

**Die Rolle einer konstitutiv-aktiven
MAP Kinase SAPK β bei der zellulären Transformation,
Proliferation und Apoptose von NIH 3T3 Fibroblasten**

Dissertation

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt

von

Ulrike Rennefahrt

aus Bad Neustadt an der Saale

Würzburg 2002

Ich widme diese Arbeit meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

- 1. Summary/Zusammenfassung**

- 2. Einleitung**
 - 2.1 Einführung in die intrazellulären Signaltransduktionskaskaden**

 - 2.2 Der Prototyp der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signalwege: die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade**

 - 2.3 Die Stress-aktivierten Proteinkinase Kaskaden**
 - 2.3.1 Die ERK5/BMK1 Signalkaskade
 - 2.3.2 Der p38 Signalweg
 - 2.3.3 SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinase)/JNK (c-Jun N-terminale Kinase)
 - 2.3.3.1 Aktivierung der SAPK/JNK Kaskade
 - 2.3.3.2 Die biologische Funktion der SAPK/JNK Signalkaskade
Genetische Deletion von SAPK/JNK Kinasen und anderer Komponenten dieser Signalkaskade
 - 2.3.3.4 Die Rolle von SAPK/JNK gesteuerten Signalwegen bei der onkogenen Transformation
 - 2.3.3.5 Die Funktion von SAPK/JNK bei der Regulation apoptotischer Prozesse

 - 2.4 Regulierung der Spezifität von MAPK Signalkaskaden**

 - 2.5 Gegenstand der Arbeit**

- 3. Material**
 - 3.1 Arbeitsmaterial**

- 3.1.1 Geräte
- 3.1.2 Chemikalien
- 3.1.3 Verbrauchsmaterialien
- 3.1.4 Zellkulturmaterial
- 3.1.5 Enzyme
- 3.1.6 Molekulargewichtsmarker
- 3.1.7 Reagenziensätze (Kits)
- 3.1.8 Antikörper
- 3.1.9 Primer (Oligonukleotide)
- 3.1.10 Peptide

3.2 Zelllinien und Bakterienstämme

- 3.2.1 Zelllinien
- 3.2.2 Bakterienstämme

3.3 Kulturmedien

- 3.3.1 Zellkulturmedien
- 3.3.2 Bakterienmedien

3.4 Plasmide

- 3.4.1 Eukaryontische Expressionsvektoren
- 3.4.2 Eukaryontische Expressionsplasmide

4. Arbeitsmethoden

4.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

- 4.1.1 Bakterienkulturen
- 4.1.2 Herstellung ultrakompetenter Bakterien
- 4.1.3 Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 α
- 4.1.4 Plasmidisolation aus *E. coli*
 - 4.1.4.1 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*: präparativer Maßstab
 - 4.1.4.2 Plasmid-DNA Isolierung: analytischer Maßstab

4.1.4.3 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* für Zellkultur-
Transfektionsexperimente

4.2 Molekularbiologisches Arbeiten mit DNA

4.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

4.2.3 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

4.2.4 Restriktionsverdau von DNA

4.2.5 Herstellung von *blunt-end* DNA-Fragmenten

4.2.6 Dephosphorylierung von geschnittener Vektor-DNA mit CIP

4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

4.2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR

4.2.9 Erstellung von Punktmutationen mit Hilfe des QuickChange™
Site Directed Mutagenesis Kit

4.2.10 Synthese kleiner doppelsträngiger DNA-Stücke (*in vitro annealing*)

4.2.11 DNA-Aufreinigung durch Phenolisierung mit alkoholischer Fällung

4.2.12 DNA-Sequenzierung

4.3 Zellkultur

4.3.1 Haltung von eukaryontischen Zelllinien in Kultur

4.3.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen

4.3.3 Retroviren als effiziente Vektoren für den Gentransfer in Säugerzellen

4.3.4 Transfektion von Zellen mit Hilfe der Zentrifugationsinfektion
(*spin-infection*)

4.3.5 Herstellung stabiler NIH 3T3 Zelllinien

4.3.6 Herstellung einer Tetrazyklin-induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie

4.3.7 Soft-Agar Klonierung

4.3.8 Focus-Assay

4.3.9 32D-Zellen/Survival-Assay

4.3.10 Bestimmung der Überlebensrate mittels PI-Färbung

4.3.11 Immunfluoreszenzfärbung

4.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit Proteinen

4.4.1 Gewinnung von Proteinlysaten

- 4.4.2 Western-Blot Analyse
 - 4.4.2.1 Vorbereitung der Proteinproben
 - 4.4.2.2 Auftrennung von Proteinen durch eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
 - 4.4.2.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)
 - 4.4.2.4 Färbung der Proteinmembran mit PonceauS
 - 4.4.2.5 Immundetektion von Proteinen
 - 4.4.2.6 Ablösen von Antikörpern auf einer Nitrozellulosemembran („Strippen“)
- 4.4.3 Kinase-Assay
- 4.4.4 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine
- 4.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration
- 4.4.6 Reporteragen-Assay

5. Ergebnisse

- 5.1 Klonierung einer konstitutiv-aktiven SAPK/JNK Kinase Mutante**
- 5.2 Das Fusionsprotein SAPK β -MKK7 ist konstitutiv-aktiv und zeigt keine Stimulation endogener SAPK/JNKs**
- 5.3 SAPK β -MKK7 führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun**
- 5.4 SAPK β -MKK7 induziert die transkriptionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2**
- 5.5 Die Expression von SAPK β -MKK7 beeinflusst nicht die Aktivität der MAP Kinasen ERK1/2, p38 oder ERK5/BMK1**
- 5.6 Intrazelluläre Lokalisation von SAPK β -MKK7**
- 5.7 Herstellung einer Tetrazyklin-induzierbaren NIH 3T3 Fibroblastenzelllinie, die SAPK β -MKK7 exprimiert**

- 5.8** Induzierbares SAPK β -MKK7 phosphoryliert c-Jun
- 5.9** *In situ* Lokalisation von SAPK β -MKK7 in der NIH 3T3 Tet-off Zelllinie
- 5.10** Konstitutiv-aktives SAPK β -MKK7 induziert die morphologische Transformation von NIH 3T3 Zellen und fördert das Wachstum dieser Zellen in Soft-Agar
- 5.11** SAPK β -MKK7 führt nur zu einer schwachen Stimulation eines AP-1/Ets-1-abhängigen Promotors
- 5.12** SAPK β -MKK7 Expression verursacht in NIH 3T3 Zellen die Zerstörung des F-Aktin Zytoskeletts
- 5.13** Erfordert die Degradation des F-Aktin Zytoskeletts in NIH 3T3 Fibroblasten die nukleäre Lokalisation von SAPK β -MKK7?
- 5.14** Konstitutiv-aktives SAPK β induziert die Tumorbildung *in vivo*
- 5.15** Die Expression von SAPK β -MKK7 in der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen
- 5.16** SAPK β -MKK7 und seine Rolle bei der Stress-vermittelten Induktion von Apoptose
- 6. Diskussion**
- 6.1** SAPK β -MKK7 stellt eine spezifische und konstitutiv-aktive MAP Kinase dar

- 6.2** **SAPK β -MKK7 zeigt bevorzugt eine nukleäre Lokalisation**

- 6.3** **Aktiviertes SAPK β besitzt ein sehr schwaches Potential NIH 3T3 Zellen zu transformieren**

- 6.4** **Warum handelt es sich bei aktiviertem SAPK β lediglich um eine schwach transformierende Kinase?**
 - 6.4.1 Die Expression von aktiviertem SAPK β induziert gesteigerte Proliferation von NIH 3T3 Fibroblasten
 - 6.4.2 SAPK β -MKK7 ist nicht in der Lage, dass gezielte Überleben von transformierten Zellen zu stimulieren

- 6.4** **SAPK β -MKK7 und seine Funktion bei der Tumorbildung *in vivo***

- 6.6** **Konstitutiv-aktives SAPK β induziert die morphologische Transformation in NIH 3T3 Fibroblasten gekoppelt mit der Zerstörung des Zytoskeletts**

- 6.7** **Ausblick**

7. Literatur

Anhang

- Abkürzungen
- Lebenslauf
- Verzeichnis eigener Publikationen
- Erklärung

1. SUMMARY

The c-Jun N-terminal kinases (JNKs) (also known as stress-activated protein kinases, SAPKs), members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, regulate gene expression in response to a variety of physiological and environmental stimuli. Gene knockout experiments and the use of dominant interfering mutants have pointed to a role of SAPK/JNKs in the processes of cell differentiation, survival and/or apoptosis as well as oncogenic transformation. Direct analysis of the transforming potential of JNKs has been hampered so far by the lack of constitutively active forms of these kinases. Recently such mutants have become available by fusion of the MAPK with its direct upstream activator kinase. In the context of this PhD thesis a constitutively active SAPK β -MKK7 hybrid protein was generated and used to characterize the transforming potential of activated SAPK β . Inducible expression of SAPK β -MKK7 caused morphological transformation of NIH 3T3 fibroblasts. Additionally, these cells formed small foci of transformed cells, grew anchorage-independent in soft agar and similar to oncogenic Ras and Raf, expression of activated SAPK β resulted in the degradation of F-actin stress fibers. Furthermore, expression of SAPK β -MKK7 increased proliferation rates of NIH 3T3 cells. However, in contrast to the classical oncogenes like *ras* and *raf*, SAPK β -MKK7 is not able to selectively support the survival of the transformed cells. Therefore, our data suggest that constitutive SAPK/JNK activation elicits major aspects of cellular transformation, but is unable to induce the complete set of changes which are required to establish the fully transformed phenotype. We have also begun to directly determine the tumorigenic potential of SAPK β -MKK7 in the nude mouse. Injection of SAPK β -MKK7 expressing fibroblasts resulted in the establishment of a well defined fibrosarcoma, albeit at much later timepoints than in the case of v-Raf transformed cells. The long latency with which they develop tumors suggests the requirement of further genetic alterations. Thus expression of activated SAPK/JNK is sufficient to initiate tumor development *in vivo*.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Bei c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) (auch als Stress-aktivierte Proteinkinase SAPKs bezeichnet), handelt es sich um Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Familie (MAPK), die die Genexpression als eine Antwort auf eine Vielzahl von physiologischen und nicht-physiologischen Stimuli regulieren. Gendelektionsexperimente (*knockout*) und der Einsatz von dominant-negativen Mutanten wiesen auf eine Funktion von SAPK/JNKs bei Prozessen der zellulären Differenzierung, dem Überleben und/oder Apoptose sowie onkogener Transformation hin. Direkte Analysen des transformierenden Potentials von SAPK/JNKs wurden bislang durch das Fehlen von konstitutiv-aktiven Mutanten verhindert. Erst unlängst konnte durch die Fusion der MAP Kinase mit seiner direkten, in der Kaskade vorgeschalteten, Aktivator kinase solche Mutanten bereitgestellt werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein SAPK β -MKK7 Hybridprotein generiert, mit dessen Hilfe das transformierende Potential von aktiviertem SAPK β charakterisiert werden konnte. Die induzierte Expression von SAPK β -MKK7 führte zur morphologischen Transformation von NIH 3T3 Fibroblasten. Darüber hinaus bildeten diese Zellen kleine Foci aus transformierten Zellen, wuchsen in Soft-Agar und vergleichbar mit onkogenem Ras oder Raf, resultierte auch die Expression von aktiviertem SAPK β in der Zerstörung des F-Aktins. Des Weiteren steigerte die Expression von SAPK β -MKK7 die Proliferationsraten von NIH 3T3 Zellen. Im Gegensatz zu den akut transformierenden Onkogenen wie *ras* oder *raf*, ist SAPK β -MKK7 jedoch nicht in der Lage, das Überleben der transformierten Zellen zu bewirken. Unsere Daten schlagen daher vor, das konstitutiv-aktive SAPK/JNK zwar die Hauptaspekte zellulärer Transformation verursacht, aber nicht imstande ist, alle Veränderungen zu induzieren, die benötigt werden, um einen vollständig transformierten Phänotypen zu etablieren, weshalb insgesamt gesehen, sein transformierendes Potential deutlich schwächer ausgeprägt ist. Wir haben zusätzlich damit begonnen, das tumorigene Potential von SAPK β -MKK7 direkt im Nacktmausmodell zu verifizieren. Die Injektion von SAPK β -MKK7 exprimierenden Fibroblasten resultierte in der Etablierung eines gut definierten Fibrosarkoms, wobei die Latenzzeit länger war als bei v-Raf transformierten Zellen. Somit ist die Expression von aktiviertem SAPK/JNK ausreichend, um die Tumorentwicklung *in vivo* zu initiieren, auch wenn die lange Latenzzeit auf die Notwendigkeit zusätzlicher genetischer Veränderungen hinweist.

2. EINLEITUNG

2.1 Einführung in die intrazellulären Signaltransduktionskaskaden

Nicht erst seit Beginn des Telekommunikationszeitalters können Informationsübertragungen ein fundamentales Problem darstellen. Um die Existenz eines multizellulären Organismus zu gewährleisten, bedarf es des Informationsaustausches zwischen den einzelnen Zellen und dem Gesamtorganismus. Nur so kann eine koordinierte Steuerung der Entwicklung, des Wachstums, der Reizverarbeitung und der Bewegung erfolgen. Als Informationsträger steuern hierbei elektrische Impulse oder lösliche Faktoren, wie beispielsweise Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine, einzelne Zellen oder Gewebe und kontrollieren somit alle ablaufenden motorischen, sekretorischen, proliferativen und migratorischen Prozesse. Daneben erzeugen auch Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte, mechanische Kräfte oder Umweltfaktoren, wie z. B. Veränderungen der Osmolarität, Temperatur, pH-Wert und Strahlung, Informationen, die die Funktion und Aktivität von Zellen beeinflussen (Dhanasekaran 1998). Signale, die von außen an eine Zellmembran gelangen, müssen von der Zelle aufgenommen und verarbeitet werden, das heißt zu den spezifischen Zielproteinen und -genen übermittelt werden, damit eine adäquate Antwort erfolgen kann: ein Prozess den man als intrazelluläre Signaltransduktion bezeichnet. Meist führen diese Prozesse zur Modifizierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern, was eine Veränderung des Genexpressionsmusters der Zelle zur Folge hat und somit letztendlich eine Reaktion auf das empfangene Signal einleitet. Inter- und intrazelluläre Signale erlauben es jeder Zelle ihren Platz zu finden und ihre spezifische Rolle im Gesamtsystem zu übernehmen.

Die Gruppe der **Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK)** Signaltransduktionswege umfasst intrazelluläre Signalproteine, die durch Stimuli in Form von Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Umweltstressfaktoren über membranassoziierte Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (Rezeptor-Tyrosinkinase, RTK) bzw. über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren aktiviert werden. Im Fall der membranassoziierten Rezeptoren führt die extrazelluläre Bindung von Signalmolekülen an die Rezeptoren zur Di- oder Oligomerisierung. Durch die hierbei erzwungene räumliche Annäherung kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten auf der intrazellulären Domäne, die für die Rekrutierung von Austauschfaktoren für das kleine G-Proteine Ras benötigt werden. An heterotrimere G-Proteine gekoppelte Rezeptoren aktivieren bzw. inaktivieren ein zusätzliches membrangebundenes Enzym oder einen Ionenkanal, wodurch häufig die Produktion und/oder

Freisetzung sekundärer Signalmoleküle (*second messenger*) stimuliert wird. Bei den MAPK Signaltransduktionswegen handelt es sich um ein relativ ursprüngliches Signalweiterleitungssystem, das die Natur in unterschiedlichen Permutationen einsetzt, um eine Vielzahl von Aufgaben zu bewerkstelligen. MAPK Signalwege existieren in allen Eukaryonten und kontrollieren hierbei fundamentale zelluläre Prozesse wie die Zelldifferenzierung und -proliferation, das Überleben von Zellen oder ihren programmierten Tod (Apoptose), ihre Migration oder die Reaktion auf diverse Umwelteinflüsse. Um diese Prozesse reguliert ablaufen zu lassen, verwenden eukaryontische Zellen ein Übertragungsprinzip, das aus mehrfach in Serie geschalteten Phosphorylierungsschritten besteht, die durch eine Kaskade von Kinasen bewerkstelligt werden (Hunter 1995). Als grundlegende Komponente beinhalten alle MAP Kinase Signaltransduktionswege ein zentrales Modul, welches einem G-Protein nachgeschaltet ist und aus drei Kinasen besteht: eine Serin/Threonin spezifische MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK; MKKK) (*membrane shuttle kinase*) phosphoryliert und aktiviert eine nachfolgende dualspezifische MAP Kinase Kinase (MAPKK; MKK) (*dual-specificity kinase*), die ihrerseits wiederum durch Serin/Threonin- und Tyrosinphosphorylierungen eine spezifische Serin/Threonin MAP Kinase (MAPK) (*nuclear shuttle kinase*) aktiviert. Diese transloziert meist direkt in den Zellkern, um dort Transkriptionsfaktoren oder andere Zielproteine zu modifizieren, sie kann aber auch im Zytoplasma bzw. in anderen zellulären Kompartimenten verbleiben, wo sie ebenfalls Substrate zu erkennen vermag (Pearson et al. 2001; Kolch 2000; Sithanandam et al. 1996). Die schematische Grundstruktur von MAPK Signaltransduktionswegen ist in Abb. 1 dargestellt. Diese hierarchische Grundstruktur 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 (Kolch 2000). Die Entwicklung einer mehrstufigen Signalkaskade bietet im Gegensatz zu Signalübertragungssystemen, die mit einer einzigen Kinase auskommen (z.B. JAK-STAT Signalweg oder Adenylatzyklase cAMP Signalweg), den Vorteil, dass stufenartige Signale (*Input*) in schalterartige Antworten (*Output*) konvertiert werden. Bei dieser Umwandlung werden Störsignale (Signale mit ungenügender Intensität oder Dauer) herausgefiltert, während auf den Schwellenwert überschreitende Stimuli mit einer Aktivierung der Signalkaskade geantwortet wird (Ferrell 1996).

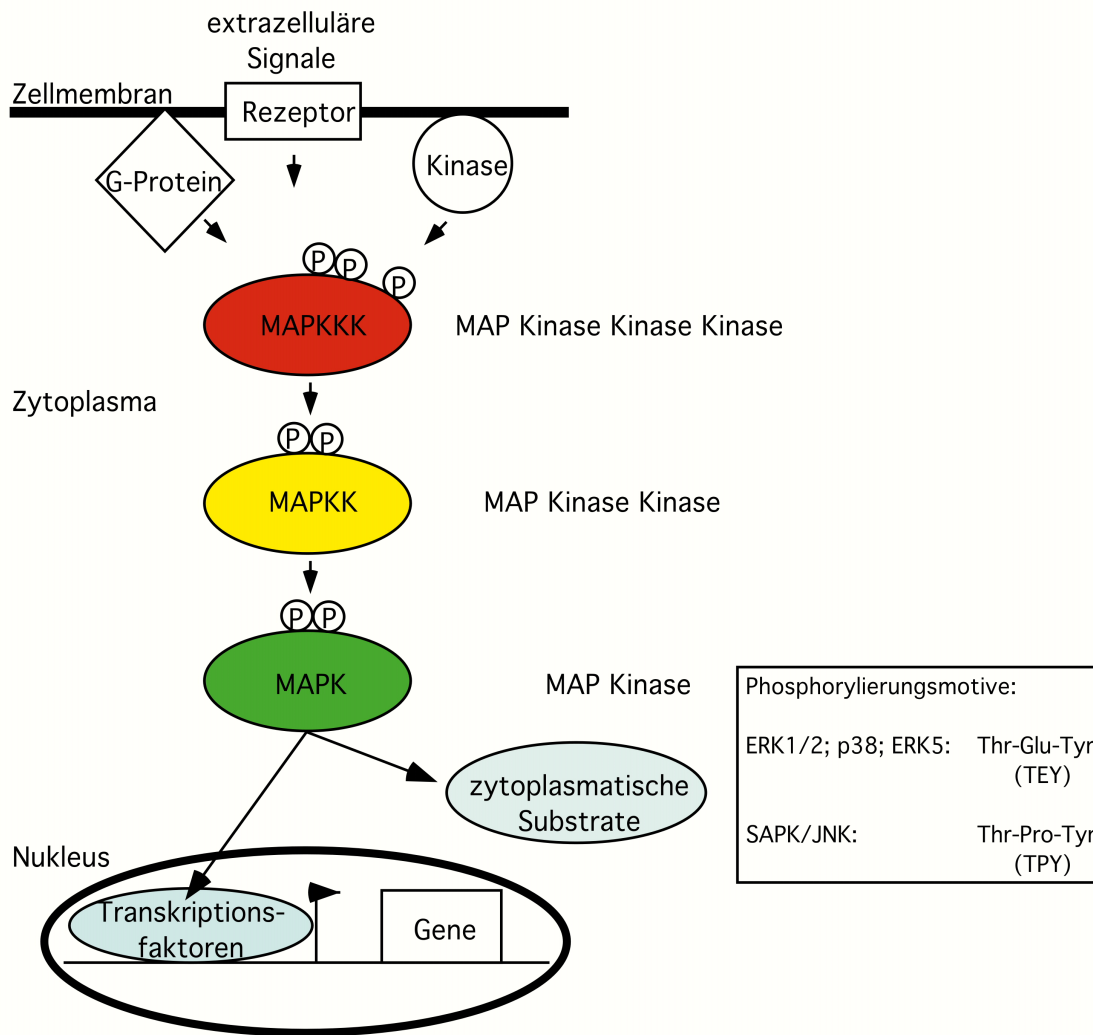


Abb. 1 Schematische Darstellung der Struktur von MAPK Signaltransduktionswegen (nach (Kolch 2000))
 Alle MAPK Signaltransduktionskaskaden zeigen einen vergleichbaren Aufbau: eine Membran-Shuttle Kinase (MAPKKK) muß zu ihrer eigenen Aktivierung aus dem Zytoplasma in die Nähe der Plasmamembran wechseln. Sie phosphoryliert anschließend eine dualspezifische MAPKK, die dann ihrerseits eine MAPK aktiviert. Die MAPK, auch als nukleäre Shuttle Kinase bezeichnet, kann sowohl Transkriptionsfaktoren im Nucleus aktivieren, aber auch zytoplasmatische Proteine modifizieren.

Die Zahl der charakterisierten MAPK Signalwege in eukaryontischen Zellen hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Die Identifikation immer neuer Signalkomponenten und die Entschlüsselung zahlreicher Interaktionen der beteiligten Proteine untereinander zeigt eine starke Verflechtung der verschiedenen Signalwege, was eine Vielzahl von hochregulierten zellulären Reaktionen ermöglicht. Genetische Analysen führten bislang zum Nachweis von fünf MAP Kinase Signalwegen im einzelligen, eukaryontischen Organismus, der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Schaeffer and Weber 1999), die obwohl aus strukturell verwandten Komponenten zusammengesetzt, an unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt sind. Osmoregulation, Bildung von Sporen, Zellwandbiosynthese, Filamentation und

Pheromonregulation (*mating*) werden in der Hefezelle durch sie koordiniert (Herskowitz 1995; Madhani and Fink 1997; Schaeffer and Weber 1999). In höheren Eukaryonten findet man eine weit aus größere Zahl von Kinasen, es fehlen bislang jedoch Daten, die eine exakte Zahl der MAPK Signalwege genau festlegen. Proteinkinasen stellen die zweitgrößte Proteinfamilie in höher organisierten Zellen dar (Hunter 1994). Nach Abschluß des menschlichen Genomprojekts wurden bislang 868 Gene (entspricht 2.8% der bekannten Gene) identifiziert, die für Proteinkinasen kodieren (Venter et al. 2001). Da 41,7% der Gene eine bislang unbekannt Funktion besitzen, ist jedoch mit der Identifizierung von weiteren Kinasen zu rechnen (Venter et al. 2001).

Gleichfalls handelt es sich bei den MAPK Kaskaden um Signalwege, die nicht nur in ihrer Grundstruktur sehr konserviert in allen höheren Eukaryonten vorliegen, vielmehr bestehen auch auf der Stufe einzelner Kinasen hohe Homologien. Vier der wichtigsten Säuger MAP Kinase Kaskaden, werden in den nachfolgenden Kapiteln näher charakterisiert und sind zusätzlich in einer stark vereinfachten Übersicht in Abb. 2 dargestellt.

