Troppmair J.: *Truncation of the neuritogenic peptide bP2 (60-70) results in the generation of quantitatively altered peptide ligands with the potential to interfere with T cell activation in vitro. eingereicht*
3. **Hartkamp J.**, Troppmair J. and Rapp U. R. (1999): *The JNK/SAPK activator mixed lineage kinase 3 (MLK3) transforms NIH 3T3 cells in a MEK-dependent fashion. Cancer Res. 59, 2195-2202*
4. Troppmair J., **Hartkamp J.** and Rapp U. R. (1998): *Activation of NF-kappa B by oncogenic Raf in HEK 293 cells occurs through autocrine recruitment of the stress kinase cascade. Oncogene 17, 685-690.*

Abstracts für Kongreß-Präsentationen

Hartkamp J., Troppmair J. and Rapp U. R.: *SPRK/MLK3 serine/threonine kinase activates ERK and SAPK in different cell systems and transforms NIH 3T3 fibroblasts. XIII. Wilsede Meeting. "Modern Trends in Human Leukemia", June 20-23, 1998, Wilsede, Germany*

Hartkamp J., Troppmair J. and Rapp U. R.: *SPRK/MLK3 serine/threonine kinase activates ERK and SAPK in different cell systems and transforms NIH 3T3 fibroblasts. Cold Spring Harbor Meeting. "Tyrosine Phosphorylation & Cell Signaling", May 7-11, Cold Spring Harbor, NY, USA*