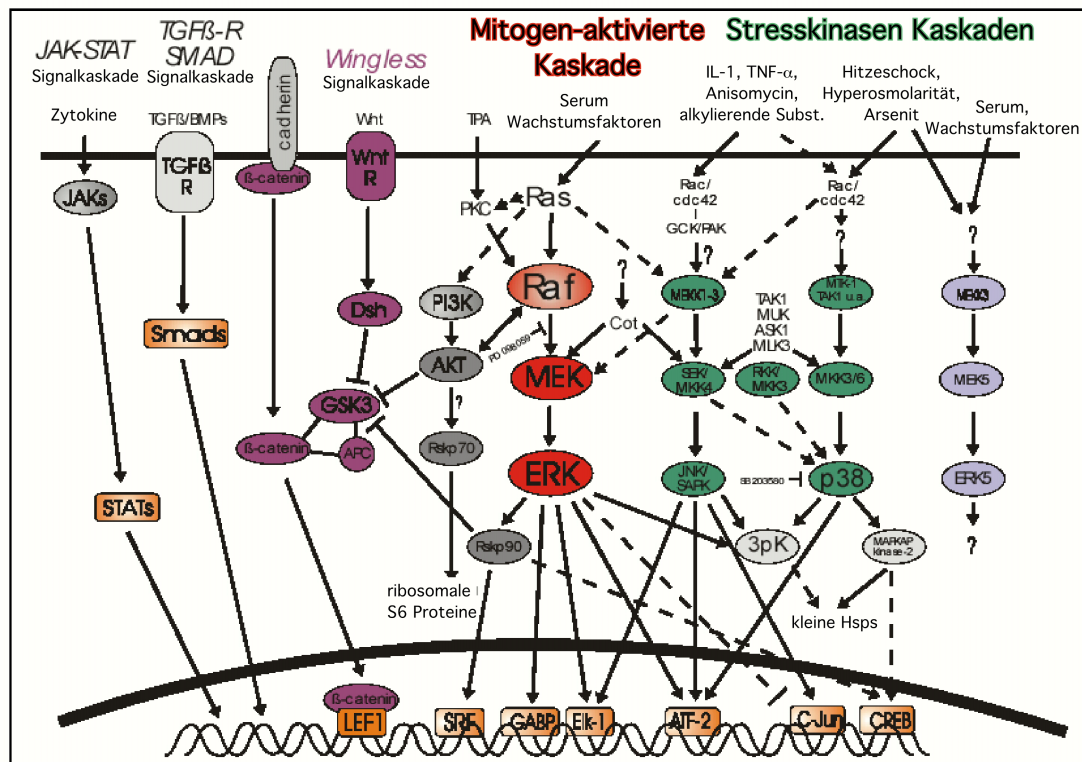


Abb. 2 Schematische Übersicht wichtiger Signaltransduktionswege, einschließlich der MAPK Kaskaden (S. Ludwig, MSZ)

In einer stark vereinfachten Darstellung ist eine Auswahl an bisher charakterisierten Signalmolekülen und -wegen abgebildet. Z.T. werden die Signale entlang einer Kaskade von der Plasmamembran bis in den Zellkern geleitet. Einige Signalwege sind durch Querverbindungen miteinander verknüpft.

2.2 Der Prototyp der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signalwege: die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade

Die am besten untersuchte Proteinkinasekaskade ist jene, die zur Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 führt. Da dieser Signaltransduktionsweg als erstes entdeckt wurde, wird er auch als klassische zytoplasmatische Kaskade bezeichnet, der in Abhängigkeit von der Stärke und Signaldauer Proliferation, Zelldifferenzierung, Transformation, Schutz vor Apoptose oder Wachstumsinhibierung bewirkt. Seine Hauptfunktion in der Wachstumskontrolle ist dabei wenig verwunderlich, handelt es sich doch bei zwei seiner Kaskadenmitglieder, Ras und Raf, um Proto-Onkogene (Daum et al. 1994; Kolch 2000). Eine Vielzahl an Hormonen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, sowie Neurotransmitter, Zytokine und Tumorpromovierende Substanzen vermögen diverse Rezeptoren an der Zelloberfläche zu stimulieren (Sato et al. 1992) (Khosravi-Far et al. 1994). Zu den bis ins Detail charakterisierten Ras-kontrollierten Signaltransduktionswegen zählt die über den EGF (*epidermal growth factor*) Rezeptor-vermittelte ERK (*extracellular regulated kinase*) Aktivierung (Egan et al. 1993; Khosravi-Far et al. 1994) (siehe auch Abb. 3). Nach erfolgter Ligandenbindung, Rezeptordimerisierung und Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste innerhalb der zytoplasmatischen Domäne, findet eine Komplexbildung mit dem Adapterproteinen Grb2 (*growth factor receptor bound protein2*) und Shc (Schlessinger 1993; Campbell et al. 1998) statt. Shc wird durch Assoziation mit der aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) phosphoryliert, was zur Bildung einer Erkennungs- sowie Bindestelle für die SH2 Domäne von Grb2 führt. Da Grb2 stabil mit dem Ras GEF (Guaninnukleotidaustauschfaktor) Sos (*son of sevenless*) verbunden ist, erfolgt somit indirekt eine Translokation von Sos an die Plasmamembran. Zusätzlich initiiert die Lokalisation von Sos an EGF Rezeptoren bei Ras einen Austausch von GDP zu GTP (Downward 1996), wodurch es transient zu einem Anstieg an aktiviertem Ras kommt (Schlessinger 1993; Feig 1994). Die kleinen G-Proteine der Ras Familie sind an der Oberfläche der inneren Zytoplasmamembran lokalisiert, wo sie als molekulare Schalter fungieren, die die über Rezeptoren einlaufenden äußeren Reize im Zytoplasma auf die entsprechenden Signaltransduktionskaskaden übertragen (Heidecker et al. 1992; Koide et al. 1993; Katz and McCormick 1997). Die biologische Aktivität von Ras wird dabei durch einen regulierten GDP/GTP Zyklus bestimmt. Da die intrinsische GDP/GTP Austausch- und GTP-Hydrolyseaktivität von Ras selbst sehr gering ist, muss der GDP/GTP Zyklus mit Hilfe von regulatorischen Proteinen gesteuert werden. Während Guaninnukleotidaustauschfaktoren

(GEFs) die Bildung des aktiven, GTP-gebundenen Status fördern, unterstützen Ras GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Formation des inaktiven GDP-gebundenen Zustands (Boguski and McCormick 1993; Quilliam et al. 1995; Campbell et al. 1998). In Eukaryonten sind drei Ras-Proteine identifiziert worden: H-Ras, K-Ras und N-Ras (Neri et al. 1988). Im aktivierten Zustand fungiert Ras als Adapter, der benötigt wird, um die membranassoziierte und zytosolisch lokalisierte Ser/Thr Kinase Raf (*membrane shuttle kinase*) in den Rezeptorkomplex zu rekrutieren (Zhang et al. 1993; Avruch et al. 1994; Hall 1994; Leever et al. 1994; Magnuson et al. 1994; Kerkhoff and Rapp 2001; Hekman et al. 2002). Dieser Schritt ist notwendig, um die Aktivierung von Raf durch weitestgehend unbekannte membranassoziierte Moleküle zu gewährleisten, da eine alleinige Ras-Raf Interaktion nicht ausreicht, um eine maximale Raf-Aktivierung zu erzielen (Daum et al. 1994; Moodie and Wolfman 1994; Dent et al. 1995; Kerkhoff and Rapp 2001; Hekman et al. 2002). So vermag beispielsweise die Membran-gebundene Tyrosinkinase c-Src C-Raf zu phosphorylieren, daneben spielen aber auch Ser/Thr Kinasen eine entscheidende Rolle (Marais et al. 1995; Marais and Marshall 1996). Alle aktivierten Isoformen von Raf (A-Raf, B-Raf und C-Raf) übertragen anschließend Phosphatreste auf die dualspezifischen MEK Kinasen 1/2 (*MAP kinase ERK activating kinase*) (Alessi et al. 1994; Huang and Erikson 1994) (Kyriakis et al. 1992; Zheng and Guan 1994; Hagemann and Blank 2001). Hierbei handelt es sich um Kinasen, die in der Lage sind, die Thr-Glu-Tyr Sequenzen innerhalb der Aktivierungsschleifen von ERK1/2 (ERK1/p44; ERK2/p42) (Boulton et al. 1991) zu phosphorylieren (Whitmarsh and Davis 1996). Inaktives MEK1 hält aufgrund seines nukleären Exportsignals (NES) die gebundenen ERK Kinasen im Zytoplasma zurück. Transloziert aktiviertes ERK nach Dissoziation von MEK1 in den Zellkern, so phosphoryliert es u. a. die Transkriptionsfaktoren Elk-1 und SAP-1, zwei so genannte TCFs (*ternary complex factors*). Hierbei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die zusammen mit dimerisierten SRFs (*serum response factors*) den Promotor des *c-fos* Gens positiv regulieren. c-Fos bildet durch Dimerisierung mit anderen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren, z. B. c-Jun, den AP-1 Transkriptionskomplex, der AP-1 abhängige Gene aktiviert (Hill and Treisman 1995). Letztendlich kommt es zur Aktivierung eines genetischen Programms, das z. B. zur DNA-Synthese und Zellwachstum, aber bei Störungen auch zur Tumorgenese führen kann. Neben dem nukleären ERK verbleibt immer auch ein gewisser Anteil der aktivierten MAP Kinase im Zytoplasma, um dort ebenfalls Substrate, wie beispielsweise die Serin/Threonin Kinasen 3pK, MK2, RSK1 p90 (ribosomale S6 Kinase oder MAPKAP Kinase1) oder Phospholipase A2 zu phosphorylieren, die ihrerseits dann wieder weitere Zielproteine modifizieren können (Blenis

1993; Daum et al. 1994; Ludwig et al. 1996; Sithanandam et al. 1996; Treisman 1996). Die Inaktivierung von ERK1/2 erfolgt wiederum durch Dephosphorylierung mittels spezifischer Phosphatasen, wodurch ERK anschließend zurück ins Zytoplasma wandert und mit MEK1 reassoziert (Widmann et al. 1999).

Um die Funktion von MAP Kinase Signalwege weitergehend zu entschlüsseln, wurden zusätzlich Deletionsstudien (*knockouts*) in der Maus durchgeführt. Analysen belegten hierbei, daß B- und C-Raf bereits in der Embryonalphase für das Überleben notwendig sind (Wojnowski et al. 1997; Wojnowski et al. 2000; Huser et al. 2001). Das Fehlen von A-Raf hingegen, läßt die Tiere erst 1-3 Wochen nach der Geburt sterben (Pritchard et al. 1996; Luckett et al. 2000). Ebenso führt die Deletion von *MEK1* zur embryonalen Letalität (Giroux et al. 1999). Im Gegensatz dazu, verursacht der Verlust von ERK1 nur die Ausprägung eines minimalen Phänotypes (Pages et al. 1999). Während *K-Ras* sich ebenfalls als ein essentielles Gen der Mausembryogenese herausstellte (Johnson et al. 1997), scheint dieses für die anderen beiden Isoformen nicht zu gelten. Nach ihrer Eliminierung konnte kein veränderter Phänotyp beobachtet werden (Umanoff et al. 1995; Ise et al. 2000).

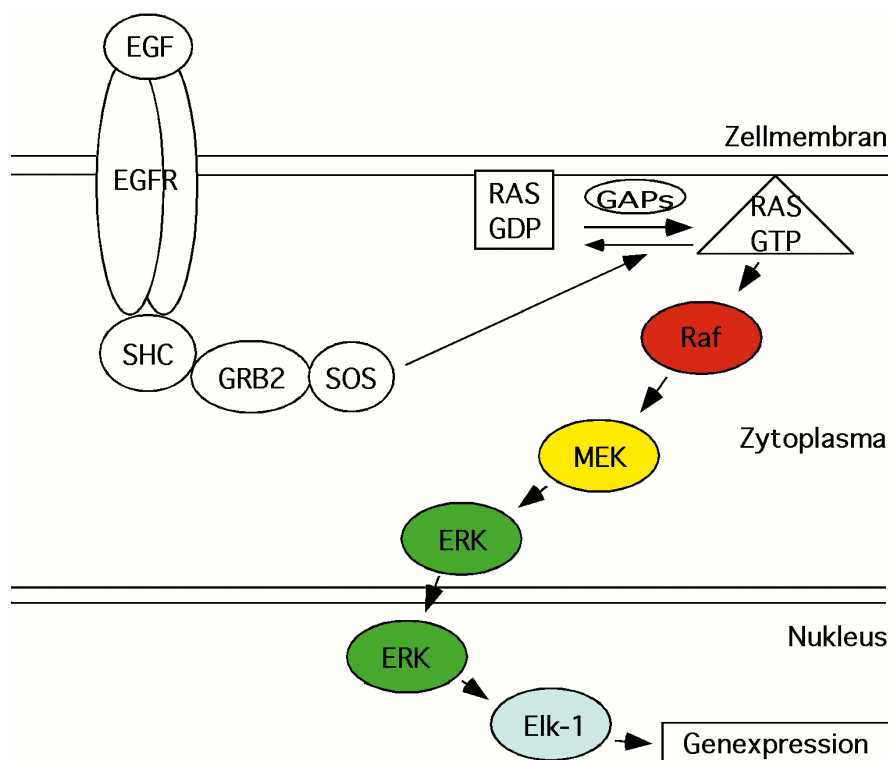


Abb. 3 Die klassische zytoplasmatische ERK MAPK Kaskade (nach (Campbell et al. 1998))
Eine detaillierte Beschreibung des Signalweges ist dem Text zu entnehmen.

2.3 Die Stress-aktivierten Proteinkinase Kaskaden

Teile der zellulären Antwort auf proinflammatorische Zytokine (z. B. $\text{TNF}\alpha$), Interleukine oder Stressinduktoren, wie beispielsweise ultraviolettes Licht, osmotischer oder Hitzeschock und zytotoxische Substanzen (z. B. Arsenit und Anisomycin), erfolgt durch die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, die die MAP Kinasen SAPK/JNK, p38 oder ERK5/BMK1 beinhalten (vgl. Abb. 2). Obwohl diese Stress-aktivierten Kinasewege strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind, üben sie, im Vergleich mit der Mitogen-stimulierten ERK1/2 Kaskade, oft getrennte physiologische Funktionen aus. Auch sie sind hierarchisch angeordnet, doch kennt man bislang weitaus weniger Details über die vorgeschalteten Aktivatoren und die nach Stimulation erfolgten Effekte, die den MAP Kinasen nachgeschaltet sind. Anhand zahlreicher Experimente konnte ihnen jedoch Einflüsse auf Prozesse wie Apoptose, Transformation, Differenzierung, Entwicklung, Aktivierung des Immunsystems, Entzündungsreaktionen sowie Anpassungen an wechselnde Umweltgegebenheiten zugeordnet werden (Tibbles and Woodgett 1999). Da die physiologische Funktion der SAPK/JNK Kaskade Gegenstand dieser Arbeit ist, wird der aktuelle Wissensstand in Bezug auf diesen Signalweg detaillierter dargestellt.

2.3.1 Die ERK5/BMK1 Signalkaskade

ERK5/BMK1 (*Big MAP kinase*) wurde erst Mitte der 90er Jahre im Rahmen eines „Two-Hybrid Screens“ mit MEK5 als eingesetztem Köderprotein identifiziert (Lee et al. 1995; Zhou et al. 1995) (siehe auch Abb. 2). Obwohl es die für ERK Kinasen charakteristische Thr-Glu-Tyr Sequenz innerhalb der Aktivierungsschleife trägt, existieren grundlegende Unterschiede, die zur Etablierung eines unabhängigen Signalweges geführt haben. ERK5 ist mit etwa 90 kDa ungefähr doppelt so groß wie die klassischen ERK1/2 Kinasen. Während die Kinasedomäne relativ konserviert vorliegt, besitzt ERK5 einen bislang einzigartigen C-terminalen Anhang, der zu dieser für MAP Kinasen außergewöhnlichen molekularen Größe führt. Dieser etwa 400 Aminosäure lange C-Terminus zeigt weder signifikante Sequenzhomologien mit anderen bekannten Proteinen, noch ist etwas über seine Funktion bekannt, obwohl er 10 Konsensusstellen für Phosphorylierungen durch MAPK enthält. Vermutlich repräsentieren sie Autophosphorylierungsstellen (English et al. 1998). Die Existenz von Prolin-reichen Motiven weisen zusätzlich auf Bindungsstellen für Proteine mit

SH3 Domänen hin. Zusätzlich trägt dieser C-terminale Teil ein spezifisches Motiv, welches eine Bindung von ERK5 an das Zytoskelett ermöglichen könnte (Zhou et al. 1995). In Säugern wird ERK5 ubiquitär exprimiert und durch vielfältige wachstumsstimulierende (EGF, NGF, LPA und Phorbol ester) oder zellstressende Agenzien (Wasserstoffperoxid, Sorbitol, UV-Strahlung oder vaskulären Stömungsstress), aktiviert (Pearson et al. 2001). ERK5 beeinflusst die zellulären Aktivitäten durch Phosphorylierung von MADS Box Transkriptionsfaktoren, wie MEF2A und C (*myocyte enhancer factor 2A und C*), und dem Ets-ähnlichen Transkriptionsfaktor SAP1a. Da MEF2 Isoformen an regulatorische Elemente innerhalb des *c-jun* Promoters binden können, führt die Fähigkeit von ERK5 MEF2 Isoformen zu aktivieren letztendlich zur Regulation der c-Jun Promoter Aktivität (Marinissen et al. 1999). MEK5 gilt bislang als einziger direkter und spezifischer Aktivator von ERK5 (Zhou et al. 1995; English et al. 1998). Sequenzvergleiche belegen eine enge Verwandtschaft mit MEK1/2, obwohl MEK5 nicht durch C-Raf phosphoryliert oder aktiviert werden kann (English et al. 1998; English et al. 1999; Kamakura et al. 1999). Als einzige bekannte MEK5 Kinase konnte bisher MEKK3 identifiziert werden (Chao et al. 1999). Ergebnisse mit Knockout Tieren sind bislang noch nicht publiziert. Notwendigkeit für ERK5 konnte jedoch in Proliferationsexperimenten nachgewiesen werden. So inhibieren dominant-negative Formen von ERK5 die EGF-vermittelte Proliferation und Raf-stimulierte Focusformation in 3T3 Zellen (Kato et al. 1998; English et al. 1999; Kato et al. 2000; Hayashi et al. 2001).

2.3.2 Der p38 Signalweg

Ein zweiter Stress-MAP Kinase Signalweg in Säugetieren führt zur Aktivierung von p38 (Abb. 2). Diese Kinase wurde ursprünglich als Protein identifiziert, das durch Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert werden konnte (Han et al. 1994; Lee et al. 1994). p38 Phosphorylierung erfolgt des Weiteren nach Stimulierung durch hyperosmolaren Schock, Il-1 oder Hitzeschock (Kyriakis and Avruch 1996; Kyriakis and Avruch 2001). Die p38 Kinase aus Säugetieren repräsentiert das strukturelle Homolog zu Hog1p, eine MAP Kinase, die in der Hefe *S. cerevisiae* bei Hyperosmolaritätssignalen rekrutiert wird (Han et al. 1994). Bislang wurden 6 Isoformen in Säugerzellen gefunden: p38 α (Han et al. 1994), p38 β (Enslin et al. 1998), p38 γ (Li et al. 1996), SAPK3 (Cuenda et al. 1997) und SAPK4 (Goedert et al. 1997) sowie Mxi (Zervos et al. 1995). Während Ras die Aktivierung des ERK Signalweges kontrolliert, übernehmen die Rho GTPasen Rac und Cdc42, die beide zur Ras-Superfamilie

kleiner G-Proteine gehören (Avruch 1998), innerhalb der p38 Kaskade diese Funktion (Minden et al. 1995). Unbekannte Zwischenschritte führen zur Aktivierung der beiden dualspezifischen Kinasen MKK3 oder MKK6 (Han et al. 1994; Derijard et al. 1995; Enslen et al. 1998), wodurch das Signal über die nachgeschaltete p38 Kinase sowie die zytoplasmatischen Substrate 3pK und die MAPKAP Kinase2 (*MAPK activated proteinkinase2*) weitergeleitet werden kann (Ludwig et al. 1996; Baldassare et al. 1999). Ähnlich wie die ERK MAP Kinasen, so erfolgt auch die Aktivierung von p38 über die duale Phosphorylierung des Thr-Glu-Tyr Aktivierungsmotives (Raingeaud et al. 1995; Whitmarsh and Davis 1996). MKK3 aktiviert präferentiell p38 α und p38 β , während MKK6 alle p38 Isoformen zu aktivieren vermag (Enslen et al. 1998). Am Ende der Kaskade kann die Phosphorylierung kleiner zytoplasmatischer Hitzeschockproteine wie Hsp27 stehen (Cano and Mahadevan 1995; McLaughlin et al. 1996), welches z. B. Veränderungen des Aktinzytoskeletts hervorruft (Guay et al. 1997). Aber auch nukleäre Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP-response element binding protein*), SRF (*serum response factor*) oder ATF-2 (*activating transcription factor-2*) werden transaktiviert (Tan et al. 1996; Xing et al. 1998). p38 α ist bislang das einzige Gen der p38 MAPK Familie, das in der Maus eliminiert wurde. Im Gegensatz zu Deletionen einzelner Mitglieder der ERK, aber auch der SAPK/JNK Familie, führt das Fehlen von p38 α aufgrund mangelnder Produktion von Erythropoietin zur embryonalen Letalität (Adams et al. 2000; Tamura et al. 2000).

2.3.3 SAPK (Stressaktivierte Proteinkinase)/JNK (c-Jun N-terminale Kinase)

2.3.3.1 Aktivierung der SAPK/JNK Kaskade

Biochemische Studien führten 1990 zur Identifikation und Aufreinigung von SAPK/JNK als eine Mikrotubuli-assoziierte Proteinkinase, die durch den Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid aktiviert werden konnte (Kyriakis and Avruch 1990) (Abb. 4). Darüber hinaus können Stressinduktoren, wie proinflammatorische Zytokine, Interleukine, TNF- α (*tumour necrosis factor- α*), LPS (Lipopolysaccharid), aber auch Apoptose induzierende Stimuli (z. B. Ceramide), Umweltstress oder toxische Agenzien zu einer Aktivierung dieses Signalweges führen. Daneben ist, wenn auch in geringeren Maßen, eine Rekrutierung durch mitogene Stimuli, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, möglich (Garrington and Johnson 1999; Tibbles and Woodgett 1999). SAPK/JNK Kinasen partizipieren an zahlreichen zellulären Reaktionen. Es konnten Effekte bei der Regulation des Wachstums, der Zellproliferation, der

Immunantwort, der onkogenen Transformation, der Embryonalentwicklung, der Reparatur von DNA-Schäden, der Veränderung von Zelloberflächenstrukturen des Aktinzytoskeletts, der Entwicklung von Photorezeptoren sowie bei apoptotischen oder Überlebensprozessen, beobachtet werden (Ip and Davis 1998). In höheren Eukaryonten werden die SAPK/JNK Proteinkinasen durch mindestens drei Gene kodiert: während die Expression von *jnk1* und *jnk2* ubiquitär ist, beschränkt sich die Verbreitung von *jnk3* auf Gehirn, Herz und Testis. Zwei Formen des alternativen Spleißens führen zur Ausprägung unterschiedlicher Isoformen dieser drei *jnk* Gene (JNK1 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$; JNK2 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$; JNK3 α,β) (Gupta et al. 1996). Diese 10 verschiedenen Genvarianten kodieren 46 kDa bzw. 55 kDa großen Proteinisoformen, die Unterschiede in ihrer Substratspezifität und gewebespezifischen Expressionen aufweisen können (Gupta et al. 1996).

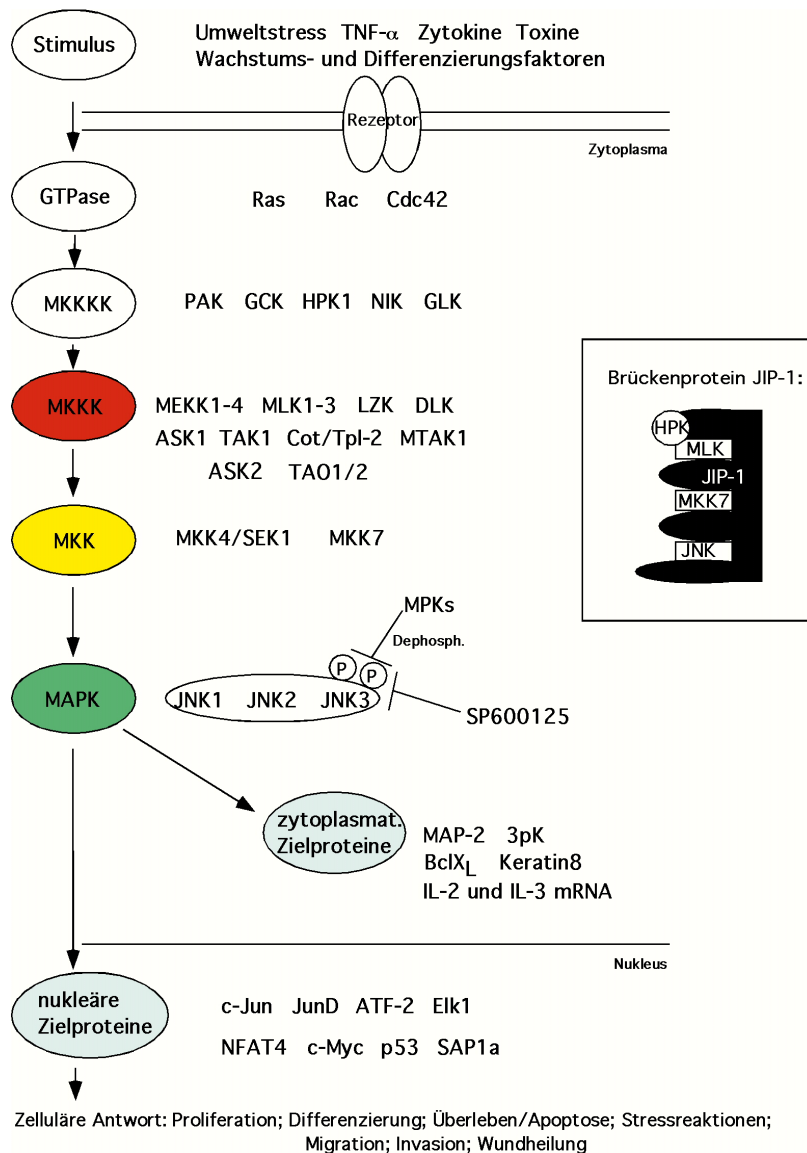


Abb. 4 Übersicht über Stimuli, Komponenten und Funktionen der SAPK/JNK Signalkaskade

Eine ausführliche Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.

Auch die SAPK/JNK Signalkaskade ist hierarchisch aufgebaut (Abb. 4). Im Vergleich zur gut charakterisierten ERK Kaskade bestehen im Falle der Stress-aktivierten SAPK/JNKs bislang noch Schwierigkeiten, eine exakte Signalabfolge oberhalb von SAPK/JNK und seiner MAPK Kinasen zu beschreiben. Dieses mag vor allem an der großen Zahl der MAPKKs, den Ste20 Homologen, den PI-3 Kinasen (*phosphoinositol-3*), den CAM-Kinasen (Ca^{2+} /*Calmodulin-dependent*), den Tyrosinkinase (z. B. c-Abl und PYK-2) und den kleinen GTPasen, die an der SAPK/JNK Kaskade partizipieren, liegen (Ip and Davis 1998). Eine klare Definition der beteiligten Komponenten ist nur dann möglich, wenn ein ganz spezifischer Stimulus in einem bestimmten Zellsystem verfolgt wird. Die gegensätzlichen Befunde zwischen einzelnen wissenschaftlichen Publikationen reflektieren dabei häufig nur die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme. Als Rezeptoren oberhalb der SAPK/JNK Kaskade fungieren sowohl G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren als auch membranassoziierte Rezeptoren (RTKs) (Liu et al. 1996; Natoli et al. 1997). GTP beladenes Rac und Cdc42 konnten als wichtige Intermediate identifiziert werden, die zum einen PAK Kinasen (MAPKKK; *p21-activated kinase*) stimulieren (Whitmarsh and Davis 1996). Weitere Daten weisen aber auch MLK Kinasen (*mixed lineage kinase*) als Effektoren der kleinen GTPasen aus (Teramoto et al. 1996a; Teramoto et al. 1996b). Daneben wurden Interaktionen zwischen Rac1 oder Cdc42 mit MEKK1 sowie MEKK4 nachgewiesen (Fanger et al. 1997b). PAK Kinasen werden zu den Ste20 Homologen (*sterile20*) gezählt, einer Gruppe, die auch GCK (*germinal center kinase*), GLK (*GCK-like kinase*), NIK (*Nck-interacting kinase*) und HPK (*hematopoietic progenitor kinase*) umfaßt (Minden et al. 1994; Burbelo et al. 1995; Zhang et al. 1995b), die ebenfalls Aktivatoren der SAPK/JNK Signalkaskade darstellen. PAKs vermitteln daneben auch Signale an die p38 Kaskade (Fanger et al. 1997a). Lange Zeit konnte eine direkte regulatorische Beziehung zwischen den Ste20 Proteinhomologen und MAPKKK MEKK (*mitogen-activated protein ERK kinase kinase*) biochemisch nicht nachgewiesen werden (Fanger et al. 1997a). Erst kürzlich wurde nun eine *in vivo* Assoziation von endogenem GCK und MEKK1 gezeigt. Interessanterweise induzierte GCK hierbei jedoch keine signifikante Phosphorylierung von MEKK1, sondern stimulierte vielmehr dessen Autophosphorylierung (Chadee et al. 2002). Unterhalb der Ste20-ähnlichen MAPKKKs können eine Reihe von MAPKKs in der SAPK/JNK Kaskade fungieren (Barr and Bogoyevitch 2001): MEKK1-4 (Lange-Carter et al. 1993; Blank et al. 1996; Gerwins et al. 1997), Tpl2/Cot (*tumour progression locus2/ cancer osaka thyroid*) (Aoki et al. 1991; Hagemann et al. 1999), MLK1-3, DLK und LZK (Dorow et al. 1993; Ing et al. 1994; Dorow et al. 1995; Fan et al. 1996; Sakuma et al. 1997), MTAK1 (*MAP three kinase1*) (Hirose et al. 1995), TAK1 (*TGFβ-*

activated kinase) (Shirakabe et al. 1997), ASK1 (*apoptosis-regulating kinase /MAPKKK5*) (Tobiume et al. 1997), ASK2 (MAPKKK6) (Wang et al. 1998b), TAO1/2 (*thousand and one amino acid kinases1/2*) (Hutchison et al. 1998). Viele der beschriebenen MAPKKKs können mehr als nur eine MAP Kinase Kinase aktivieren. Zusätzlich ist für einige auch noch eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges beschrieben worden (Mercurio and Manning 1999b; Mercurio and Manning 1999a; Mercurio et al. 1999). Ob es sich bei allen aufgelisteten Proteinen um physiologische Regulatoren der SAPK/JNK Signalkaskade handelt, ist sehr umstritten, da die meisten Daten auf Überexpressionsstudien in Zellsystemen beruhen (Davis 2000). Da redundante Funktionen der MAPKKKs nicht ausgeschlossen werden können, sind Analysen von kombinatorischen Deletionen dieser Gene in Mäusen, unausweichlich. Die Kinasen MKK4/SEK1 (*SAPK/ERK kinase*) und MKK7 repräsentieren die dualspezifischen Kinasen dieser Kaskade und können SAPK/JNK direkt phosphorylieren (Sanchez et al. 1994; Derijard et al. 1995; Minden et al. 1995). Beide Kinasen kooperieren dabei, da MKK4 bevorzugt Tyr-185 und MKK7 hauptsächlich Thr-183, innerhalb des Aktivierungsmotives Thr-Pro-Tyr von SAPK/JNKs zu phosphorylieren vermag (Lawler et al. 1998). Maximale Aktivität von SAPK/JNK Kinasen kann nur durch die Phosphorylierung beider Aminosäurereste erreicht werden (Fleming et al. 2000). Beide MAPKKs unterscheiden sich in ihren Aktivierungsstimuli: während TNF- α und IL-1 zu einer starken MKK7 Phosphorylierung führen, haben diese Stimuli nur einen schwachen Effekt auf MKK4. Umgekehrte Verhältnisse gelten für Umweltstress (Lu et al. 1997; Moriguchi et al. 1997; Yao et al. 1997; Foltz et al. 1998). Während MKK4 auch als p38 Aktivator dient, bindet MKK7 ausschließlich an SAPK/JNKs (Ip and Davis 1998). Alternatives Spleißen führt zur Ausbildung von sechs MKK7 Isoformen, die sich in ihrer Affinität zu den einzelnen SAPK/JNK Kinasen unterscheiden (Tournier et al. 1999).

SAPK/JNKs, wie auch die anderen MAP Kinasen, werden durch Phosphorylierung aktiviert. Hieraus folgt, dass Intensität und Dauer eines aktivierenden Signals kritische Parameter für biologische Effekte sind. Die Rekonstruktion einer Balance nach Aktivierung einer Signalkaskade durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk von Proteinphosphatasen gilt daher als essentieller Bestandteil jedes Signalweges (Keyse 2000). Signaldauer und -stärke können auf mehreren Ebenen der Kaskaden durch Phosphatasen negativ reguliert werden (Hunter 1995). Den MAP Kinasen als Endglieder dieser Signaltransduktionswege kommt dabei eine ganz besondere Bedeutung zu. Phosphatasen, die in der Lage sind MAP Kinasen zu inaktivieren, setzen sich aus den Tyrosin-spezifischen, den Serin/Threonin-spezifischen sowie den dualspezifischen Threonin/Tyrosin Proteinphosphatasen zusammen. SAPK/JNKs

werden durch Mitglieder der MAP Kinase Phosphatasen (MKP) inaktiviert (Abb. 2.4). Einige MKPs regulieren daneben auch die Aktivität von MAP Kinasen des ERK bzw. p38 Signalweges (Chu et al. 1996; Whitmarsh and Davis 1996). Verschiedene Isoformen dieser MKPs unterscheiden sich in ihrer Selektivität gegenüber den einzelnen SAPK/JNK Kinasen (Neel and Tonks 1997) und in ihrer zellulären Verbreitung (Keyse 2000). Sie werden daher in zwei Klassen unterteilt: die Gruppe der durch Wachstums- oder Stress-induzierbaren Gene kodierten nukleären Phosphatasen steht den bevorzugt zytoplasmatisch lokalisierten Enzymen gegenüber. Letztere werden auch nicht durch „*immediate early*“ Gene kodiert (Keyse 2000). Trotz der Unterschiede zeigen beide Gruppen eine vergleichbare Grundstruktur, die aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne sowie einer am C-Terminus lokalisierten katalytischen Domäne besteht. Die Substratspezifität wird durch eine spezifische Interaktion der MKP mit dem nicht-katalytischen N-Terminus der MAP Kinase erzielt (Camps et al. 2000; Keyse 2000). Die Interaktion zwischen der spezifischen MAP Kinase und ihrer Phosphatase scheint dabei essentiell für das Erreichen der katalytischen Aktivierung der Phosphatase selbst zu sein (Keyse 2000). Daneben kann, wie im Fall von beispielsweise MKP-1, die Expression durch die Stimulierung von SAPK/JNK induziert werden (Bokemeyer et al. 1996). *mkp-1^{-/-}* Mäuse zeigten keinen ausgeprägten Phänotyp, ein Hinweis, der auf redundante Funktionen der MKP-Proteine schließen läßt (Dorfman et al. 1996). Neben den Phosphatasen existieren jedoch noch weitere Proteine, die ebenfalls eine SAPK/JNK Aktivierung inhibieren: GPS2 (*G-protein pathway suppressor-2*) hemmt die SAPK/JNK Aktivierung durch TNF (Jin et al. 1997). Hsp72 (*heat shock protein72*) vermag Stress-induzierte SAPK/JNK Aktivität und damit verbundene Apoptoseprozesse zu regulieren (Park et al. 2001). Das Onkoprotein Evi1 agiert ebenfalls inhibitorisch und unterbindet gleichfalls den durch Stress-stimulierten Zelltod (Kurokawa et al. 2000). p21^{WAF1/Cip1}, überexprimiert in 293 Zellen, fungiert als *in vivo* Inhibitor aller SAPK/JNK Isoformen (Shim et al. 1996). Es inhibiert hierbei nicht nur die intrinsische katalytische Aktivität von SAPK/JNK, sondern hemmt zusätzlich auch dessen Phosphorylierung durch MKK4 (Shim et al. 1996). Neben dieser direkten Inhibierung der SAPK/JNK Kinasen kann p21 des Weiteren Einfluß auf den Aktivierungstatus der MAP Kinase nehmen, indem es weiter oberhalb in der Kaskade die Aktivierung von ASK1 unterdrückt (Asada et al. 1999). Die Suche nach spezifischen synthetischen Inhibitoren der SAPK/JNK Kinasen blieb viele Jahre erfolglos. Erst kürzlich gelang es einen vielversprechenden Inhibitor (SP600125) zu identifizieren (Bennett et al. 2001) (Abb. 2.4). Darüber hinaus bietet die Firma ALEXIS Biochemicals® zusätzliche zellpermeable spezifische Peptidinhibitoren gegen SAPK/JNK an (Bonny et al. 2001).

2.3.3.2 Die biologische Funktion der SAPK/JNK Signalkaskade

Eng mit der Untersuchung der SAPK/JNK Signalwege ist die Suche nach ihrer biologischen Funktion *in vivo* verknüpft. Die Studien erfolgen auf zweierlei Arten: der traditionellen biochemische Versuch soll die Bedeutung der SAPK/JNK Kaskade durch Identifikation ihrer spezifischen Substrate bzw. Aktivatoren erklären. Hierbei konnten als Substrate vor allem Transkriptionsfaktoren beschrieben werden, die einen Einfluß der SAPK/JNK Kinasen auf die Genexpression andeuten (Abb. 4). SAPK/JNKs, wie aus dem Namen hervorgeht, sind in der Lage, an die N-terminale Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktor c-Jun zu binden (Adler et al. 1992), um dort die Aminosäurereste Ser-63 und Ser-73 zu phosphorylieren und damit letztendlich dessen transkriptionelle Aktivität zu erhöhen (Jang et al. 1991; Pulverer et al. 1991; Hibi et al. 1993). Phosphorylierung der selben Serinreste führt aber auch zu einer gesteigerten c-Jun Stabilität, wodurch in den Zellen der Grundgehalt an c-Jun leicht gesteigert wird (Musti et al. 1997). c-Jun, eine Komponente des AP-1 (Aktivator Protein-1) Komplexes, ist an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, die von Zellproliferation und -differenzierung, bis hin zur neoplastischen Transformation reichen. Aktivierung von c-Jun führt zur Expression von Genen mit AP-1 Bindestellen innerhalb ihres Promoters. Das Translationsprodukt des „*immediate early*“ Gens *c-jun* formt mit verwandten Proteinen (JunD und JunB), aber auch mit verschiedenen Mitgliedern der Fos Familie Heterodimere und bildet so den AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex (Bravo 1990), der eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Zellwachstums spielt (Angel and Karin 1991; Schreiber et al. 1999). Überexpression von c-Jun transformiert embryonale Hühnerfibroblasten (Bos et al. 1990). Des Weiteren wird c-Jun für die Transformation von Fibroblasten durch eine Vielzahl von Onkogenen benötigt (Lloyd et al. 1991; Smeal et al. 1991; Rapp et al. 1994). Neben c-Jun sind auch JunB und JunD Substrate der SAPK/JNK Kinasen (Kallunki et al. 1996) und auch die Transkriptionsfaktoren ATFa und ATF-2 (Bocco et al. 1996; Ip and Davis 1998) werden durch sie phosphoryliert. ATF-2 heterodimerisiert mit c-Jun und stimuliert somit letztendlich auch die Expression des *c-jun* Gens (van Dam et al. 1995). 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* Promoter positiv regulieren, erhöht dieses wiederum den Anteil des Proteins am AP-1 Komplex (Karin et al. 1997). Elk-1 ist daneben auch ein Target der ERK Kaskade, während ATF-2 des Weiteren durch p38 induziert werden kann; eine Tatsache, die auf Konvergenz (*cross-talk*) zwischen den einzelnen MAP Kinase Signalwegen, auf Stufe der

Transkriptionsfaktoren, hinweist (Zinck et al. 1995). SAPK/JNKs können auf der anderen Seite jedoch auch die transkriptionelle Aktivität von Transkriptionsfaktoren reprimieren, indem sie, wie im Falle von NFAT 4 (*nuclear factor activated T-cells 4*), durch Phosphorylierung dessen Translokation in den Zellkern aktivierter T-Zellen verhindern (Chow et al. 1997). Allerdings konnte der Effekt bislang nur für diese spezifische Isoform von NFAT beschrieben werden. Ein weiterer möglicher Interaktionspartner ist das Tumorsuppressorgen p53. Phosphorylierung durch SAPK/JNKs konnte sowohl für menschliches als auch murines p53 nachgewiesen werden (Milne et al. 1995; Fuchs et al. 1998a). Die alleinige Bindung von SAPK/JNK an p53 führt zu einer Destabilisierung von p53, indem sie die Ubiquitinierung fördert (Fuchs et al. 1998a). Wird p53 durch SAPK/JNK jedoch phosphoryliert, so erfolgt eine Inhibierung des Degradationsprozesses, die Stabilität von p53 wird folglich erhöht (Fuchs et al. 1998b). Die biologische Funktion von p53 als ein Zielprotein der SAPK/JNK Kaskade ist bislang noch unerforscht. Da c-Jun den p53 Promoter reprimieren kann, wäre es ebenfalls denkbar, dass SAPK/JNKs die Transkription des p53 Gens regulieren (Schreiber et al. 1999). Unklar ist auch die *in vivo* Funktion, die eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Myc durch SAPK/JNKs besitzt (Noguchi et al. 1999). c-Myc selbst gilt als einer der Schlüsselregulatoren für proliferative Prozesse, Zelldifferenzierung und Apoptose (Blackwood et al. 1992). Mit Intensivierung der Analysen der SAPK/JNK MAP Kinase Familie wurde deutlich, dass das Substratspektrum dieser Kinasen nicht nur auf Transkriptionsfaktoren oder andere nukleäre Proteine limitiert ist. Wie im Falle der anderen MAP Kinasen ERK und p38, so gilt auch für SAPK/JNK Kinasen, dass nach ihrer Phosphorylierung ein Teil im Zytoplasma bzw. in anderen zellulären Kompartimenten verbleibt, um dort ebenfalls Zielproteine zu modifizieren. Beispielsweise werden 3pK (Ludwig et al. 1996) und MAP-2 (Kyriakis and Avruch 1990) als Substrate erkannt. Daneben tragen SAPK/JNKs zur Stabilisierung der IL-3- (Ming et al. 1998) und der IL-2- mRNA aktivierter T-Zellen bei (Chen et al. 2000). Sie regulieren somit die Genexpression auch über post-transkriptionelle Mechanismen. Phosphorylierung des intermediären Filamentkeratinproteins 8 trägt vermutlich zur Regulation des SAPK/JNK Signalweges bei und/oder reguliert die Keratindynamik (He et al. 2002). Aktive SAPK/JNK Kinasen können auch zu den Mitochondrien translozieren, um das vor Apoptose schützende Protein Bcl-X_L zu phosphorylieren und zu inaktivieren (Kharbanda et al. 2000). In der Folge kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, was weitere apoptotische Vorgänge induziert.

2.3.3.3 Genetische Deletion von SAPK/JNK Kinasen und anderen Komponenten der sie regulierenden Signalkaskade

Eine alternative Methoden, um die Funktion von SAPK/JNKs zu entschlüsseln, besteht in der Verwendung von Tiermodellen wie Maus oder Taufliegen. Deletionen jeweils eines der drei *jnk* Gene in Mäusen führte in keinem der Fälle zu einem letalen Phänotyp, was als Hinweis gewertet werden kann, dass umfangreiche Komplementationen zwischen den einzelnen *jnk* Genen bestehen. *jnk1^{-/-}* oder *jnk2^{-/-}* Mäuse zeigten auch keine morphologischen Veränderungen, wohl aber Defekte in der Funktion ihrer T-Zellen (Constant et al. 2000). SAPK/JNK Kinasen stellten sich als ein essentielles Enzym heraus, das benötigt wird, um die Differenzierung von CD4 T-Helferzellen in Effektorzellen zu gewährleisten (Dong et al. 1998; Dong et al. 2000). *jnk3^{-/-}* Mäuse entwickelten sich ebenfalls vollkommen normal, allerdings konnten Defizite bei der durch Excitotoxizität ausgelösten Apoptose im Hippocampus beobachtet werden (Yang et al. 1997). Um die Komplementationen von *jnk* Genen zu umgehen, wurden für zusätzliche Studien Doppel-Knockout Mäuse etabliert. *jnk1^{-/-}/jnk3^{-/-}* und *jnk2^{-/-}/jnk3^{-/-}* defiziente Tiere entwickelten sich hierbei gänzlich normal (Kuan et al. 1999; Sabapathy et al. 1999b), während die gleichzeitige Mutation von *jnk1* und *jnk2* zum frühen embryonalen Tod der Tiere führte, da im Verlaufe der Gehirnentwicklung Defekte in der Apoptoseregulation ein Schließen des Neuralrohrs verhinderten (Kuan et al. 1999) (Sabapathy et al. 1999a; Sabapathy et al. 1999b). Folglich ist diese SAPK/JNK Funktion essentiell für die Entwicklung, aber nicht auf bestimmte Isoformen beschränkt. Primäre Mausembryofibroblasten (MEF), die aus den *jnk1^{-/-}/jnk2^{-/-}* Doppel-Knockout Mäusen in Kultur genommen wurden (da sich die Verbreitung von JNK3 auf Herz, Gehirn und Testis beschränkt, fehlt in diesen Fibroblastenzellen somit jegliche JNK Expression), wiesen eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose-induzierende Stimuli, wie beispielsweise UV-Bestrahlung oder Anisomycin auf. Eine Aktivierung von essentiellen Effektorcaspasen wurde verhindert (Tournier et al. 2000). Diese SAPK/JNK defizienten Zellen zeigten des Weiteren Defekte in der AP-1 Aktivität, verminderte Proliferation und eine damit verbundene gesteigerte Expression von ARF, p53 und p21 (Tournier et al. 2000). Folglich kann SAPK/JNK nicht essentiell für die Zellviabilität sein, wird jedoch für viele Aspekte der Zellphysiologie benötigt. *mkk4* und *mkk7* sind beide für die embryonale Entwicklung nötig. Während die Ursache für den Tod der *mkk7^{-/-}* defizienten Embryos bislang noch nicht geklärt werden konnte (Dong et al. 2000), sterben *mkk4^{-/-}* Embryos durch verstärkte Apoptose in der Leber (Ganiatsas et al. 1998; Nishina et al. 1999). Dieser Phänotyp ist dem des *c-jun*

Knockout Embryos sehr ähnlich (Hilberg et al. 1993). Es gilt allerdings als unwahrscheinlich, dass Defekte in der c-Jun Phosphorylierung zum *mkk4^{-/-}* Phänotyp beitragen, denn Entfernung der SAPK/JNK Phosphorylierungsstellen in c-Jun verursachen keine embryonalen Abnormalitäten (Behrens and Franz 1996).

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* besitzt ebenfalls eine Isoform von Jun (D-Jun), SAPK/JNK (D-JNK; Basket; Bsk) und den direkten Aktivator von SAPK/JNK Hemipterous (Hep; Ortholog von MKK7). Da Nukleotidsequenzen der Kinasen und die Signalwege große Homologien zu Säugetierzellen aufweisen, repräsentieren Fliegen, neben Mäusen, ebenfalls ein geeignetes genetisches Modell, um die SAPK/JNK Kaskade näher zu charakterisieren. Genetische Studien in *Drosophila* demonstrierten hierbei eine Notwendigkeit von D-JNK in der embryonalen Epithelzellbewegung sowie der Organisation der planaren Polarität, Funktionen, die beim dorsalen Schließen (*dorsal closure*) und Thoraxschließen (*thorax closure*) zum Tragen kommen (Ip and Davis 1998). Während des Prozesses des dorsalen Schließens sorgt D-JNK für die D-Jun Phosphorylierung, was letztendlich die Expression des zur TGF- β (*tumour growth factor- β*) Proteinfamilie zählenden Dpp (*decapentaplegic*) Liganden in den Saumzellen (*leading edge cells*) des lateralen Epithelzellblattes, hervorruft. Dpp ist seinerseits erforderlich, um eine Elongation und Verbreitung der lateralen Epithelzellen zu gewährleisten, damit die Amnioserosa auf der dorsalen Oberfläche des sich entwickelnden Embryos bedeckt wird (Stronach and Perrimon 1999; Davis 2000). Der Verlust eines der oben genannten Proteine reicht aus, um diese morphologischen Prozesse unvollständig ablaufen zu lassen: der betroffene Embryo zeigt auf seiner Dorsalseite ein Loch. Zusätzlich verursacht die Stimulierung von D-JNK eine Expression von Puc (*puckered*), eine dualspezifische Phosphatase, die in einer Rückkopplungsschleife (*feedback loop*) die Aktivität von D-JNK negativ reguliert (Glise and Noselli 1997; Riesgo-Escovar and Hafén 1997).

2.3.3.4 Die Rolle von SAPK/JNK gesteuerten Signalwegen bei der onkogenen Transformation

Bei der Tumorgenese handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der sich aus der Transformation von Zellen, ihrem invasiven Wachstum, der Angiogenese und Metastasierung zusammensetzt (Hanahan and Weinberg 2000). Hierbei zeigte sich, dass einzelne Komponenten des AP-1 Transkriptionsfaktors an vielen dieser Schritte beteiligt sind. Der AP-1 Transkriptionsfaktor setzt sich aus Homo- und Heterodimeren zusammen, die durch die Proteine der Jun-Familie (c-Jun, JunB und D), Fos (c-Fos, FosB, Fra1/2), Jun Dimerisierungspartner (JDP1/2) und den eng verwandten Faktoren (ATF-2, ATF-3 und B-ATF) gebildet werden (Shaulian and Karin 2001). Die Identifizierung von c-Fos und c-Jun als Säugerhomologe der retroviralen Onkoproteine v-Fos (van Straaten et al. 1983) und v-Jun (Maki et al. 1987) verknüpften Funktionen des AP-1 Transkriptionsfaktors mit zellulärer Wachstumskontrolle und Neoplasie. Aus der Familie der Jun Proteine vermag c-Jun als einziges Mitglied die Zellproliferation positiv zu regulieren, in dem es die Expression und Funktion von Tumorsuppressorgenen wie p53, p21^{WAF1/Cip1} und p16 inhibiert und parallel die Cyclin D1 Transkription induziert (Schreiber et al. 1999; Wisdom et al. 1999; Bakiri et al. 2000). Der Einsatz von anti-sense Oligonukleotiden spezifisch gegen *c-fos* oder *c-jun* gerichtet, kann die Proliferation von Mausfibroblasten unterbinden (Holt et al. 1986; Smith and Prochownik 1992). Die Aktivierung von AP-1 durch SAPK/JNK vermittelte c-Jun Phosphorylierung, deutet auf eine mögliche Verbindung zwischen der SAPK/JNK Kaskade und onkogener Zelltransformation hin. Ras-induzierte Transformation benötigt c-Jun (Johnson et al. 1996). Phosphorylierung von c-Jun durch Ras-abhängige Signalwege erfolgt auf den gleichen Aminosäuren, die auch SAPK/JNK Kinasen verwenden (Pulverer et al. 1991; Smeal et al. 1991). Mutationen dieser Phosphorylierungsstellen (Ser-63/Ser-73) innerhalb von c-Jun können die Ras-vermittelte Tumorgenität unterdrücken (Lloyd et al. 1991; Behrens et al. 2000). SAPK/JNKs liegen konstitutiv aktiv in verschiedenen Tumorzelllinien vor und die transformierende Wirkung einiger Onkogene ist SAPK/JNK-abhängig (Raitano et al. 1995; Xu et al. 1996; Dickens et al. 1997; Rodrigues et al. 1997; Tanaka et al. 1997). Expression einer dominant-negativen c-Jun Mutante (TAM 67) hemmt das Wachstum von Zellen, die durch Raf bzw. Raf-abhängige Onkogene transformiert wurden (Rapp et al. 1994). Obwohl also von einer Beteiligung der SAPK/JNK Kaskade an der Entstehung von Krebszellen ausgegangen werden darf, bleibt der exakte Mechanismus bislang unklar. Als gesichert gilt zumindest, dass während der Tumorentwicklung

SAPK/JNK-abhängige Apoptosevorgänge supprimiert werden müssen. Um dieses zu erreichen, stehen den Zellen folgende Möglichkeiten offen: Tumorzellen aktivieren Überlebenssignalwege, die über den SAPK/JNK vermittelten pro-apoptotischen Weg dominieren. Alternativ können die Zielproteine von SAPK/JNKs mutiert sein, in unterschiedlichen Mengen exprimiert oder post-translationell modifiziert werden und somit SAP/JNK-induzierte Apoptose verhindern. So wäre es ebenso denkbar, dass innerhalb einer Tumorzelle, z. B. durch den Verlust von p53 oder Rb (*retinoblastoma protein*) Signalwegen, die SAPK/JNK Aktivierung als ein anti-apoptotisches oder Wachstumssignal gewertet wird (Davis 2000). Erst kürzlich konnte durch die Verwendung von SAPK/JNK anti-sense Oligonukleotiden gezeigt werden, dass SAPK/JNKs in primären und Tumorzellen verschiedene Funktionen besitzen. Diese Analysen belegten, dass SAPK/JNKs für die Stress-induzierte Apoptose von Zellen benötigt wird (Garay et al. 2000; Ho et al. 2000). Die SAPK/JNK anti-sense Oligonukleotide waren in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen zu inhibieren, indem sie Apoptoseprozesse aktivierten (Bost et al. 1999; Potapova et al. 2000a; Potapova et al. 2000b). Obwohl SAPK/JNKs relevant für die maligne Transformation erscheinen, wäre es auch denkbar, dass der Verlust der SAPK/JNK Aktivität die Onkogenese fördern könnte, indem SAPK/JNK-induzierte Apoptoseprozesse innerhalb transformierter Zellen verhindert werden. Dieses setzt jedoch voraus, dass Komponenten der SAPK/JNK Kaskade als Tumorsuppressoren fungieren können (Ip and Davis 1998). MKK4 wurde als ein Kandidat eines möglichen Tumorsuppressorgenes bzw. als ein mögliches Metastasensuppressoren beschrieben (Teng et al. 1997; Su et al. 1998).

2.3.3.5 Die Funktion von SAPK/JNK bei der Regulation apoptotischer Prozesse

Erste Studien, die sich mit der Rolle von SAPK/JNKs an Prozessen des programmierten Zelltods (Apoptose) befaßten, wurden in neuronalen PC12 Zellen nach Entzug von NGF (*neuronal growth factor*) durchgeführt (Xia et al. 1995). Hierbei konnte gezeigt werden, dass SAPK/JNKs Apoptose beschleunigen, und dass SAPK/JNK-abhängige Apoptose durch Aktivierung von Überlebenssignalen, wie beispielsweise ERK und Akt/PKB, supprimiert werden kann. Die Funktion von SAPK/JNKs in durch Stress-induzierten Zelltod neuronaler Zellen ließ sich auch in *jnk3^{-/-}* Knockout Mäusen bestätigen (Yang et al. 1997) (siehe auch Kapitel 2.3.3.3). Alles in allem sind die Daten über einen Zusammenhang zwischen SAPK/JNKs und Apoptose oft widersprüchlich. In einigen Zelltypen scheinen SAPK/JNKs

pro-apoptotisch zu wirken, während in anderen Zellen Überlebenssignale übermittelt werden. Die Doppeldeletion von *jnk1*^{-/-} zusammen mit *jnk2*^{-/-} führt zum frühen Tod der Embryos, da eine erhöhte Apoptoserate im Vorderhirn erfolgt, während gleichzeitig eine verminderte Apoptose im Kleinhirn zu beobachten ist (Kuan et al. 1999; Sabapathy et al. 1999b). In Jurkat-T-Zellen spielen SAPK/JNKs eine Rolle bei der durch Cdc42 und Rac Aktivierung induzierten Apoptose, während die Fas-vermittelte Apoptose in diesen Zellen durch eine Hemmung des SAPK/JNK Signalweges nicht geblockt werden kann. Auch für eine TNF- α vermittelte Apoptose ist SAPK/JNK Aktivität nicht essentiell (Whitmarsh and Davis 1996; Yang et al. 1997). Es fällt auf, dass die meisten Stimuli, die eine SAPK/JNK Aktivierung verursachen, keine Apoptoseschritte auslösen. Teilweise ist die Ursache hierfür in der Tatsache zu suchen, dass SAPK/JNK-vermittelte apoptotische Signale durch die Aktivierung von Überlebenssignalen (vermittelt über NF- κ B; Akt/PKB und ERK) inhibiert werden. Folglich ist es notwendig die Funktionen von SAPK/JNK Kinasen gleichzeitig immer im Zusammenspiel mit der Aktivität weiterer Signalwege, also dem biologischen Kontext, zu beurteilen (Xia et al. 1995). Die Balance zwischen Apoptose- und Überlebenssignalen definiert letztendlich, welchen Weg eine Zelle einschlägt. Des Weiteren spielen die Dauer des Signals, der Zelltyp und die Art der Stimulation eine gewichtige Rolle. Nur anhaltende, aber nicht vorübergehende (transiente) SAPK/JNK Aktivität verursacht Apoptose (Chen and Tan 2000). Viele Zytokine vermögen die SAPK/JNKs jedoch nur transient zu stimulieren, was folglich zu keiner Apoptoseinduktion führen kann (Liu et al. 1996). Man geht daher davon aus, dass die Zytokin-induzierte SAPK/JNK Aktivität Überleben signalisiert (Reinhard et al. 1997).

2.4 Regulierung der Spezifität von MAPK Signalkaskaden

Die Vielzahl beschriebener Proteininteraktionen zwischen den Mitglieder dieser Signalwege belegt, dass MAPK Signalkaskaden zwar linear strukturiert sind, es zwischen den einzelnen Kaskaden aber ein hohes Maß an *Crosstalk* gibt. Während auf der Ebene der MAPKK und MAPK in Relation wenige Proteine gefunden wurden (vgl. Abb. 2), zeigt sich eine große Variation an Proteinen und möglichen Interaktionen auf Stufe der MAPKKK sowie der Substrate der MAPKs. Es existieren hierbei zahlreiche Querverbindungen in Form von Kinasen, deren Substrate in verschiedenen Kaskaden liegen. So können beispielsweise MLK3 oder Cot sowohl MEK in der ERK Kaskade als auch MKK4 innerhalb des SAPK/JNK

Signalweges aktivieren (Hagemann et al. 1999; Hartkamp et al. 1999). Trotzdem verursacht die transiente Aktivierung eines MAPK Signalweges durch Zytokine in der Regel bevorzugt die Aktivierung einer MAPK Kaskade. Folglich bewirken spezifische Signale spezifische Zellantworten. Die Regulation diverser komplexer zellulärer Prozesse, ausgelöst durch eine Reihe von extrazellulärer Stimuli, mit Hilfe weniger MAP Kinasen, erfordert deshalb die Notwendigkeit, dass MAP Kinasen in ihrer Effizienz und Selektivität spezifisch sein müssen. Zellen haben daher verschieden Mechanismen entwickelt, die diese Spezifität gewährleisten sollen.

Eine wichtige Strategie besteht in der Formation von Komplexen, entweder zwischen einzelnen Komponenten des Signaltransduktionsweges selbst oder aber zwischen den Signalmolekülen und sogenannten Gerüst- oder Brückenproteinen (*scaffold protein*). So werden z. B. SAPK/JNKs durch das N-terminale Ende von MKK4 gebunden. Dieser Sequenzbereich wird aber ebenso bei der Interaktion mit der katalytischen Domäne von MEKK1 eingesetzt (Christerson et al. 1999). Nach erfolgter Phosphorylierung der unterhalb agierenden Kinase wird die Interaktion zwischen Substrat und Kinase sofort wieder aufgehoben (Xia et al. 1998; Cheng et al. 2000; Chang and Karin 2001). Die Signalamplifikation und die Spezifität wird bei diesem Prinzip nicht beeinträchtigt, während beim Einsatz von Brückenproteinen die Spezifität auf Kosten der Signalamplifikation verstärkt wird. Gerüstproteine wurden in unterschiedlichen Organismen für diverse Kaskaden beschrieben. Sie sind für die Ausbildung von Multienzymkomplexen verantwortlich, indem sie gleichzeitig einzelne Kaskadenmitglieder, in manchen Fällen sogar Isoform-spezifisch, binden und in räumliche Nähe zu einander bringen. Ihre Existenz wurde erstmalig in *S. cerevisiae* als Bestandteile des Pheromonesignalweges (Gerüstprotein: Ste5p) und der osmoregulatorischen Signalkaskade (Gerüstprotein: Pbs2p) beschrieben (Whitmarsh et al. 1998; Whitmarsh and Davis 1998). Interessanterweise handelt es sich, im Gegensatz zu Ste5p, bei Pbs2p, selbst um eine Proteinkinase, die an der Signalkaskade partizipiert. Man spricht daher auch von einem intrinsischen Gerüstprotein (*intrinsic scaffold*). Die Suche nach analogen Brückenproteinen in höheren Eukaryonten führte zur Isolierung von Proteinen der JIP Familie (*SAPK/JNK interacting protein*). JIP-1 und JIP-2, beides strukturell eng verwandte Proteine, vermögen gleichzeitig MLK2/3, und daran gebundenes HPK, sowie MKK7 und SAPK/JNK1/2 zu binden (Whitmarsh et al. 1998; Yasuda et al. 1999) (siehe nebenstehenden Ausschnitt in Abb. 2.4). Neben einer SH3-Domäne mit bislang unbekannter Funktion besitzen sie eine PTB-Domäne (*phosphotyrosine binding domain*). Von ihr weiß man, dass sie u. a. mit p190 RhoGEF (Meyer et al. 1999) interagiert. Die Überexpression von

JIP-1 hält, trotz Anwesenheit von induzierender Stimuli, SAPK/JNKs im Zytoplasma zurück. Folglich ist die Balance zwischen den Proteinkinasen und den Scaffoldmolekülen kritisch für eine Aktivierung bzw. Inhibierung von Kinasen (*combinatorial inhibition*: (Levchenko et al. 2000)). JIP-1 und JIP-2 werden hauptsächlich in den β -Zellen des Insulin-sezernierenden Pankreas sowie in Neuronen exprimiert (Yasuda et al. 1999; Pellet et al. 2000). Neben der Tätigkeit als Gerüstprotein in der SAPK/JNK Signalkaskade, interagieren JIP-1 und JIP-2 mit dem Mikrotubulin-Motorprotein Kinesin-1 (Verhey et al. 2001; Whitmarsh et al. 2001). Beide Proteine fungieren damit letztendlich als Adapterproteine, die die Lokalisation vieler unterschiedlicher Moleküle organisieren können, da sie durch den von Kinesin vermittelten Transport, verschiedene Zelllokalisationen erreichen können. Zwei mit dem JIP-1 verwandte Proteine, IB1 und IB2 (*islet brain 1/2*), tragen eine spezifische Insertion von 46 Aminosäuren nahe des C-Terminus, die ihnen eine nukleäre Lokalisation ermöglicht. Im Gegensatz zu den anderen bekannten JIP Proteinen konnte daher für IB1 und IB2 eine Funktion als Transkriptionsfaktoren, die die Expression des Insulingens und des Glucosetransportergens (*GLUT2*) regulieren, beschrieben werden (Bonny et al. 1998; Negri et al. 2000). Obwohl JIP-3 ebenso SAPK/JNK, MKK7 und Mitglieder der MLK3 Familie zu binden vermag, bestehen strukturelle Unterschiede (Kelkar et al. 2000). Eine Splicevariante von JIP-3, JSAP, interagiert mit SAPK/JNKs, MKK4 und MEKK1 (Ito et al. 1999). Die Verwendung unterschiedlicher Mausstämmen lieferte bei der Etablierung von *jip-1*^{-/-} Mäusen kontroverse Daten. Während in einer Studie die Elimination von *jip-1* bereits nach wenigen Zellteilungen zum Tod der Blastozysten führte (Thompson et al. 2001), beschreiben andere Untersuchungen lediglich eine fehlerhafte Regulation der SAPK/JNK Aktivität in Neuronen des Hippocampus nach der Behandlung mit Excitotoxinen (Whitmarsh et al. 2001). Da diese Tiere nicht an Diabetes erkrankten, kann von Komplementationen innerhalb der JIP-Familie ausgegangen werden. Das an Aktinfilamente-bindende Protein Filamin (ABP280) fungiert gleichfalls als ein Gerüstprotein im Zytokinrezeptor-Signalweg, der durch Interaktion von MKK4 und TRAF2 zur SAPK/JNK Aktivierung führt (Marti et al. 1997; Leonardi et al. 2000). β -Arrestin-2 rekrutiert ein SAPK/JNK Signal bestehend aus ASK1, MKK4 und SAPK/JNK3 (McDonald et al. 2000). CrkII hält den Multienzymkomplex bestehend aus p130Cas, MKK4 und SAPK/JNKs zusammen. Die Bindung der SH3-Domäne an das Prolin-reiche Motiv innerhalb der SAPK/JNK Sequenz ist dabei essentiell für die SAPK/JNK Aktivierung durch Rac1 (Girardin and Yaniv 2001). Für den ERK Signalweg konnte MP1 (MEK Partner1) identifiziert werden, das MEK1 und ERK1 bindet und somit deren Aktivierbarkeit durch C-Raf erhöht (Schaeffer et al. 1998). KSR (*kinase suppressor of Ras*) (Kornfeld et al. 1995)

lokalisiert MEK in einer Ras-abhängigen Reaktion an die Plasmamembran und fördert so den Aufbau eines Multiproteinkomplexes. Hierbei wird MEK in große räumliche Nähe zu seinem Aktivator C-Raf und seinem unterhalb in der Kaskade liegenden Substrates ERK gebracht (Morrison 2001). Interessanterweise ist KSR in nicht-stimulierten Zellen ausschließlich im Zytosol lokalisiert. Nach erfolgter Aktivierung durch Ras transloziert jedoch ein Teil der KSR Fraktion an die Plasmamembran (Morrison 2001).

Eine weitere Möglichkeit die Spezifität einer Signalkaskade zu erhöhen, besteht mit dem Einsatz von sogenannten Ankerproteinen. Diese lotsen ihre Bindungspartner zu spezifischen subzellulären Kompartimenten oder Substraten. Hierzu zählen u. a. die Komponenten des I- κ B Kinase Komplexes, die Familie der RACK Proteine (*Receptor of activated C kinase*) oder AKAP (*A-kinase-anchoring protein*) (Pawson and Scott 1997; Whitmarsh and Davis 1998). Proteine des Zytoskeletts fungieren als Anker und kolokalisieren mit MEKK1 (Christerson et al. 1999). Umlagerungen des Zytoskeletts verursachen daher gleichzeitig eine Stimulierung der MEKK1 Aktivität (Xia et al. 1998). Des Weiteren besitzen die physiologischen Substrate der MAP Kinasen spezifische Bindungsstellen (*docking site*), die meist in einiger Entfernung zum eigentlichen Phosphorylierungsmotiv liegen und eine starke Interaktion mit der selektiven MAPK Subfamilie ermöglichen, während sie andererseits die Bindung zu weiteren MAP Kinasen verhindern (Kyriakis and Avruch 2001). Zusätzlich besitzen die MAP Kinasen ihrerseits eine komplementäre Bindungssequenz, die mit der MAPK Bindungsdomäne des Substrates interagiert kann (Kyriakis and Avruch 2001). Somit ist eine klare Substratspezifität innerhalb der Proteinkinasefamilie gewährleistet (Schlüssel-Schloss-Prinzip), die ein vermeintlich breit gefächertes *in vitro* Substratrepertoire aufweist. Daneben sind MAP Kinasen auch in der Lage, indirekt die Expression von Liganden oder Inhibitoren für Membranrezeptoren zu regulieren. Diese positiven oder negativen autokrinen Schleifen (*loops*) können ebenfalls ein spezifisches MAPK Aktivierungsmuster generieren (Wasserman and Freeman 1998).

2.5 Gegenstand der Arbeit

Die SAPK/JNK Signalkaskade wird mit einer Reihe von Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht: neben zahlreichen Krebsformen (Davis 2000) deuten erste Untersuchungen auch auf eine Beteiligung von SAPK/JNK an Diabetes (Bonny et al. 2000; Ho et al. 2000), Herz-Kreislauf Erkrankungen bzw. entzündlichen Reaktionen des Herzen und der Nieren (Wang et al. 1998a; He et al. 1999; Garay et al. 2000) sowie neurodegenerativen Erkrankungen (Yang et al. 1997) hin. Folglich repräsentiert der SAPK/JNK Signaltransduktionsweg einen möglichen Angriffspunkt für die therapeutische Beeinflussung dieser Erkrankungen. Dies erfordert die Analyse, ob SAPK/JNK Kinasen tatsächlich direkt an der Entstehung dieser Krankheiten teilhaben und, wenn ja, welcher molekulare Mechanismus dem zugrunde liegt. Eine weitere fundamentale Frage die bislang nahezu ungeklärt blieb, besteht in der Untersuchung, wie Zellen eine SAPK/JNK Aktivierung, abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext, auf völlig konträre Weise interpretieren können (Überleben versus Apoptose). Die Etablierung von konstitutiv-aktiven SAPK/JNK Kinasen wäre eine große Hilfe bei der Beantwortung dieser Fragen. Allerdings schlugen in der Vergangenheit alle Versuche fehl, innerhalb der MAPK über Punktmutationen solche Proteine zu generieren. 1998 wurde erstmalig eine alternative Methode beschrieben, die durch die direkte Fusion von ERK2 mit seinem spezifischen Aktivator MEK1 zu einer konstitutiv-aktiven ERK2 MAP Kinase führte (Robinson et al. 1998). Analog dazu sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit eine konstitutiv-aktive SAPK/JNK Kinase etabliert werden und mit deren Hilfe der Einfluß von SAPK/JNK auf diverse physiologische Prozesse innerhalb von Säugerzellen untersucht werden. Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit der biochemischen Charakterisierung dieser konstitutiv-aktiven SAPK/JNK Mutante. Im zweiten Teil sind Daten zusammengestellt, die zum einen neue Aspekte über eine Beteiligung von SAPK/JNK an der morphologischen/onkogenen Transformation präsentieren. Zum anderen sind erste Experimente dargestellt, die eine Funktion von SAPK/JNK bei der Zellproliferation und Apoptose von Zellen bestätigen.

3. MATERIAL

3.1 Arbeitsmaterial

3.1.1 Geräte

| <u>Artikel</u> | <u>Firma</u> | <u>Artikel</u> | <u>Firma</u> |
|-----------------------------|------------------|-------------------|--|
| Analysenwaage | Sartorius | Mikroskop | Leica |
| Autoklav | Webeco | Mikrowelle | Siemens |
| Blottingkammer | Hoefer | Netzgeräte | Bio-Rad |
| Brutschränke | Memmert | Orbitalschüttler | BellcoBiot. |
| Brutschränke/Zellkultur | Heraeus | PCR Gerät | Perkin Elmer |
| Eismaschine | Scotsman | pH-Meter | WTW |
| Elektrophorese- material | MSZ, Bio-Rad | Phospho-Imager | Fuji |
| Exponierkassetten | Dr. Goos-Suprema | Photometer | Hitachi |
| Exsikkator | Sputnik | Pipettierhilfe | Eppendorf |
| FACS | Becton Dickinson | Pipetten | Gilson |
| Feinwaage | Mettler | Schüttelwasserbad | NewBrunsw. |
| Filmentwickler | Kodak | Sequencer | ABIPRIS377 |
| Fluoreszenzmikroskop | Leitz | Sterilbank | Heraeus |
| Gefrierschrank -20 °C | Liebherr | Tischzentrifuge | Eppendorf |
| Gefrierschrank -80 °C | Nunc | UV-Crosslinker | Hoefer |
| Grobwaage | Satorius | UV-Fotoanlage | Sony |
| Heizblöcke | Gebr. Liebisch | Vortex-Gerät | Scientific |
| Kühlschrank | Liebherr | Wasserbad | GFL |
| Kühlzentrifuge | Heraeus | Wecker | Roth |
| Luftschüttler | New Brunswick | Zählkammer | Burker |
| Magnetrührer | GLW | Zentrifugen | Heraeus, 1.0R, J2-HS, Beckmann, |
| Microlumat LB96P | EG&G Berthold | | |

3.1.2 Chemikalien

| <u>Artikel</u> | <u>Firma</u> | <u>Artikel</u> | <u>Firma</u> |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid, 40 % | Bio-Rad | Giemsa Stain | Sigma |
| Agar Select | Sigma | Glycerol | Sigma |
| Bacto-Agar | Difco | Glycerolphosphat | Sigma |
| Agarose, ultra pure | Gibco-BRL | Glycin | Sigma |
| Agarose | SeaPlaque | HEPES | Sigma |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma | IPTG | Roth |
| Ampicillin | Sigma | LB-Broth Base | Sigma |
| Anisomycin | Sigma | Natriumorthovanadat | Sigma |
| Aprotinin | Roth | Pepstatin A | Boehringer |
| Arsenit | Sigma | Ponceau S | Sigma |
| ATP | Sigma | Protein A-Agarose | Boehringer |
| [γ - ³² P]dATP | Amersham | Protein G-Agarose | Boehringer |
| Benzamidin | Sigma | Pefabloc | Roth |
| BES | Sigma | PBS | Gibco-BRL |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma | PIPES | Sigma |
| Bradford Reagenz | Biorad | PMSF | Fluka |
| Bromphenol Blau | Sigma | Polybrene | Sigma |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma | TB-Broth | Sigma |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma | TEMED | Sigma |
| Luciferin | Sigma | Tris Base | Sigma |
| EDTA | Sigma | Triton X-100 | Sigma |
| EGTA | Sigma | Trypan Blau | Sigma |
| β -Mercaptoethanol | Sigma | Tween 20 | Sigma |
| Ethidiumbromid | Gibco-BRL | Trizma Hydrochlorid | Sigma |
| Fettfreie Trockenmilch | Carnation | | |
| Allgemeine Laborchemikalien | Fluka; Merck; Roth; Sigma | | |

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Artikel

Blottingpapier, 3 MM, 190 g/m²
 Bottle Top Filter 0,22 µm
 Deckgläschen
 ECL-Hyperfilm
 Eppendorf Combitips
 Eppendorf-Gefäße 1,5 ml
 Frischhaltefolie
 Greiner-Röhrchen 15 ml, 50 ml
 Hybond-C extra 82 mm
 HyperfilmTM-MP
 Kulturschalen 9 cm
 Kulturschalen 15 cm
 Mullbinden
 Objektträger
 Parafilm
 Poly Screen PVDF Transfer Membran
 Polystyrenröhrchen 5 ml
 Protran Nitrozellulose Transfer-Membran
 Sterilfilter Millex-GS 0,22 µm
 Whatman-Rundfilter 8,5 cm

Firma

Schleicher & Schuell
 Nalge Nunc International
 Hartenstein
 Amersham
 Eppendorf
 Hartenstein
 Aldi
 Greiner
 Amersham
 Amersham
 Sarstedt
 Greiner
 Apotheke
 Hartenstein
 Hartenstein
 NENTM Life Science Products
 Sarstedt
 Schleicher & Schuell
 Millipore
 Whatman

3.1.4 Zellkulturmaterial

| | |
|---|-------------|
| Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) | Gibco-BRL |
| RPMI 1650 | Gibco-BRL |
| Fötales Kälberserum (FCS) | PAN Systems |
| Streptomycin und Penicillin | Gibco-BRL |
| Geneticin (G418) | Sigma |
| Hygromycin B | Sigma |
| Puromycin | Sigma |

| | |
|---------------------------------|-------------------|
| L-Glutamin | Gibco-BRL |
| Trypsin-EDTA | Gibco-BRL |
| Zellkulturflaschen und –schalen | Sarstedt; Greiner |
| Lipofectamine™ | Gibco-BRL |

3.1.5 Enzyme

| <u>Enzym</u> | <u>Firma</u> |
|---|-----------------------|
| Calf Intestinal Phosphatase (CIP) | NEB |
| Klenow Fragment | NEB |
| Proteinase K | Sigma |
| Restriktionsenzyme | MBI-Fermentas; NEB |
| DNaseI | Sigma |
| RNase A | Sigma |
| Taq-Polymerase | Genecraft; Stratagene |
| Pwo-Polymerase (<i>proof-reading</i> Fkt.) | Peqlab |
| T4-DNA-Ligase | MBI-Fermentas |
| T4-DNA-Polymerase | MBI-Fermentas |

3.1.6 Molekulargewichtsmarker

Molekulargewichtsmarker für Proteine:

Prestained Molecular Weight Standard Mixture (SDS-7B) (Sigma)

| | | |
|-----------------|----------------------------|-----------|
| Markerproteine: | α_2 -Makroglobulin | 180,0 kDa |
| | β -Galaktosidase | 116,0 kDa |
| | Fructose-6-phosphat Kinase | 84,0 kDa |
| | Pyruvat Kinase | 58,0 kDa |
| | Fumarase | 48,5 kDa |
| | Laktatdehydrogenase | 36,5 kDa |
| | Triosephosphatisomerase | 26,6 kDa |

Molekulargewichtsmarker für DNA:**1 kb Ladder (Gibco-BRL)**

Fragmentgrößen (bp): 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

3.1.7 Reagenziensätze (Kits)**Kit**

DC Protein Assay
 ECL Western Blotting Detection
 Plasmid Maxi Kit
 Plasmid Mini Kit
 QIAex DNA Isolation
 QIAex II Gel Extraction Kit
 QIAprep Spin Miniprep Kit
 QIAquick PCR Purification Kit
 Nucleotide Removal Kit
 Quick ChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit

Firma

Bio Rad
 Amersham
 QIAGEN; Machery&Nagel
 QIAGEN
 QIAGEN
 QIAGEN
 QIAGEN
 QIAGEN
 QIAGEN
 Stratagene

3.1.8 Antikörper**primäre Antikörper/Antiseren****Antigen****Herkunft**

| | | |
|---------------------|---------------|----------------------|
| anti-ERK2 (C-14) | ERK2 | Santa Cruz (sc-154) |
| anti-p-ERK (E-4) | phospho-ERK | Santa Cruz (sc-7383) |
| anti-ERK5 | ERK5/BMK1 | Santa Cruz (sc-1284) |
| anti-JNK1 (F1) | JNK1 | Santa Cruz (sc-571) |
| anti-p-JNK (G7) | phospho-JNK | Santa Cruz (sc-6254) |
| anti-p-c-Jun (KM-1) | phospho-c-Jun | Santa Cruz (sc-822) |
| anti-p38 | p38 | NEB (9212) |
| anti-p-p38 | phospho-p38 | NEB (9211) |
| anti-p-ATF-2 | phospho-ATF-2 | NEB (9221) |
| anti-Fra1 | Fra1 | Santa Cruz (sc-605) |

| | | |
|------------------------------|-------------------------|---------------------|
| anti-Cdk4 | Cdk4 | Santa Cruz (sc-260) |
| anti-Actin | Actin | Sigma (A2066) |
| anti-p-MAPKAPK2 | phospho-MAPKAPK2 | NEB (3041) |
| anti-3pK | 3pK (MAPKAPK3) | MSZ |
| anti-C-Raf (SP63) | C-Raf | MSZ |
| anti-Raf-1 (C-12) | C-Raf | Santa Cruz (sc-133) |
| anti-phospho-Raf-1 (Ser-338) | phospho-C-Raf (Ser-338) | Upstate (05-534) |
| M2 | Flag-Epitop | Kodak/IBI |
| D-8 | Flag-Epitop | Santa Cruz (sc-807) |
| 12CA5 | Hämagglutinin-Epitop | NEB (2362) |
| 9B11 | Myc-Epitop | NEB (2276) |
| FITC-konjugiertes Phalloidin | F-Aktin | Molecular Probes |

Sekundäre Antikörper

| | |
|---|------------------------|
| Meerrettichperoxidase-konjugierte F(ab') ₂ anti-Maus Ig | Amersham |
| Meerrettichperoxidase-konjugierte F(ab') ₂ anti-Kaninchen Ig | Amersham |
| Meerrettichperoxidase-konjugierte F(ab') ₂ anti-Ratte Ig | Amersham |
| Meerrettichperoxidase-konjugierte F(ab') ₂ anti-Ziege Ig | Stanta Cruz |
| Cy3-konjugierte Ziege anti-Maus IgG | Jackson Immunoresearch |

Herkunft

3.1.9 Primer (Oligonukleotide)

Die hier aufgelisteten Primer wurden alle von der Firma MWG synthetisiert. Mit 10 mM Tris/HCl (pH7,8) wurden sie 100 pmol/μl verdünnt.

JNK (pcDNA3 HA-2) up: 5'-CCG CTC GAG AGC AAA AGC AAG GTA GAT AAC
CAG TTC TAC-3'

JNK (pcDNA3 HA-2) low: 5'-TGC TCT AGA CCT GCA ACA ACC CAG CGG TCC
CGC CGA-3'

JNK K55A/K56A up: 5'-GAC AGA AAT GTG GCC ATT GCG GCG CTC AGC
AGA CCC TTC CAG-3'

| | |
|-------------------------|---|
| JNK K55A/K56A up: | 5'-CTG GAA GGG TCT GCT GAG CGC CGC AAT GGC CAC ATT TCT GTC-3' |
| MKK7 up (mouse; N-Ter): | 5'-TGC TCT AGA GCT AGC GTT AAC CTG GGG CTC CCA TCA ACC TTG TTC-3' |
| JNK/MKK7 low: | 5'-TGC TCT AGA CTA CCT GAA GAA GGG CAG ATG GTG CTG ACT CAG GAC-3' |
| MKK7 K76E up: | 5'-CAC ATC ATT GCT GTT GAG CAA ATG CGG CGC TCT G-3' |
| MKK7 K76E low: | 5'-CAG AGC GCC GCA TTT GCT CAA CAG CAA TGA TGT G-3' |
| Glu/Gly Linker up: | 5'-CTA GCT AGC GAA GGT GAG GGC GAA GGA GAA GGT GAG GGC GTT AAC ATC GAT GG-3' |
| Glu/Gly Linker low: | 5'-CCA TCG ATG TTA ACG CCC TCA CCT TCT CCT TCG CCC TCA CCT TCG CTA GCT AG-3' |
| Myc-Linker up: | 5'-GAT CCG CCG CCG CCA TGG AGC AGA AGC TGA TCT CCG AGG AGG ACC TGC-3' |
| Myc-Linker low: | 5'-TCG AGC AGG TCC TCC TCG GAG ATC AGC TTC TGC TCC ATG GCG GCG GCG-3' |
| JIP1 mouse up | 5'-GGT ACC ATG GAG CCC AAA GCG GAG TCC-3' |
| JIP1 mouse low | 5'-GGA ATT CCA CTG GGG TCA GGT AGA T-3' |

3.1.10 Peptide

| | | |
|---------------|---|-------|
| A-Raf Peptid: | Pro-Asp-Cys-Leu-Leu-Ser-Asp-Asp-Arg-Leu-Val-Pro | (MSZ) |
| B-Raf Peptid: | Cys-Thr-Leu-Thr-Thr-Ser-Pro-Arg-Leu-Pro-Val-Phe | (MSZ) |

3.2 Zelllinien und Bakterienstämme

3.2.1 Zelllinien

HEK293-Zellen (Graham et al. 1977)

Bei den für transiente Überexpressionsexperimente verwendeten HEK293-Zellen (ATCC [AmericaType Culture Collection] CRL-1573) handelt es sich um humane, embryonale, epitheliale Nierenzellen, die durch Adenovirus 5 DNA transformiert wurden; adhärent; DMEM 10% FCS

NIH3T3-Zellen (Jainchill et al. 1969)

Bei NIH3T3-Zellen (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-1711) handelt es sich um immortalisierte, kontakt-inhibierte Mausembryo-Fibroblasten; adhärent; DMEM 10% FCS

32D-Zellen (Palaszynski and Ihle 1984)

Bei den 32D-Zellen (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-11346) handelt es sich um IL-3 abhängige, immortalisierte, promyeloische Suspensionszellen aus der Maus

WEHI-3B (Clark-Lewis et al. 1985)

Diese myelomonocytäre Leukämie-Zelllinie produziert und sezerniert IL-3; wird das Zellkulturmedium zwei Tage nach der Zugabe aufgefangen, filtriert (0,22 µm Filter) und bei -20°C gelagert, so kann es für das Ansetzen des 32D-Mediums als IL-3 Stock dienen.

Phoenix-Ampho-Zellen (Grignani et al. 1998)

Es handelt sich hierbei um eine amphotrope Retroviren produzierende Zelllinie, die auf einer 293T Zelllinie basiert, welche mit dem Adenovirus E1a transfiziert wurde; Herkunft: Stanford Universität Labor: Prof. Nolan

3.2.2 Bakterienstämme

Escherichia coli:

***E. coli* DH5 α :** kompetente Bakterien, die bei Plasmidtransformationen zum Einsatz kommen; *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*; Herkunft: Bethesda Res. Lab. (BRL)

***E. coli* BL21:** dieser Bakterienstamm wird bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen verwendet; *F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm*; Herkunft: Novagen

3.3 Kulturmedien

3.3.1 Zellkulturmedien

HEK 293, NIH 3T3 und Phoenix-Ampho-Medium

Zu 500 ml DMEM werden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml) und 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) gegeben.

32D-Zellmedium

Zu 500 ml RPMI 1640 Medium werden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml), 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) und 75 ml WEHI-Medium (15 % v/v) gegeben.

WEHI-3B Medium

Zu 500 ml RPMI 1640 Medium werden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml) und 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) gegeben.

3.3.2 Bakterienmedien

Falls nicht anders angegeben, beträgt das Endvolumen jeweils 1 Liter. Die Dampfsterilisation erfolgt für 20 min bei 120°C im Autoklaven. Sterilfiltrationen werden mit 0,22 µm Filter durchgeführt.

Terrific-Medium

12 g Bacto Trypton; 24 g Bacto Hefe; 4 ml 99,9% Glycerin; 900 ml bidest. H₂O; autoklavieren, abkühlen lassen und 100 ml 0,17 M KH₂PO₄ + 0,72 M K₂HPO₄ hinzufügen

2x TY Medium

16 g Trypton; 10g Hefeextrakt; 5 g 1M NaCl; mit bidest. H₂O auffüllen und lösen; pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,4 einstellen; autoklavieren

LB-Medium

10 g Bacto Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5g 1M NaCl; mit bidest. H₂O auffüllen und lösen; pH mit 1 M NaOH auf 7,5 einstellen; autoklavieren

SOB Medium

20 g Bacto Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g 1M NaCl; 0,19 g 1M KCl; 2,03 g 1M MgCl₂; 2,46g 1M MgSO₄; mit bidest. H₂O auffüllen und lösen; pH-Wert auf 6,7 - 7,0 einstellen; autoklavieren

Ampicillin Stocklösung

100 mg Ampicillin auf 1 ml bidest. H₂O steril filtrieren und bei -20°C aufbewahren

2x TY Platten/Medium + Ampicillin

16 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g 1 M NaCl; (15 g Agar); pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,4 einstellen; autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen; 1 ml der Ampicillin Stocklösung hinzufügen

3.4 Plasmide

3.4.1 Eukaryotische Klonierungs- und Expressionsvektoren

pCMV5

Bei pCMV5 handelt es sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz und einem starken CMV-Promotor. Er hat eine Größe von 4,7 kbp; Herkunft: Melanie Cobb

pcDNA3neo

Dieser eukaryotische Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz besitzt einen CMV Promotor und hat eine Größe von 5446 bp; Quelle: Invitrogen

pcDNA3neo-HA

Entspricht der Sequenz von pcDNA3neo, allerdings wurde in die KpnI Schnittstelle zusätzlich eine HA-Epitopsequenz inseriert; Herkunft: B. Neufeldt (MSZ)

pBabe Puro

Eukaryontische Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz und einer Größe von 5,1 kbp; Herkunft: MSZ

pREV-TRE(Hygromycin)

Hierbei handelt es sich um einen eukaryontischen Expressionsvektor mit CMV Promotor und Ampicillin-Resistenz, der verwendet wird, um Tetrazyklin-induzierbare Zelllinien zu generieren; 6,5 kbp; Quelle: CLONTECH

pAS2-1

Hefeexpressionsvektor (*S. cerevisiae*) mit Ampicillin-Resistenz, der von der Firma CLONTECH für das Two-Hybridsystem angeboten wird und die GAL4BD (Bindedomäne) enthält

3.4.2 Eukaryontische Expressionskonstrukte

Es wurden folgende **Expressionskonstrukte** verwendet:

- pkRSPA-Flag-p38 β A. Hoffmeyer (MSZ) (accession: D83073)
- pEBG-SAPK β S. Ludwig (MSZ) (accession: L27128)
- pkRSPA-HA-ERK1 A. Hoffmeyer (MSZ) (accession: S46779)
- pkRSPA-ERK2 B3 (inaktiv) A. Große-Wilde (MSZ) (accession: M64300)

- pkRSPA-ERK2 C3 (inaktiv) A. Große-Wilde (MSZ) (accession: M64300)
- pcDNA3-HA-ERK2 M. Cobb (accession: M64300)
- pcDNA-Flag-JIP-1 R. Davis (accession: AF003115)
- pCR3.1-Flag-MKK7 J. Penninger (accession: AF02616)
- pCS3+MT-Myc-MKK7 S3A (inaktiv) M. Kracht (accession: U74463)
- pCS3+MT-Myc-MKK7 S3E (aktiviert) M. Kracht (accession: U74463)
- pCMV5-MLK3 J. Hartkamp (MSZ) (accession: AF155142)
- pCMV5-CotΔC D. Matenia (MSZ) (accession: NM_053847)
- pMT35-c-Jun (wt) D. Bohmann (accession: NM_002228)
- pMT111-c-Jun (inaktiv) D. Bohmann (accession: NM_002228)
- pMT162-c-Jun (aktiviert) D. Bohmann (accession: NM_002228)
- pCMV5-Myc-ERK2-MEK1 LA (aktiviert) M. Cobb
- pcDNA3-Flag-BMK1/ERK5 D. Dinev (MSZ) (accession: U29725)
- EHneo v-gag-Raf-1 MSZ
- pGEX-3X: ATF-2 (AS 1-109) R. Davis

Es wurden folgende **Reportergenkonstrukte** verwendet:

- pB4X luc 4 Kopien des ORE (oncogene responsive element), beinhaltet Ets und AP-1 Bindemotive (MSZ)

Daneben wurden folgende **Expressionskonstrukte kloniert** und in Experimenten verwendet:

- pcDNA3-Myc-SAPKβ-MKK7: (siehe Abb. 5)
- pcDNA3-Myc-SAPKβ-MKK7 KD (inaktiv) SAPKβ: K55A, K56A;
MKK7: K76E
- pREV-TRE-Myc-SAPKβ-MKK7 über PaeI/BamHI in Vektor kloniert
- pREV-TRE-Myc-SAPKβ-MKK7 KD (inaktiv) über PaeI/BamHI in Vektor kloniert
- pBabe Puro-Myc-SAPKβ-MKK7 PaeI/BamHI →blunt in BamHI
- pBabe Puro-Myc-SAPKβ-MKK7 KD (inaktiv) PaeI/BamHI →blunt in BamHI

- pACT-JBD (JIP-1; nt 516-983) EcoRI/NcoI in Vektor kloniert
- pcDNA3-HA-JBD (JIP-1) JBD über EcoRI/NcoI aus pACT isoliert →blunt EcoRV
- pcDNA3-Myc Myc-Epitop über BamHI/XhoI inseriert
- pcDNA3-Myc-SAPK β über XhoI/XbaI in Vektor kloniert
- pcDNA3-GAL4BD(Bindedomäne) GAL4BD (inklusive Promoter) über EcoRV/XhoI aus dem Hefevektor pAS2-1 isoliert und in pcDNA3 (EcoRV/XhoI) kloniert
- pcDNA3-GAL4BD- Δ c-JunAD (AS 1-223) über XbaI in pcDNA3-GAL4BD kloniert
- pcDNA3-GAL4BD- Δ ATF-2AD (AS 1-109) über BamHI/XbaI aus pGEX-3X isoliert und in pcDNA3-GAL4BD kloniert

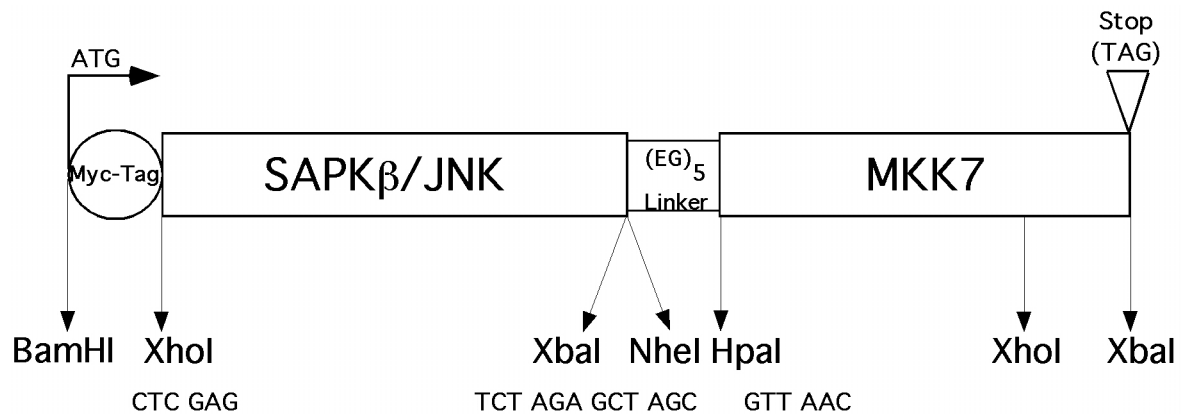


Abb. 5 Schematische Darstellung der Klonierung von SAPK β -MKK7

Die entsprechenden Restriktionsschnittstellen wurden über spezifische PCR-Primer hinzugefügt.

4. ARBEITSMETHODEN

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

4.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.1.1 Bakterienkulturen

Alle verwendeten Plasmide enthalten ein Resistenzgen (z.B. Ampicillin) für die Selektion in Bakterien. Plasmid-transformierte Bakterien (→ 4.1.3) werden auf 2xTY + Amp. bzw. LB+Amp.-Platten über Nacht bei 37 °C selektioniert. Für Übernachtskulturen wird eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Impföse oder Zahnstocher gepickt und in LB+Amp.- oder TB+Amp.-Medium (2 ml) bei 37 °C im Luftschüttler angezogen (Vorkultur). Die Kultur kann am nächsten Tag verwendet werden, um Glyceroldauerkulturen anzulegen oder Plasmid-DNA im kleinen oder großen Maßstab zu präparieren (→ 4.1.4). Für die Lagerung der Bakterien werden diese in glycerolhaltiges Medium überführt. Hierfür werden 800 µl einer frischen Bakterienübernachtskultur und 200 µl Glycerol in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, anschließend gut durchmischt und bei -80 °C eingefroren. Zum Animpfen einer Übernachtskultur wird der Glycerolstock von außen nur an der Oberfläche soweit angetaut, daß mit einer ausgeglühten Impföse (alternativ: steriler Zahnstocher) etwas Bakterienmaterial aufgenommen und in LB-Amp.- oder TB-Amp.-Medium überführt werden kann. Die Glyceroldauerkultur wird dann sofort wieder bei -80 °C gelagert.

4.1.2 Herstellung ultrakompetenter Bakterien (Inoue et al. 1990)

TB-Puffer

10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; auf pH 6,7 einstellen; 55 mM MnCl₂ zugeben; steril filtrieren (0,22 µm)

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren, bedient man sich gerne des Bakteriums *Escherichia coli*. Diese Bakterien können, nachdem sie durch das Calciumchlorid des TB-Puffers kompetent gemacht wurden, mit Plasmid-DNA transformiert werden.

Aus einem tiefgefrorenem Glycerolstock werden *E. coli* des Stammes DH5α auf einer LB-Platte (ohne Selektionsantibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 l SOB Medium werden mit ca. 20 großen Bakterienkolonien angeimpft und bei 18°C in einem 2 l Kolben unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (bei λ = 600 nm) kultiviert. Nach Abkühlen auf Eis werden die Bakterien zentrifugiert (3000 rpm, 4°C, 10 min) und das Pellet vorsichtig in 320 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgt ein erneuter Zentrifugationsschritt, wobei das Pellet diesmal in 80 ml TB aufgenommen wird. Um die Bakterien einfrieren zu können, wird unter sachtem Rühren DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% hinzugefügt und die Lösung erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, bevor sie, bis zu ihrer Verwendung, bei -80°C gelagert werden.

Die Kompetenz der Bakterien wird in Anzahl der transformierten Bakterien (= Klone) pro eingesetzter DNA (µg) angegeben und lag durchschnittlich bei 10⁸ Klonen pro 1 µg verwendeter Plasmid-DNA.

4.1.3 Transformation von kompetenten *E. coli* DH5α (Inoue et al. 1990)

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Dabei kann man die transformierten Bakterien mittels eines Resistenzgens (z.B. Ampicillin) von den nicht-transformierten Zellen selektieren.

Die von Inoue beschriebene Methode hat sich als sehr effizient erwiesen, wenn man die kompetenten DH5α Zellen und die zu transformierende Plasmid-DNA langsam auf Eis auftauen läßt, anschließend im gewünschten Mengenverhältnis (i.d.R. 100 µl DH5α und 2-5 µl Plasmid-DNA) zusammenfügt und die gut gemischte Suspension für ca. 30 min auf Eis

inkubiert. Nach einem 30 s Hitzeschock bei 42°C wird 1 ml LB-Medium hinzupipettiert und der Transformationsansatz für eine Stunde im 37°C Wasserbad kultiviert. Während dieser Inkubation kommt es zur Expressierung des Resistenzmarkers (häufig: Ampicillinresistenzgen). Anschließend werden die Zellen auf 2xTY + Amp. Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank herangezüchtet.

4.1.4 Plasmidisolierung aus *E. coli*

4.1.4.1 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*: präparativer Maßstab

GTE-Lösung

50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA

Lyselösung A

1% SDS; 0,2 M NaOH

Lyselösung B

3 M KOAc; 2 M HOAc

TE (pH 8,0)

10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0); mit DEPC-Wasser auffüllen

DEPC-Wasser

1 ml DEPC (Dieethyl-Pyrocyanat) in 1 l ddH₂O lösen; mehrmals autoklavieren, bis das Wasser nicht mehr nach DEPC riecht

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wird eine Kolonie in 50 ml Bakterien Nährmedium (Terrific oder 2xTY) + Amp. inokuliert und über Nacht bei 37°C im Luftschüttler kultiviert. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C wird das Pellet in 2,5 ml GTE-Lösung resuspendiert. Nachdem die Zugabe von 5 ml Lyselösung A erfolgte, wird gut gemischt (Tube invertieren) und die Lyse der Lösung kontrolliert (→ Aufklärung und erhöhte Viskosität). Es folgt der Zusatz von 3,75 ml Lyselösung B, sowie 10 min Zentrifugation bei 4000 rpm. Der Überstand wird über eine Mullbinde in ein neues 50 ml Falcontube abfiltriert und mit etwa 45 ml 100% EtOH versetzt. Nach dem Zentrifugieren (4000 rpm, 4°C, 10 min) wird das Pellet in 1 ml TE aufgenommen, mit 1 ml autoklaviertem 5 M LiCl vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 10 min), der Überstand gesammelt und in einem 14 ml Falcontube mit 5 ml 70%

EtOH vermischt. Es erfolgt nochmals ein Zentrifugationsschritt (4000 rpm, 4°C, 10 min). Letztendlich wird das Pellet in 400 µl TE aufgenommen und in ein Eppendorf Cap überführt. Durch den Zusatz von 4 µl RNase (10 mg/ml) kann störende RNA beseitigt werden. Bis zur weiteren Verwendung wird die DNA bei -20°C eingefroren.

4.1.4.2 Plasmid-DNA Isolierung: analytischer Maßstab

Diese Plasmid-Isolationsmethode fand ihre Anwendung, wenn der Klonierungserfolg im Restriktionsverdau überprüft werden sollte oder wenn nur kleine Mengen an Plasmid-DNA für die weitere Arbeit benötigt wurde. Die Vorgehensweise ist der des präparativen Maßstab sehr ähnlich, weshalb sie hier nur in Stichworten beschrieben wird:

2 ml Übernachtskultur zentrifugieren und den Überstand verwerfen; Pellet in 100 µl GTE-Lsg. aufnehmen; + 200 µl Lsg. A + 150 µl Lsg. B + 1 ml 100% EtOH; 10 min bei -20°C; zentrifugieren und den Überstand verwerfen; Pellet in 50 µl TE resuspendieren + 50 µl 5 M LiCl; 5 min bei -20°C; zentrifugieren und den Überstand mit 300 µl 100% EtOH versetzen; zentrifugieren und Pellet in 20-30 µl TE aufnehmen + RNase

4.1.4.3 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* für Zellkultur-Transfektionsexperimente

Die für Transfektion von Säugerzellen benötigten größeren Mengen an gereinigter Plasmid-DNA werden mit Hilfe des „Plasmid Maxi Kits“ von Qiagen bzw. Machery & Nagel isoliert. Das Verfahren entspricht in etwa der oben beschriebenen Plasmid-DNA Präparation im größeren Maßstab mit anschließender Aufreinigung an einer Ionenaustauschersäule. Bei der Durchführung wurde exakt nach Herstellerangaben verfahren.

4.2 Molekularbiologisches Arbeiten mit DNA

4.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum) und 280 nm. Der Quotient aus diesen beiden Meßdaten (OD_{260}/OD_{280}) erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA. Er sollte zwischen 1,8 und 2,4 liegen. Die Konzentration der DNA wird folgendermaßen ermittelt:

$$c = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 20$$

c: Konzentration in mg/ml

OD: Optische Dichte

4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

1x TAE

40 mM Tris-HCl, 40 mM Eisessig, 2 mM EDTA; auf pH 7,8 einstellen

10x DNA Probenpuffer

40% (w/v) Saccharose; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml ddH₂O; lichtgeschützt bei 4°C lagern

Mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese können linearisierte DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrates wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld immer zur Anode. Dabei ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit wegen des Widerstandes der Agarosegelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Relaxierte DNA wandert langsamer als ihre ringförmige superhelikale Form. Man verwendet zum Vergleichen der DNA-Größen standardisierte Größenmarker. Überlicherweise werden 1% Agarosegele eingesetzt. Wenn die aufzutrennende DNA besonders klein ist, benutzt man entsprechend höherprozentige Gele. Für die Herstellung der Gele wird die Agarose mit TAE (z.B. 1 g Agarose mit 100 ml TAE)

aufgekocht. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst und unter ständigem Rühren eine Temperatur von etwa 50°C erreicht hat, wird 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml hinzugefügt. Ethidiumbromid ist als interkalierende Substanz in der Lage, sich sequenzspezifisch in die DNA-Doppelhelix einzulagern und die DNA im UV-Licht sichtbar werden zu lassen. Die Agaroselösung wird in abgedichtete Gelschlitten gegossen und ein Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation bei Raumtemperatur kann der Gelschlitten in die mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt werden. Die Taschen werden mit den mit Probenpuffer (3 µl) vermischten DNA-Proben (5 µl) gefüllt. Eine Tasche wird mit dem Längenmarker beladen. Die DNA wird anschließend bei konstanter Spannung (ca. 110 V) aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

4.2.3 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

„Quick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN bzw. „Nucleo Spin Extract“ von Macherey-Nagel

Mit dieser Methode kann man DNA-Fragmente mit einer Länge von etwa 40 bp bis 50 kbp aus einem Agarosegel extrahieren. Sie basiert auf den Tatsachen, daß Agarose bei 50°C schmilzt und somit die DNA freigibt, sowie das Nukleinsäuren in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration selektiv an Silicagel-Partikel binden. Unter einer UV-Lampe werden die durch das Ethidiumbromid fluoreszierenden DNA-Fragmente in Form von Banden sichtbar und die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines der oben genannten Extraktionskits, wobei exakt nach Protokoll vorgegangen wird.

4.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Die verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen mit prokaryontischer Herkunft können bestimmte DNA-Sequenzen erkennen (meist 4-8 bp lang) und die DNA an dieser Stelle hydrolytisch spalten, wobei entweder stumpfe (*blunt-end*) oder überhängende (*sticky-end*) Enden entstehen. Je nach Restriktionsenzym werden verschiedene Pufferbedingungen und optimale Temperaturen (z.B. 30°C, 37°C oder 50°C) benötigt. Eine Unit Restriktionsenzym spaltet bei optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg DNA pro Stunde. Man unterscheidet den

partiellen Verdau, bei dem geringe Enzymmengen eingesetzt werden, und den vollständigen Verdau, bei dem ein Überschuß an Restriktionsenzym eingesetzt wird. Die verwendete Enzymmenge sollte jedoch nicht 1/10 des Gesamtvolumens überschreiten, da sonst eine Inhibierung der Enzymreaktion durch zu hohe Glycerinkonzentrationen stattfindet.

- analytischer Verdau (20 µl):
 - 1-3 µl Plasmid-DNA (0,1-1 µg DNA)
 - 2 µl Reaktionspuffer
 - 1 µl Restriktionsenzym
 - mit ddH₂O auffüllen

Der Ansatz wird für etwa 1 h bei der entsprechenden Temperatur (üblicherweise 37°C) inkubiert. Nach Zugabe des Probenpuffer wird die DNA in der Gelelektrophoresekammer (→ 4.2.2) aufgetrennt und analysiert.

- präparativer Verdau (50 µl):
 - 8 µl Plasmid-DNA (1-5 µg DNA)
 - 5 µl Reaktionspuffer
 - 2 µl Restriktionsenzym
 - mit ddH₂O auffüllen

Die Inkubation erfolgt in diesem Fall gewöhnlich bei 37°C für 4 h oder besser über Nacht. Anschließend erfolgt die Kontrolle des Verdau durch elektrophoretische Auftrennung (→ 4.2.2) in einem Agarosegel.

4.2.5 Herstellung von *blunt-end* DNA-Fragmenten

Durch den Verdau von DNA-Molekülen mit Restriktionsenzymen entstehen DNA-Fragmente, die entweder glatte Enden (*blunt-end*, z.B. durch EcoRV, SmaI), 5'-überhängende (*sticky-end*, z.B. durch EcoRI, XbaI) oder 3'-überhängende Enden (z.B. durch SacII, KpnI) besitzen. Für eine *blunt-end* Ligation müssen daher DNA-Fragmente mit überhängenden Enden aufgefüllt oder abverdaut werden.

- Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden durch Klenow-Behandlung

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wird die Klenow DNA-Polymerase verwendet.

4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase ist in der Lage, freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA zu verknüpfen, indem sie die Bildung einer Phosphodiesterbindung katalysiert. T4-DNA-Ligase kann sowohl kohäsive (*sticky*) Enden als auch glatte (*blunt*) Enden miteinander ligieren. Klonierungsvektor und Insert werden vor der Ligation mit den entsprechenden Enzymen geschnitten (→ 4.2.4), gereinigt und, um die Konzentrationen vergleichen zu können, auf ein Agarosegel aufgetragen. Der Vektor wurde vor der Reinigung dephosphoryliert (→ 4.2.6)

- Ligation kohäsiver Enden: 2 µl 10x Ligationspuffer
 1 µl T4-Ligase (1 u/µl)
 17 µl DNA + ddH₂O, wobei das Verhältnis Insert/Vektor
 3:1 betragen sollte

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

- Ligation glatter Enden: 2 µl 10x Ligationspuffer
 1,5 µl T4-Ligase (1 u/µl)
 1 µl PEG 4000 (w/v)
 15,5 µl DNA + ddH₂O, wobei das Verhältnis Insert/Vektor
 6:1 betragen sollte

Die Reaktion erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur.

Beide Ansätze können nachfolgend für eine *E. coli* Transformation (→ 4.1.3) verwendet werden.

4.2.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR

Die PCR-Reaktion (*polymerase chain reaction*) ermöglicht die Anreicherung von DNA-Bereichen mit definierter Sequenz und Länge in einem sich mehrfach wiederholenden Kreisprozeß. Diese Technik basiert darauf, dass sich DNA-Doppelstränge beim Erhitzen trennen und durch eine DNA-Polymerase in der Gegenwart komplementärer Primer verdoppelt werden können. Die Anzahl der Kopien steigt mit der Zahl der Zyklen exponentiell an. Für diese Reaktion kommen hitzestabile DNA-Polymerasen aus

thermophilen Bakterien zum Einsatz, wie z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Diese Polymerasen sind auch nach mehrfachem Erhitzen bis auf 94°C noch aktiv. Als Template kann gereinigte chromosomale DNA, isolierte Plasmid-DNA oder ganze Bakterienzellen dienen. Der zu amplifizierende Abschnitt wird von zwei Oligonukleotiden (Primern) flankiert, die jeweils an einen der beiden DNA-Stränge binden. Zusätzliche Schnittstellen, um beispielsweise ein DNA-Fragment in einen anderen Vektor umklonieren zu können, können durch weitere, der Ziel-DNA nicht-homologe, Basenpaare an den Primerenden geschaffen werden.

| | | |
|----------------------|--|--------------------|
| Standard PCR-Ansatz: | DNA (Plasmid- oder chromosomale) | 3,0 µl (50-500 ng) |
| | 10x Reaktionspuffer der Polymerase | 10,0 µl |
| | 25 mM MgCl ₂ (wenn nicht im Puffer) | 6,0 µl |
| | 20 mM dNTP's | 1,0 µl |
| | Primer I und II (50 pmol) | 1,5 µl |
| | Taq-Polymerase (5 u/µl) | 0,5 µl |
| | ddH ₂ O | 76,5 µl |

Folgende Schritte werden zyklisch während einer PCR wiederholt:

Denaturierung: die doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstrang-DNA (ssDNA) überführt

Annealing: Anlagerung eines bzw. mehrerer (i.d.R. zwei) für die Zielsequenz spez. Primer an die komplementäre ssDNA; die hier gewählten Annealingtemp. liegen zwischen 48°C und 58°C und sind von der Schmelztemp., sowie der Homologie der Oligonukleotide zum Template abhängig

Elongation: Kettenverlängerung, d.h. Vervielfältigung der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz an den 3'-OH-Enden der Primer durch die thermostabile Polymerase bei 72°C; die Elongationszeit sollte ca. 1 min pro kb betragen (bei Polymerasen mit Korrekturlesefunktion „proof reading“ sollten pro kb 2 min kalkuliert werden)

Um die Bildung unspezifischer PCR-Produkte zu vermeiden, sollte der Ansatz erst in den Thermocycler eingeführt werden, sobald dieser eine Temperatur von mindestens 80°C anzeigt.

Standard PCR-Bedingungen: „Hot Start PCR“

3' 94°C first step delay

35 Zyklen:

| | |
|-----------|---------------|
| 30'' 94°C | Denaturierung |
| 45'' 55°C | Annealing |
| 2' 72°C | Elongation |

8' 72°C last step delay

→ halten auf 4°C

Bei der Auswahl der Oligonukleotide sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- GC-Gehalt ca. 50%
- ideale Länge 18 - 28 bp; längere Primer müssen HPLC-gereinigt sein
- palindromische Sequenzen vermeiden
- Homologien der Primer zueinander vermeiden
- G oder C am 3'-OH-Ende zur Stabilisierung des in der PCR-Reaktion entstehenden Hybrids, längere GC-Abfolgen jedoch vermeiden

Anhand einer Faustregel kann man die Schmelztemperatur (T_m) der Primer errechnen:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$$

Die optimale Annealingtemperatur liegt 2–5°C unter dem niedrigeren beider errechneter Schmelzpunkte. Diese Faustregel gilt allerdings nur für Primer mit ca. 18–24 nt. Falls unspezifische PCR-Produkte gebildet werden, sollte die Annealingtemperatur angehoben werden.

Ein Aliquot der amplifizierten DNA wurde zur Kontrolle der PCR mit 5 µl DNA Probenpuffer vermischt und je nach entstandener Fragmentgröße auf ein entsprechend prozentiges Agarosegel aufgetragen, durch eine Elektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert, sofern die PCR ein Fragment der richtigen Größe amplifiziert hatte (→ 4.2.3).

4.2.9 Erstellung von Punktmutationen mit Hilfe des QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Der „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene ist ein auf PCR-basierender Kit, mit dessen Hilfe auf einfache Weise Punktmutationen in bekannte DNA-Sequenzen eingefügt werden können. Hierfür werden Primer generiert, die komplementär zu den zu mutierenden DNA-Sequenz sind, zusätzlich aber eine oder mehrere der gewünschten Punktmutationen tragen. In einer PCR-Reaktion wird dann das komplette Plasmid amplifiziert und dabei die Mutation inseriert. Die Durchführung erfolgt exakt nach Protokoll des Herstellers.

4.2.10 Synthese kleiner doppelsträngiger DNA-Stücke (*in vitro annealing*)

Annealing-Puffer (10x)

70 mM Tris pH 7,5; 70 mM MgCl₂; 500 mM NaCl

Mit Hilfe des *in vitro* Annealings lassen sich kleine DNA-Sücke, sog. Linker, synthetisieren, die z.B. bei der Epitopmarkierung von Proteinen nützlich sein können. Je 100 µg der beiden Oligoprimer (gelöst in 10 mM Tris/HCl pH 7,5) sowie Annealingpuffer werden in ein Eppendorf Cap pipettiert (Endvolumen 100 µl) und dieses anschließend in ein mit kochendem Wasser gefülltes Becherglas (Volumen: 5 Liter) gesetzt. Während sich das Wasser langsam wieder über Nacht auf RT abkühlt, lagern sich die beiden komplementären Stränge zu einem Doppelstrang aneinander. Die Reaktion wird am nächsten Tag im Kühlraum fortgesetzt, bis die Wassertemperatur letztendlich 10°C erreicht hat. Durch eine alkoholische Fällung wird die DNA aufkonzentriert (→ 4.2.11) und kann im Anschluss mit Hilfe des „Nucleotide Removal Kits“ von QIAGEN gereinigt werden. Die DNA kann nun mit Restriktionsenzymen behandelt und in das gewünschte Vektorsegment ligiert werden.

4.2.11 DNA-Aufreinigung durch Phenolisierung mit alkoholischer Fällung

Im ersten Schritt der Reinigung werden mit Hilfe des Phenols die Proteine entfernt, im zweiten Schritt wird die DNA durch das EtOH präzipitiert.

Zu der zu fällenden DNA wird eine equilibrierte Phenollösung im Verhältnis 1:1 zugesetzt, kräftig gevortext und die Phasen durch Zentrifugieren (15000 rpm, 4°C, 10 min) voneinander getrennt. Die obere, DNA-enhaltende wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues, verschraubbares Cap überführt. Nachfolgend wird im gleichen Volumen eine Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugefügt, gut gemischt, abermals zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und in ein neues Cap transferiert. Die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Prozedur wird nochmals wiederholt. Anschließend erfolgt noch ein Reinigungsschritt mit Chloroform. Um die DNA zu präzipitieren werden 1/10 Volumen an 3M NaAc (pH5,2) hinzugefügt, gemischt und anschließend noch mit 2 Volumen an absolutem Ethanol versetzt. Nach der Inkubation auf Eis (10 min) und Zentrifugation (15000 rpm, 4°C, 15 min), wird das Pellet 1x in 1 ml 70% EtOH gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in der gewünschten Menge TE-Puffer gelöst.

4.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse basiert auf einer DNA-Kettenverlängerungsreaktion nach der Sanger-Methode (Sanger et al. 1977). Grundlage ist dabei die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, außer Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's) auch 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP's) als Substrate verwenden zu können. Das für die Reaktion eingesetzte Nukleotidgemisch enthält außer den vier Desoxynukleotiden auch jeweils ein Didesoxynukleotid. Dadurch kommt es auch zum Einbau dieser ddNTP's, die ein weiteres Wachstum der Kette blockieren, da ihnen ein 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphordiesterbindung zu knüpfen. Bei der automatisierten DNA-Sequenzierung wird ein fluoreszenzmarkierter Primer eingesetzt, mit dem mittels PCR in vier verschiedenen Reaktionsansätzen basenspezifische Kettenabbruchprodukte unterschiedlicher Länge erzeugt werden. Die Reaktionsgemische werden auf ein Sequenziergel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die durch das Gel wandernden Banden anhand eines Laser detektiert. Die Daten werden im Computer gespeichert und analysiert.

Sequenzierungsansatz: 10 µl DNA + ddH₂O (30 - 90 ng bei PCR-Template)
1 µl pro Primer (10 pmol)
1 µl DMSO
8 µl Terminator-Mix (enthält dRhodamin-Terminatoren)

Die Sequenzierung selbst wurde von einem hauseigenen Servicedienst übernommen, wobei ein ABI PRISM 377 Integrated Thermal Cycler Verwendung fand.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Haltung von eukaryontischen 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. Adhärente Zellen werden bei Erreichen der Konfluenz 1:10 gesplittet. Dazu werden die Zellen durch 1-5-minütige Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und nach Suspendierung in frischem Medium wieder ausgesät. 32D-Suspensionszellen werden alle zwei Tage bei einer Geschwindigkeit von max. 1000 rpm pelletiert und 1:20 in frischem Medium verdünnt

Die **Langzeitlagerung** von Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Dazu werden die Zellen pelletiert und mit ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Kulturmedium mit 20% FCS und 15% DMSO aufgenommen. 500 ml Aliquots werden über Nacht bei -80°C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Für die Rekultivierung 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.

Tumorzellen werden in Kultur genommen, indem ein kleines Stück des Tumors zweimal mit sterilem PBS gewaschen wird. Nachfolgend wird das Tumorstück mit Hilfe eines Spritzenstempels in einem 24-Well zerquetscht und auf weitere Wells verteilt. Die Wells werden dann mit Kulturmedium aufgefüllt.

4.3.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Um Vektor-DNA in Zellen einzuschleusen, werden zwei grundsätzlich verschiedene Methoden verwendet. Für adhärente HEK293 Zellen wird die Calciumpräzipitationsmethode eingesetzt, die darauf basiert, dass die DNA als Kopräzipitat mit Calciumphosphat von den Zellen aufgenommen wird. Zum anderen wird für die ebenfalls adhärent wachsenden NIH 3T3 Zellen eine auf Liposomen basierende Transfektionsmethode verwendet, wobei sich die DNA an die Liposomen anheftet, diese später mit der Zellmembran verschmelzen und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Einen Tag vor der Transfektion werden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70% konfluent sind (pro Sechs-Well $2 \cdot 10^6$ NIH 3T3 bzw. $4 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen aussäen).

Calciumpräzipitationsmethode

2xBES

50 mM BES, 280 mM Natriumchlorid und 1,5 mM Natriumphosphat wurde in 225 ml sterilem Wasser (Sigma) gelöst und der pH mit Salzsäure auf 6,96 eingestellt, auf 250 ml aufgefüllt und durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Calciumchlorid-Lösung

2,5 M Calciumchlorid wurde in 25 ml sterilem Wasser (Sigma) gelöst, durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert

1-3 µg DNA pro Sechs-Well werden mit 150 µl 0,25 M CaCl₂-Lösung gemischt und unter ständigem vorsichtigen Vortexen auf Stufe 2 werden 150 µl 2xBES hinzugegeben. Nach Inkubation für max. 5 min wird die Lösung zu den mit 2 ml Kulturmedium überschichteten Zellen tropfenweise hinzugeführt und die Zellen anschließend über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und durch je 2 ml frisches Medium ersetzt. Um HEK293 Zellen zu hungern (Niedrigserumbedingungen), muss DMEM mit 0,3% FCS für 24-36 h angelegt werden.

LipofektaminTM-basierende Transfektion

Diese Transfektionsmethode wird bei NIH 3T3 Fibroblasten angewandt. Zu 100 µl DMEM werden insgesamt 1,5 µg Plasmid-DNA gegeben (pro Sechs-Well). 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 mal mit DMEM gewaschen wurden, um Serumreste zu entfernen. Nach 5-6 h Inkubation im Brutschrank wird die Transfektionslösung gegen Kulturmedium ausgetauscht. DMEM mit 0,05% FCS für 24-48 h stellt geeignete Hungerbedingungen für diese Zellen dar.

4.3.3 Retroviren als effiziente Vektoren für den Gentransfer in Säugierzellen (Tabin et al. 1982)

Gentransfer durch retrovirale Vektoren ist eine der effizientesten Techniken, um funktionale Gene in Säugierzellen integrativ einzuführen und zu exprimieren. Das gewünschte, in den Vektor klonierte Gen steht unter der Transkriptionskontrolle der viralen LTRs. Sogenannte Verpackungszelllinien, wie beispielsweise Phoenix-Ampho, werden dabei für die Transfektion der retroviralen DNAs verwendet. Diese Zellen exprimieren stabil von unterschiedlichen Plasmiden die für die Verpackung benötigten Proteine. Die retroviralen Partikel, die auf diese Weise produziert werden, können Zielzellen infizieren und das Gen von Interesse übertragen. Allerdings können sie sich nicht mehr replizieren, weil die genomische Information für die Verpackung nicht in den retroviralen Partikeln enthalten ist. Zur Ernte der Viren, werden die mit Hilfe der Calciumpräzipitationsmethode transfizierten Phoenix-Ampho Zellen 24 h später mit einer geringen Menge frischen Mediums gefüttert, das am nächsten Tag abgenommen, sterilfiltriert und zur längeren Lagerung bei -80 °C aufbewahrt werden kann. Die auf diese Art gewonnenen Virusüberstände können dazu verwendet werden, um z.B. 32D- oder PC12 Zellen zu infizieren (→ 4.3.4).

4.3.4 Transfektion von Zellen mit Hilfe der Zentrifugationsinfektion (*spin-infection*)

Durch die Anwendung der Spin-Infektion lassen sich Zellen, wie beispielsweise 32D oder PC12 Zellen, mittels der aus Phoenix-Ampho gewonnenen retroviralen Überstände effizient infizieren.

$5 \cdot 10^5$ 32D-Zellen, die am Tag zuvor gesplittet wurden, werden zusammen mit 1 ml des Virusüberstandes sowie 0,75 ml WEHI-Medium in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vermischt.

Nach der Zugabe von Polybrene (10 µg/ml Endkonzentration) wird die gut vermischte Zellsuspension für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 2500 rpm und 30°C für 3-4 h zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediumüberstandes werden die Zellen in 1 ml frischen WEHI-Medium resuspendiert und in ein 24-Well überführt. 36-48 h später kann mit der Selektion begonnen werden, um stabil exprimierende Zelllinien (Zellpools) zu generieren. Die Infektion von adhärennten Zellen erfolgt auf ähnliche Art und Weise, statt des Falcon-Röhrchens werden die Zellen jedoch direkt mit den Well-Platten zentrifugiert.

4.3.5 Herstellung stabiler NIH 3T3 Zelllinien

Zur Herstellung stabiler Zelllinien werden NIH 3T3 Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert (→ 4.3.2), welches ein zur Selektion geeignetes Resistenzgen trägt. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen trypsinisiert und 4/5 des Ansatzes in eine große Zellkulturschale ausgesät. 24 h später kann mit der Selektion der Zellen begonnen werden. Die Selektion ist beendet, sobald alle Kontrollzellen unter den gleichen Bedingungen gestorben sind, während sich in der transfizierten Population resistente Kolonien gebildet haben müssen. Da es sich bei NIH 3T3 Zellen um adhärennte Zellen handelt, ist es möglich, nicht nur einen stabilen Zellpool zu etablieren, sondern auch ganz gezielt Einzelzellkolonien zu isolieren, die aus jeweils einer ursprünglich überlebenden Zelle entstanden sind (klonale Zelllinie). Hierzu wird die Kulturschale einmal mit PBS gewaschen und anschließend auf die gewünschten Kolonien kleine Klonierungsringe (G. Tietsch; MSZ-Werkstatt) aufgesetzt. Ein Tropfen Trypsin/EDTA Lösung löst innerhalb des Ringes die Zellen, so dass sie in eine 24-Well Platte überführt werden können.

4.3.6 Herstellung einer Tetrazyklin-induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie

Für die Herstellung einer Tetrazyklin-induzierbaren Zelllinie wurde ein entsprechender Vektorkit von CLONTECH gekauft (K1626-1). Der Vorteil einer Tetrazyklin-induzierbaren Zelllinie besteht in der Möglichkeit die Expression des gewünschten Proteins mit Hilfe des Tetrazyklins an- bzw. abschalten zu können, während in stabil exprimierenden Linien eine permanente Expression erfolgt. Sollte das zu exprimierende Protein dabei einen schädigenden Einfluß auf die Zelle ausüben, so sind auf Dauer gesehen die Konsequenzen für stabile

Zelllinien viel weitreichender. Durch An- und Abschalten des Proteins können diese Schäden in der Zellpopulation relativ gering gehalten werden. In Tet-off Zelllinien wird durch Anwesenheit von Tetrazyklin im Medium die Expression des gewünschten Proteins unterbunden bzw. induziert, sobald Tetrazyklin von den Zellen entfernt wird. Um NIH 3T3 Tet-off Zelllinien zu etablieren, die das Fusionsprotein SAPK β -MKK7 bzw. SAPK β -MKK7 KD exprimieren, wurde exakt nach Angaben des Herstellers verfahren. Da die Ausgangszelllinie NIH 3T3 Tet-off (NIH 5.15) bereits intern im MSZ hergestellt worden war (Kerkhoff et al. 1998), musste lediglich in einem zweiten Transfektionsschritt pREV-TRE-Myc-SAPK β -MKK7 bzw. pREV-TRE-Myc-SAPK β -MKK7 KD stabil im Genom dieser Zellen integriert werden.

4.3.7 Soft-Agar Klonierung

Die 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 mehr aufweisen (Rapp and Todaro 1978). Für die Soft-Agar Klonierung werden Zellen 24 Stunden nach ihrer Transfektion oder Infektion verwendet. Pro 60 mm Petrischale wird 5 ml 0,5%iger Bottom-Agar benötigt. Hierfür muss 5%ige, steril in Wasser gelöste, Sea Plaque Agarose bei 37°C mit vorgewärmten Medium entsprechend verdünnt werden. 2 ml 0,3%iger Top-Agar werden, nach dem Festwerden des Bottom Agar, mit 10^3 - 10^5 Zellen versetzt, durchmischt und auf den Bottom-Agar gegossen. Die Schalen wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank 14-21 Tage inkubiert und auf Kolonienbildung überprüft. Transformierte Zellhaufen können mit einer Pipette aus dem Agar isoliert und weiter vermehrt werden. Sollen die Zellen unter Selektionsbedingungen kultiviert werden, so können die entsprechenden Antibiotika in Zellkulturmedium verdünnt, auf den Top-Agar geschichtet werden.

4.3.8 Focus-Assay

Giemsa-Färbelösung

Giemsa-Stammlösung wird 1:20 mit Aqua. bidest verdünnt; 1 ml davon wird mit 600 μ l Methanol und 18,4 ml PBS vermischt.

Beim Focus-Assay handelt es sich, neben der Soft-Agar Klonierung, um eine weitere Methode, die es ermöglicht, transformierte Zellen zu identifizieren, die im Vergleich zu Wildtypzellen, keinerlei Kontaktinhibierung aufweisen (Rapp and Todaro 1978). Etwa 24 Stunden nach Transfektion oder Infektion der zu testenden DNA werden die Zellen trypsiniert und 4/5 der Zellen auf Petrischalen (Durchmesser 9 cm) ausgesät. Die Schalen werden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert und regelmäßig mit neuem Medium versorgt. Zwei bis drei Wochen später werden die Platten mit PBS gewaschen, mit Methanol bei RT für 10 min fixiert und anschließend mit Giemsa-Lösung gefärbt. 30 min später werden die Schalen mit Leitungswasser gespült und getrocknet. Blau gefärbte kreisförmige Zonen, repräsentieren dabei Kolonien, die sich aus transformierten Einzelzellen entwickelt haben.

4.3.9 32D-Zellen/Survival-Assay

Bei 32D-Zellen handelt es sich um eine IL-3-abhängige promyeloische Zelllinie aus der Maus, die in Apoptosestudien Verwendung findet (Yiagnis and Spandidos 1987). 32D-Zellen werden unter Anwendung der sog. Spin-Infektion (\rightarrow 4.3.4) mit dem gewünschten Expressionskonstrukt transfiziert, selektioniert und ein stabil exprimierender Zellpool generiert. Diese Zellen werden dann für einen Survival-Assay zweimal mit PBS oder WEHI-freiem Medium gewaschen, um das IL-3 zu entfernen. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml und Loch einer 24-Well-Platte werden in dreifachem Ansatz ausgesät. Die Viabilität der verschiedenen 32D-Zelllinien wird anschließend über einen Zeitverlauf von bis zu 72 h durch Auszählen bestimmt. Hierfür werden jeweils 20 μ l der resuspendierten Zellen eines Loches mit 20 μ l Trypan Blau vermischt. In einer Zählkammer wurden sowohl die lebenden als auch die toten Zellen gezählt, wobei die lebenden Zellen kein Trypan Blau aufnehmen, da ihre Zellmembran nicht aufgrund apoptotische Prozesse beschädigt wurde. Diese Zählung wurde mit drei unabhängigen Löchern wiederholt und daraus der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

4.3.10 Bestimmung der Überlebensrate mittels PI-Färbung

Eine weitere Eigenschaft apoptotischer Zellen besteht in der fortschreitenden Degradation ihrer DNA (Bursch et al. 1985). Wird der DNA-Gehalt einer Zelle durch Anfärbung mit Propidiumiodid (PI) und nachfolgender FACS Analyse bestimmt, so zeigen apoptotische Zellen ein charakteristisches Sub-G1 Maximum (*peak*). Das FACS Gerät analysiert Einzelzellen, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom an einem fixierten Laserstrahl vorbeigeführt werden. Dabei wird der Laserstrahl in Abhängigkeit der physikalischen Charakteristika einer Zelle abgelenkt und gestreut oder ruft Fluoreszenzeffekte hervor. Dieses lässt Rückschlüsse auf die Zelleigenschaften zu, unter anderem auch auf den DNA-Gehalt der Zelle, der zellzyklusabhängigen Schwankungen unterworfen ist. Die Computerauswertung gibt hierbei an, wieviele Zellen einer Population welchen DNA-Gehalt besitzen (1n oder 2n). Für die PI-Färbung werden $3 \cdot 10^6$ 32D-Zellen bei 900 rpm 10 min zentrifugiert, und in 0,5 ml PBS + 1% (v/v) FCS resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen werden 5 ml absoluten Alkohols (-20°C kalt) tröpfchenweise auf dem Vortex zugeführt. Bis zur weiteren Verwendung werden die Zellsuspensionen bei 4°C gelagert. Vor der eigentlichen Färbung müssen die Zellen nochmals bei 900 rpm für 10 min pelletiert werden. Das Pellet wird anschließend in 0,75 ml PBS + 1% (v/v) FCS resuspendiert, mit 10 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt und mit 0,25 ml PI-Lösung (250 mg/ml) gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C kann mit der FACS Messung begonnen werden. Jeweils $1 \cdot 10^5$ der so aufbereiteten Zellen werden im FACS analysiert und mit Hilfe der Cell QuestTM- Software ausgewertet.

4.3.11 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur immunzytochemischen Anfärbung intrazellulärer Proteine werden NIH 3T3 Zellen in der gewünschten Dichte auf Deckgläschen (rund; Durchmesser 12 mm), die in 6-Well Platten ausgelegt waren, ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS, werden die Zellen mit 3,7% Paraformaldehyd bei 4°C für 20 min fixiert und anschließend abermals dreimal mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt bei RT für maximal 3-5 min mit Hilfe von 0,2% Triton X-100 (in PBS). Nach dem Waschen werden die spezifischen, ersten Antikörper nach Herstellerangaben in mit 1% FCS versetzten PBS verdünnt und direkt auf das entsprechende Deckglas pipettiert (pro Deckglas werden etwa 40 µl der Lösungen benötigt). Die Inkubation erfolgt bei RT für eine Stunde und anschließend

muss wiederum dreimal gewaschen werden. Im Anschluß daran werden die Zellen mit dem sekundären Antikörper für 45 min im Dunklen und bei RT inkubiert. Dieser Antikörper der ebenfalls entsprechend den Herstellerangaben in PBS + 1% FCS verdünnt eingesetzt wird, ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und spezifisch gegen das Fc-Epitop des ersten Antikörpers gerichtet. Dreimal wird nachfolgend mit PBS gewaschen und, falls gewünscht, kann zusätzlich eine Kernfärbung mit DAPI erfolgen. Hierfür müssen die Zellen zuerst mit 0,2 M Kaliumchlorid gespült und mit DAPI (1:1000 verdünnt), lichtgeschützt für eine halbe Stunde inkubiert werden. Die gewaschen Zellen werden mit bidestillierten Wasser versetzt, um Salze zu entfernen. Die Deckgläschen werden schließlich einzeln kopfüber, mit den Zellen nach unten auf einem Objektträger in einem Tropfen Moviollösung eingedeckelt (Harlow, E. and Lane, D. (Eds.), *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988). Bei Moviol handelt es sich um ein Kunstharz, das über Nacht aushärtet, und das ebenfalls enthaltende DABCO reduziert das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe. Die Objektträger können bei 4°C im Dunklen über Monate hinweg gelagert und mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops ausgewertet werden.

4.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit Proteinen

4.4.1 Gewinnung von Proteinlysaten

2x Laemmli-Puffer

60 mM Tris-base (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerol, 3% (w/v) SDS und 5% (v/v) β -Mercaptoethanol wurden in Aqua bidest. gelöst und mit einer Spatelspitze (0,005% (w/v)) Bromphenolblau versetzt.

RIPA-Puffer

50 mM Tris-Cl (pH 7,2), 150 mM NaCl, 0,1% SDS (w/v), 0,5% (w/v) Desoxycholat, 1% (v/v) Triton X-100, 10 mM Na-Pyrophosphat, 25 mM β -Glycerophosphat und 2 mM Na-Ovanadat werden in Aqua bidest. Gelöst, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert. Kurz vor Verwendung des Puffers müssen 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM DTT, 1mM Na-O-V, 1mM Benzamidin und je 1 μ g/ml Aprotinin und Leupeptin zugegeben werden.

Um exprimierte Proteine untersuchen zu können, werden die Zellen durch Wahl entsprechender Lysispuffer aufgebrochen und größere unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert. Die Zellysate können dann verwendet werden, um die Proteinexpression nachzuweisen, in Koimmunpräzipitationsexperimenten Komplexbildung zweier oder mehrerer Proteine zu zeigen oder in Kinase-Assays funktionelle Beziehungen zwischen interagierenden Faktoren zu untersuchen. Das Medium der zu analysierenden Zellen wird aus den Kulturschalen abgesaugt und der Zellmonolayer zweimal mit PBS gewaschen. Nachfolgenden können die Zellen entweder in 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und für 6 min aufgekocht (→ 4.4.2.2) werden oder sie werden in 1 ml Ripapuffer für 10 Minuten auf Eis mit zwischenzeitlichem Vortexen lysiert. Die Zellysate werden anschließend für 10 Minuten bei 12.000rpm und 4°C zur Abtrennung von Zellmembranen und Kernen zentrifugiert und dann für Western-Blot Analysen (→ 4.4.2) eingesetzt.

4.4.2 Western-Blot Analyse

Der Nachweis exprimierter Proteine wird in Western-Blot-Experimenten geführt. Unter einem Western-Blot versteht man hierbei den Transfer von Proteinen mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus einer Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran. Auf dieser können die immobilisierten Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper und geeigneter Detektionssysteme sichtbar gemacht werden.

4.4.2.1 Vorbereitung der Proteinproben

Um auf dem Polyacrylamidgel oder Kinase-Assays identische Proteinmengen verwenden zu können, wurde mit Hilfe des DC Protein Assays (Bio-Rad) (→ 4.4.5) bei den durch Lysispuffer gewonnenen Zellextrakten dem Herstellerprotokoll folgend eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Für einen Expressionsnachweis werden anschließend ca. 50 µl der konzentrations angeglichenen Zellextrakte mit dem gleichen Volumen 2x Laemmli-Puffer versetzt und für 6 min bei 100 °C aufgekocht. In Laemmli lysierte Zellextrakte werden direkt aufgetragen.

4.4.2.2 Auftrennung von Proteinen durch eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ammoniumpersulfat (APS)

10% (w/v) Ammoniumpersulfat werden in Aqua bidest. gelöst.

SDS-Page-Puffer

25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS

In der SDS-PAGE werden denaturierte Proteine ihrer Masse nach aufgetrennt. Das Proteingemisch wird zunächst durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS), welches im Laemmli-Puffer enthalten ist, gelöst. Dieses Detergenz zerstört nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen. β -Mercaptoethanol, eine weitere Komponente des Laemmli-Puffers, reduziert mögliche Disulfidbindungen. Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld in Richtung positiver Elektrode (Anode), wobei größere Proteine langsamer vorankommen. Es wurden Trenngele zwischen 5-15% Polyacrylamid und einem pH-Wert von 8,8 verwendet. Das 4,5%ige Sammelgel hatte immer einen pH-Wert von 6,8. Die gewählte Prozentualität des Trenngels richtet sich nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Je kleiner das Protein ist, um so höherprozentig muß das Trenngel gewählt werden. Trenn- und Sammelgele wurden aus einer 40% Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% quervernetzendem Bisacrylamid durch Zugabe entsprechender Mengen an Tris-HCl, Wasser und SDS gemischt (je 10 ml Volumen):

| | | |
|-------------------|-------------------------------------|--------------|
| Trenngel: | 3 M Tris pH 8,9 | 1,25 ml |
| | Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (40%) | 1,35-3,75 ml |
| | 20% SDS | 0,05 ml |
| | ddH ₂ O | 4,8-7,7 ml |
| | 10% APS | 0,1 ml |
| | TEMED | 10 μ l |
| | | |
| Sammelgel: | 1,0 M Tris pH 6,8 | 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 |

Die Polymerisation wird durch Zugabe des Radikalstarters APS eingeleitet. Zunächst wird das Trenngel zwischen die senkrecht stehenden Glasplatten (Minigel-Apparatur von Bio-Rad) gegossen, bis diese zu etwa 3/4 gefüllt sind und sofort mit Isopropanol überschichtet, damit die Oberfläche gleichmäßig polymerisiert. Nach der Auspolymerisierung gießt man das Isopropanol ab, füllt mit Sammelgel auf, führt einen Gelkamm luftblasenfrei ein und läßt auch dieses polymerisieren. Jede Kammtasche wird mit 20 µl Proteinprobe bzw. mit 10 µl Proteinmarker beladen. Der Laufpuffer (SDS-Page-Puffer) enthält Glycin, das bei niedrigem pH-Wert protoniert oder zwitterionig, bei hohem pH-Wert anionisch vorliegt (isoelektrischer Punkt ca. pH 6). Im Sammelgel mit seinem niedrigen pH wandern deshalb die Chlorid-Ionen (Leitungen) 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. Das Gel wird bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA laufen gelassen, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hat.

4.4.2.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)

Blotting-Puffer

39 mM Glycin, 48 mM Tris Base und 0,037% SDS (w/v) wurden in Aqua bidest. gelöst und der pH auf 8,3 eingestellt.

Dieser Vorgang erfolgt mit einer Elektroblokkammer von Hoefer, die mit Blotting-Puffer gefüllt ist. Um eine Erhitzung des Blots zu verhindern, findet die Durchführung im Kühlraum bei 4°C statt. Auf das Gel wird eine auf die gleiche Größe zurechtgeschnittene, in Blotting-Puffer getränkte, Nitrocellulosemembran gelegt und mit zwei ebenfalls angefeuchteten Whatman-Papieren überdeckt. Die andere Seite des Gels wird ebenfalls mit Whatman-Papierlagen abgedeckt. Zwischen allen Schichten sind Luftblasen unbedingt zu vermeiden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer erfolgt. Beide Seiten des „Sandwiches“ werden noch mit dünnen Schwämmchen belegt, bevor er in die Transferkassette eingesetzt wird. Diese wird daraufhin so in die Blotting-Kammer eingeführt, daß die Membran in Richtung Anode zeigt. Der Transfer findet unter konstantem Stromfluß bei 800 mA für 1,25 h statt.

4.4.2.4 Färbung der Proteinmembran mit PonceauS

PonceauS Lösung

0,5% PonceauS Farbstoff; 1% Essigsäure

Um den Transfer zu kontrollieren, kann die Membran nach dem Blotten mit PonceauS angefärbt werden. Der Nitrozellulosefilter wird für 5 min in PonceauS Lösung geschwenkt und anschließend unter fließendem Wasser solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Zur weiteren Verwendung muß die Membran allerdings wieder vollständig von der Farblösung befreit werden.

4.4.2.5 Immundetektion von Proteinen

TBST

50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,2% Triton X-100

Blocking-Reagenz

5% fettfreies Milchpulver in 1x TBST lösen

Hierzu werden zunächst unspezifische Bindungsstellen, die störende Hintergrundsignale verursachen können, durch Inkubation (mind. 1 h auf dem Horizontalrotator) des Filters in Blocking-Reagenz abgedeckt. Nachdem die Lösung abgegossen wurde, wird der Filter kurz in TBST geschwenkt. Anschließend wird für drei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C der Blot mit dem ersten spezifischen Antikörper, entsprechend in Milch-/BSA-Lösung verdünnt, inkubiert. Nach gründlichem Waschen (1x 15 min und 2x 5 min) mit TBST, um überschüssigen nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen, erfolgt eine 60 min Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in TBST verdünnt), der spezifisch an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet. Alternativ wird auch anstelle eines zweiten Antikörpers ProteinA-gekoppelte Peroxidase verwendet. Danach wird der Blot wieder, wie zuvor beschrieben, gewaschen und einer ECL (Enhanced Chemoluminescence) Reaktion unterworfen. Die ECL Lösungen enthalten Luminol, welches ein Substrat für die Meerrettichperoxidase darstellt und nach Oxidation in einen angeregten Zustand übergeht, wobei Licht emittiert wird. Dazu werden für 1 min 1 ml der beiden 1:1 vermischten ECL Lösungen über den Filter gegeben, dieser anschließend getrocknet, mit Klarsichtfolie umhüllt

und in eine ECL-Expositionskassette plaziert. Die leuchtenden Banden können durch Auflegen eines ECL Hyperfilms dokumentiert werden.

4.4.2.6 Ablösen von Antikörpern auf einer Nitrozellulosemembran (*strippen*)

Western-Strip-Puffer

60 mM Tris-Cl (pH6,8), 100 mM β -Mercaptoethanol und 2% (w/v) SDS werden in Aqua bidest. gelöst.

Nach erfolgter Antikörperreaktion können die verwendeten Antikörper wieder vom Blot abgewaschen werden (*strippen*), damit mit anderen Antikörpern eine Detektion weiterer Proteine auf der selben Membran durchgeführt werden kann. Dazu wird der Blot in Strip-Puffer im Wasserbad bei 50°C für 30 min geschwenkt und anschließend so lange in TBST Puffer gewaschen, bis kein β -Mercaptoethanol mehr zu riechen ist.

4.4.3 Kinase-Assays

ICKA-Lysis-Puffer (*in vitro complex kinase assay*)

50 mM HEPES (pH7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 10% Glycerol, 1% Triton X-100 in Aqua bidest. lösen und bei 4°C lagern; kurz vor Verwendung des Puffers werden noch folgende Inhibitoren hinzugefügt: 2 μ g/ml Leupeptin, 2 μ g/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 0,2 mM Na_3VO_4 .

Kinase-Puffer (frisch zubereiten)

50 mM HEPES (pH7,5), 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 1mM NaF, 0,2 mM Na_3VO_4 , 3 mM EGTA werden Aqua bidest. gelöst und kurz vor der Verwendung mit 100 μ M ATP versetzt

In Kinase-Assays können Phosphorylierungsereignisse festgestellt und Aktivierungsprozesse von Kinasen untersucht werden. Proteinkinasen werden z.B. in NIH 3T3 oder HEK293 Zellen überexprimiert und koexprimierte Regulatorproteine können Effekte auf sie ausüben. Nach der Lyse der Zellen mit Lysispuffer und Präzipitation der Kinase können dann *in vitro* Substrate und radioaktiv markiertes ATP hinzugegeben werden. Je nach Aktivierungsgrad ist

die Kinase in der Lage, das Substrat unter Verwendung des radioaktiven Phosphates zu phosphorylieren. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE kann der Phosphorylierungsgrad des Substrates am Phosphoimager qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

Zu Beginn des Experimentes werden die Serum-gehungerten (um Aktivitäten von endogenen Proteinen zu vermeiden) Zellen einmal mit PBS gewaschen. Pro Well wird 1 ml ICKA-Lysis-Puffer auf die Zellen pipettiert und die Sechs-Well Platte anschließend für 30 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Mit einem Zellkratzer werden noch haftende Zellteile von den Wells gekratzt und die Lysate in vorgekühlte Eppendorf Caps überführt. Die Ansätze werden auf Eis für etwa 10 min inkubiert und zwischendurch immer mal wieder kurz gevortext. Die Lysate werden durch Zentrifugation bei 15000rpm 4°C für 10 min aufgeklärt und die Überstände in neue Eppendorf Caps verteilt. Um störende unspezifische Bindungen zu vermeiden können die Lysate mit 10 µl Protein A-Agarose vorbehandelt werden (30 min Inkubation bei 4°C auf einem Rotator). Danach werden die Beads abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Cap übertragen und mit dem gewünschten primären Antikörper (1 µg/ml) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C auf dem Rotator wird in jedes Cap zusätzlich 20 µl Protein A- bzw. G-Agarose pipettiert und die Ansätze nochmals für eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit konnte der Antikörper sowohl spezifisch an sein Antigen binden als auch an die Agarose-Beads und somit letztendlich einen Komplex ausbilden, der durch einminütige Zentrifugation bei 10000rpm in einer Kühlzentrifugation sedimentiert wird. Das Pellet wird dann dreimalig mit je 0,7 ml Lysis-Puffer und einmal mit 0,7 ml Waschpuffer (50 mM HEPES und 1 mM DTT) gewaschen. Für die eigentliche Kinasereaktion werden die Pellets mit 30 µl Kinasepuffer, der die entsprechenden Substrate und pro Reaktion 10 µCi [³²P-γ]-dATP enthält, vermischt und 30 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen werden 10 µl 5x Laemmli-Puffer zugegeben und 5 Minuten bei 100 °C gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE. Nach dem Blotten auf Nitrozellulosemembranen können sie auf einem Phosphoimager-Screen exponiert und am Phosphoimager ausgewertet werden (alternativ: Auflegen eines ECL Hyperfilms). Zur Kontrolle wird die Proteinexpression auf den selben Membranen in Western-Blots mit spezifischen Antikörpern analysiert. Als Substrat für SAPK/JNKs wird 2 µg GST-c-Jun (Aminosäuren 1-135) verwendet.

4.4.4 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Lyse-Puffer

50 mM Tris-HCl pH8; 120 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM Pefabloc

Elutionslösung

10 mM Glutathion in 50 mM Tris pH8

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. Hierbei wird die Expression 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 müssen, um für maximale Expressionsraten zu erzielen, die Bedingungen optimiert werden, wobei das Kulturmedium, die optische Dichte der Bakteriensuspension zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG, die IPTG Konzentration, sowie die Dauer und Temperatur der Induktionsphase variabel sind. 100 ml einer Übernachtskultur werden in 1 Liter 2x TY-Medium + Amp. überführt und bei 37°C und 190 rpm in einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ 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 5000 rpm pelletiert und in 50 ml Lyse-Puffer lysiert, wobei 2 mg/ml Lysozym zugegeben wird und man die Suspension bei 4°C rotiert. Alle nachfolgenden Schritte werden bei 4°C ausgeführt. Um die DNA zu verdauen, werden 2,5 mM MgCl₂ und 1 ml DNaseI zugegeben und für weitere 15 min rotiert. Durch 60 min Zentrifugation bei 10000 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 Elutionslösung für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation erhält man im Überstand das Fusionsprotein. Die Elution wird drei bis viermal wiederholt und von den Eluatzen wird der Proteingehalt photometrisch bestimmt (→ 4.4.5). Das Glutathion wird durch Zentrifugation in Zentrifugal-Konzentratoren entfernt, wobei zugleich die Proteine in Kinase-Puffer umpuffert 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.

4.4.5 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 (Brilliant Blau G) mit aromatischen Aminosäuren (Bradford 1976). 1 bis 10 ml eines Zellextraktes oder Proteinlösung werden für 10 min bei RT mit 1 ml des 1:5 in H_2O verdünnten Reagenz inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Eichprotein wird eine standardisierte BSA-Probe verwendet.

4.4.6 Reporteragen-Assays

Assay-Puffer

125 mM Hepes (pH7,8), 125 mM Tris (pH7,8), 25 mM Magnesiumacetat und 5mM ATP werden in Aqua bidest. gelöst; der Puffer wird erst kurz vor Gebrauch aus Stammlösungen hergestellt.

Harvesting-Puffer

50 mM Tris/HCl (pH7,8), 50 mM MES (pH7,8), 1 mM DTT und 0,1% (v/v) Triton X-100 werden in Aqua bidest. gelöst; der Puffer wird immer frisch vor Gebrauch aus den Stammlösungen angesetzt.

Luciferin

1 mM Luciferin werden in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer gelöst und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

MES-Stammlösung

1 M MES werden in Aqua bidest. gelöst und der pH auf 7,8 eingestellt; die Lösung wird aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Reportergene werden als Indikator der Transkriptionsaktivität in Zellen benutzt. Das Luciferaseenzym wird am häufigsten für die Reporter-Technologie verwendet und wurde ursprünglich aus der Feuerfliege *Photinus pyralis* kloniert. Das Luciferaseenzym katalysiert eine Reaktion von D-Luciferin und ATP in Gegenwart von Sauerstoff und Magnesium, was zur Lichtemission führt. 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.

HEK293 Zellen werden mit dem Reporter-Konstrukt in Kombination mit den gewünschten anderen Vektorkonstrukten transfiziert. 24-48 h nach der Transfektion werden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit Harvesting-Puffer für 15 min bei 4 °C lysiert. Die Lysate werden in Eppendorf-Gefäße transferiert und 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. In einer 96-Well-Luminometer Platte wird zu 50 µl Zellysat 50 µl Assay-Puffer gegeben. Das Luminometer wird vor der Messung 2 mal mit Aqua bidest. und einmal mit Luciferin (50 µl Injektion) gespült. 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.

5. ERGEBNISSE

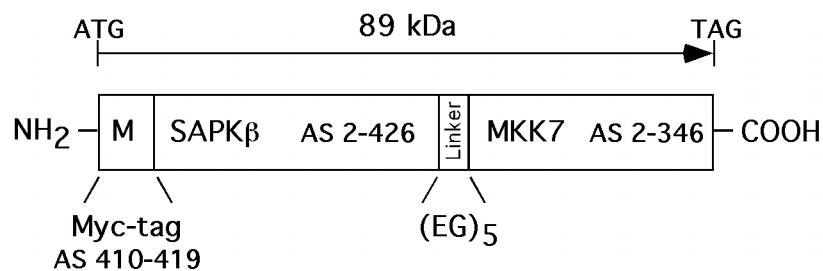
5.1 Klonierung einer konstitutiv-aktiven SAPK/JNK Kinase Mutante

Versuche, konstitutiv-aktive MAP Kinasen über Einführungen von Punktmutationen zu erzeugen, wie es im Falle vieler Aktivatoren von MAP Kinasen erfolgreich praktiziert worden war, schlugen in der Vergangenheit alle fehl (Mansour et al. 1994; Zhang et al. 1995a; Robinson et al. 1998). Um dieses Manko zu umgehen, behalf man sich lange Jahre mit dem Einsatz von konstitutiv-aktiven MAPKKs oder MAPKKKs. Ihr Einsatz ist jedoch nicht unproblematisch, da sie meist an mehrere Signaltransduktionswege parallel Signale vermitteln können (Vojtek et al. 1993; White et al. 1995). Kürzlich konnte jedoch durch die direkte Fusion von MAP Kinase Kinasen und ihrem Substrat (der MAP Kinase) eine alternative Methode entwickelt werden. Mit Hilfe dieses Ansatzes war es erstmals gelungen eine aktivierte Form von ERK2 durch die Fusion mit dem Aktivator MEK1 zu generieren (Robinson et al. 1998). Analog dazu wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit SAPK β mit seinem spezifischen und direkt über ihm in der Kaskade plazierten Aktivator MKK7 fusioniert, um somit eine konstitutiv-aktive SAPK/JNK Kinase zu etablieren (SAPK β -MKK7). Wie aus Abb. 6A (vgl. auch Kapitel 3.4.2: Expressionsplasmide Abb. 5) erkenntlich, wurde hierfür zwischen die beiden kodierenden Kinasesequenzen ein Dekapeptid eingefügt, welches aus einer alternierenden Abfolge von Glutaminsäure- und Glycinresten (EG)₅ bestand. Dieses Verbindungsstück (*Linker*) fungiert als flexibler Bereich und soll somit ein exaktes (natives) Falten der beiden Proteinuntereinheiten SAPK β und MKK7 garantieren. Der N-Terminus des Fusionsproteins wurde zusätzlich mit einem Myc-Epitoptag versehen, um in späteren Experimenten die Expression nachweisen zu können. Da SAPK β sowohl das ATG Start-Codon als auch sein Stop-Codon fehlten, während in MKK7 lediglich das Start-Codon deletiert worden war, sollte von diesem Konstrukt ein einziges, durchgehendes Fusionsprotein mit einer theoretisch berechneten Größe von etwa 87,3 kDa translatiert werden. Dieser Wert stand in guter Übereinstimmung mit der im Western-Blot identifizierten Bande von ca. 90 kDa (Abb. 6B Spur 3). Parallel wurden für dieses Experiment auch NIH 3T3 Fibroblasten mit einer inaktiven (Kinase-toten) Form des Fusionsproteins (SAPK β -MKK7 KD) transient transfiziert. Für die Herstellung dieser inaktiven Mutante wurden essentielle Lysinreste innerhalb der ATP-Bindungsstellen von SAPK β (K55A und K56A) und MKK7 (K76E) gegen Alanin- bzw. Glutaminsäurereste ausgetauscht. Infolgedessen ist die Mutante nicht mehr in der Lage, auf gebundene Substrate Phosphatreste zu übertragen und diese damit zu

aktivieren. Die Expression von SAPK β -MKK7 KD ließ sich ebenfalls eindeutig im Western-Blot nachweisen, allerdings fällt auf, dass sie in weitaus geringeren Mengen exprimiert wurde (Abb. 6B Spur 2). Die Ursache für dieses Phänomen konnte bislang nicht geklärt werden. Da allerdings verschiedene Expressionsvektoren und auch stabile Zelllinien dieses Verhalten aufwiesen, können Qualitätsunterschiede der DNA oder Fehler in der Durchführung ausgeschlossen werden. Weitere Experimente sind nötig, um zu analysieren, ob beispielsweise Überlebenssignalwege durch SAPK β -MKK7 KD gezielt inhibiert werden können.

Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Fusionsprotein handelt es sich jedoch nicht um die bislang einzige existierende Form einer aktivierten SAPK/JNK MAP Kinase. Bereits 1999 wurde ein vom Prinzip her ähnlich aufgebautes Konstrukt publiziert (Zheng et al. 1999). Neben einer biochemischen Charakterisierung des JNKK2-JNK1 Fusionsproteins (JNKK2 entspricht MKK7) ist in diesem Artikel mit Hilfe eines Reporterassays die transaktivierende Wirkung des Fusionsproteins in Bezug auf den Transkriptionsfaktor c-Jun gezeigt worden.

A



B

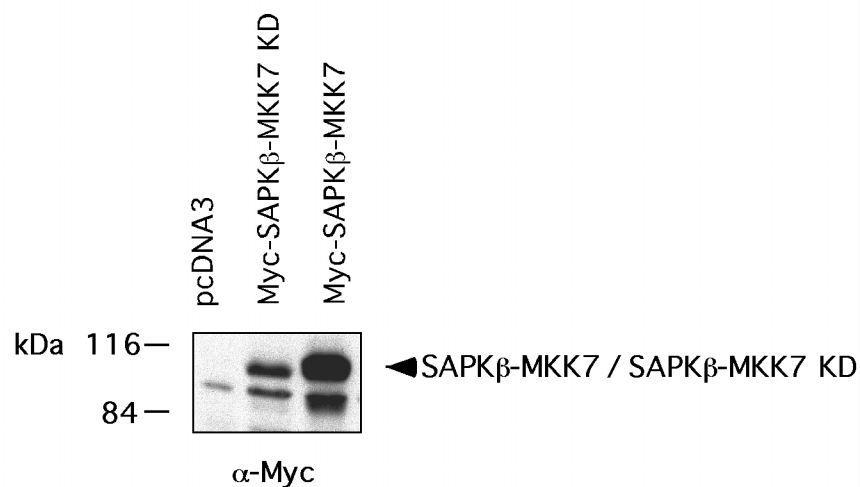


Abb. 6: Struktur und Expression des SAPK β -MKK7 Fusionsproteins. (Details siehe nachfolgende Seite)

Abb. 6A) Schematische Darstellung des SAPK β -MKK7 Fusionsproteins. Mittels eines Dekapeptid-Linkers (EG)₅ wurde die kodierende Region von MKK7 mit dem C-Terminus von SAPK β fusioniert, wobei SAPK β kein Stop-Codon aufwies. Für den Nachweis des Fusionsproteins wurde zusätzlich an das 5'-Ende des Konstruktes ein Myc Epitoptag kloniert. B) Expressionsanalyse des Fusionsproteins SAPK β -MKK7 und seiner inaktivierten Form SAPK β -MKK7 KD. 2·10⁵ NIH 3T3 wurden transient mit je 1.5 μ g DNA der entsprechenden Konstrukte transfiziert und 48 Stunden später direkt in Laemmli-Puffer lysiert. Der Nachweis der Expression der Fusionsproteine erfolgte im Western-Blot mit Hilfe eines anti-Myc Antikörpers. Als Kontrolle diente ein Lysat von Zellen die mit dem Leervektor transfiziert wurden.

5.2 Das Fusionsprotein SAPK β -MKK7 ist konstitutiv-aktiv und zeigt keine Stimulation endogener SAPK/JNKs

Die Aktivierung von MAP Kinasen erfolgt über die Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten innerhalb eines spezifischen Aktivierungsmotifes (Thr-X-Tyr), durch die MAP Kinase Kinasen (MKKs) (Sanchez et al. 1994; Derijard et al. 1995; Minden et al. 1995). SAPK/JNKs können sowohl durch MKK4 (SEK1) als auch durch MKK7 direkt stimuliert werden, wobei MKK4 bevorzugt Tyrosin-185 phosphoryliert. Im Gegensatz dazu überträgt MKK7 einen Phosphatrest hauptsächlich auf Threonin-183 innerhalb des für die SAPK/JNK Kinasen charakteristischen (Thr-Pro-Tyr) Aktivierungsmotives. Für eine vollständige SAPK/JNK Aktivierung müssen beide Aminosäuren phosphoryliert werden (Lawler et al. 1998; Fleming et al. 2000). Ihre Phosphorylierung kann folglich als Indiz dafür gewertet werden, dass die Kinase im aktivierten Zustand vorliegt.

Um zu analysieren, ob SAPK β -MKK7 als konstitutiv-aktive Kinase in Säugerzellen vorliegt, wurden NIH 3T3 Zellen transient transfiziert. Einflüsse von Wachstumsfaktoren auf Signalkaskaden wurden verhindert, indem die Zellen 24 Stunden vor der Präparation der Proteinlysate mit nahezu serumfreien Medium (0.05%) versetzt wurden. Die Analyse im Western-Blot mit Hilfe eines phospho-JNK Antikörpers ergab hierbei, dass lediglich SAPK β -MKK7 als konstitutiv-aktives Protein exprimiert wurde (Abb. 7 Spur 1), während die inaktive Mutante, SAPK β -MKK7 KD, unphosphoryliert in den Zellen vorlag (Spur 2). Dass SAPK β -MKK7 als phosphoryliertes Fusionsprotein in den Zellen existierte, wird auch bei der Betrachtung des mit einem anti-Myc Antikörper inkubierten Blots deutlich. Im Vergleich zur inaktiven Form SAPK β -MKK7 KD (Spur 2), zeigte SAPK β -MKK7 (Spur 1) ein etwas verlangsamtes Laufverhalten ('shift') als Resultat dieser Phosphorylierung. Wie sich ebenfalls aus dieser Abbildung erkennen läßt, war das Fusionprotein SAPK β -MKK7 nicht in der Lage, den Aktivierungsstatus endogener SAPK/JNK Proteine zu beeinflussen. Serum-gehungerte

Zellen, die mit SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD oder dem Leervektor transient transfiziert wurden, zeigten vergleichbare, geringe Mengen an phosphoryliertem endogenem SAPK/JNK p46 und p54 (Spur 1, 2 und 3). Im Gegensatz dazu verursachte die Verwendung der SAPK/JNK Stimuli Arsenit oder Anisomycin eine eindeutige Aktivierung beider endogener SAPK/JNK Proteinformen (Spur 4 und 5).

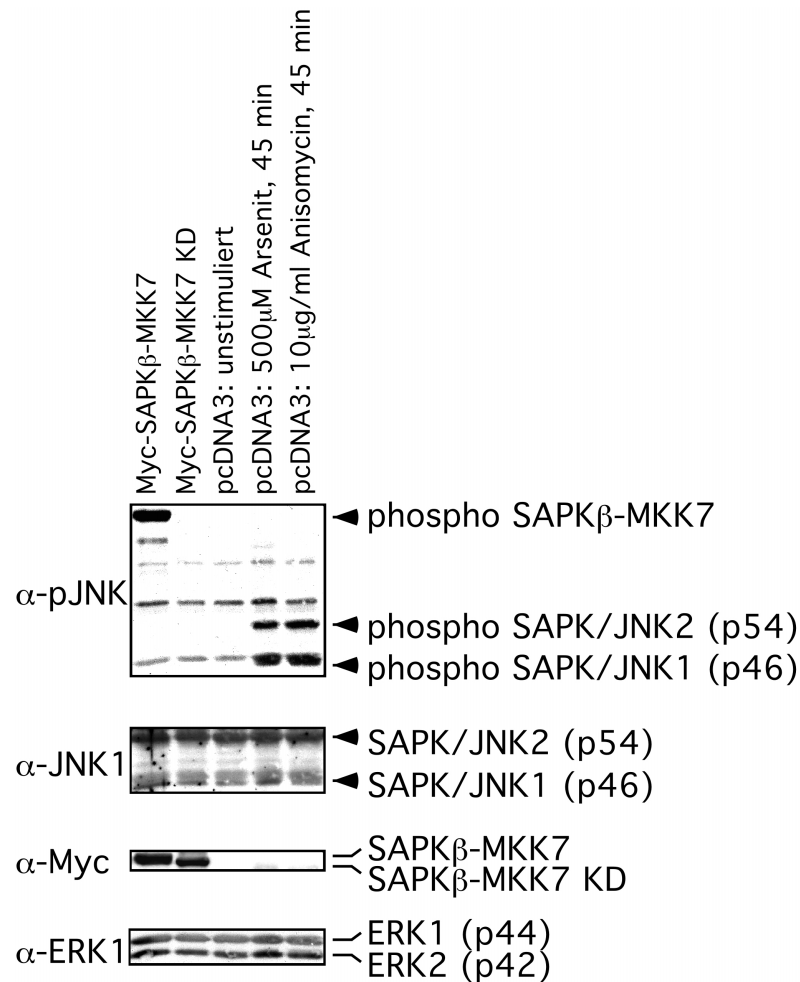


Abb. 7: Die Fusion von MKK7 und SAPK β führt zu dem konstitutiv-aktiven Fusionsprotein SAPK β -MKK7.

2 \cdot 10⁵ NIH 3T3 Fibroblasten wurden transient mit je 1.5 μ g DNA der Expressionsplasmide SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD transfiziert. Vor der Proteinanalyse wurden die Zellen für 24 h mit reduzierten Serummengen (0.05%) kultiviert. Als Kontrolle dienten NIH 3T3 Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert und entweder mit Arsenit (500 μ M, 45 min) oder Anisomycin (10 μ g/ml, 45 min) bzw. nicht behandelt wurden. Der im Western-Blot eingesetzte anti-phospho-JNK Antikörper erkennt beide aktivierten SAPK/JNK Kinasen (p46 und p54). Für die nachfolgende Expressionskontrollen wurde der Antikörper jeweils mit Stripping-Puffer von der Nitrozellulosemembran abgelöst und der Blot anschließend mit einem anti-JNK1 Antikörper inkubiert, um endogene SAPK/JNK Kinasen nachweisen zu können. Des Weiteren wurde auf dieser Membran die Expression von SAPK β -MKK7 und seiner inaktiven Mutante SAPK β -MKK7 KD mit Hilfe eines anti-Myc Antikörpers analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis der ERK2 Expression.

Mit Hilfe weiterer transienter NIH 3T3 Transfektionen sollte analysiert werden, ob das Fusionsprotein SAPK β -MKK7 bereits seine maximal erreichbare Phosphorylierung besaß, oder ob es möglich war, diese durch den Einsatz spezifischer SAPK/JNK Stimuli weiter zu steigern, was im Western-Blot zu einem zusätzlichen 'shift' der Proteinbande führen sollte. Da im Vergleich zu den unstimulierten, SAPK β -MKK7-transfizierten Zellen, weder die Induktion mit Stressstimuli [Arsenit (500 μ M, 45 min), Anisomycin (10 μ g/ml, 45 min), Sorbitol (500 μ M, 30 min) und Cycloheximid (10 μ g/ml, 30 min)] noch die Koexpression mit einer konstitutiv-aktiven MKK7 Kinase (MKK7 S3E) das Laufverhalten des Fusionsproteins im Western-Blot beeinflussen konnte, kann diese Beobachtung als ein Hinweis gewertet werden, dass SAPK β -MKK7 seine maximale Aktivität bereits durch die direkte Fusion mit MKK7 erlangt hatte (Daten nicht dargestellt). Eine endgültige Aussage kann aber erst mit Hilfe eines quantitativen Kinase-Assays getroffen werden, da Hyperphosphorylierung nicht immer mit gesteigerter Aktivität einer Kinase korrelieren muß (Wartmann et al. 1997).

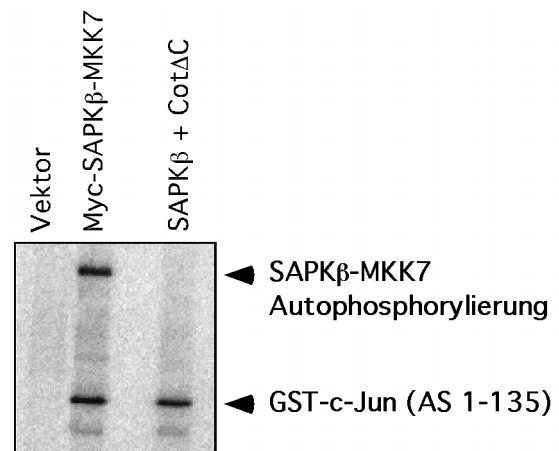
5.3 SAPK β -MKK7 führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun

Die präsentierten Ergebnisse, die durch den Einsatz des phospho-JNK Antikörpers gewonnen wurden, belegen zwar die konstitutive Aktivität des SAPK β -MKK7 Fusionsproteins, lassen jedoch keinerlei Rückschlüsse zu, ob es sich hierbei um eine aktivierte Kinase handelt, die auch weiterhin ihre spezifischen Substrate zu phosphorylieren vermag. Durch die künstlich herbeigeführte direkte Fusion von SAPK β mit MKK7 könnte die Faltung von SAPK β so beeinträchtigt worden sein, dass beispielsweise eine Bindung seiner Substraten bzw. Interaktionspartner verhindert oder zumindest erschwert wird. Um zu verifizieren, dass SAPK β -MKK7 als konstitutiv-aktive Kinase agiert, wurden zwei verschiedene Versuchsansätze verwendet. Zum einen wurden aus transient transfizierten und Serumgehungen NIH 3T3 Zellen Proteinlysate hergestellt und diese anschließend in Immunpräzipitationsansätzen mit einem anti-Myc Antikörper inkubiert, um Myc-SAPK β -MKK7 anzureichern. Als Positivkontrolle dienten NIH 3T3 Zellen, die mit SAPK β und onkogenem Cot transfiziert wurden (Hagemann et al. 1999). Aus diesem Zellysat wurde mit einem anti-JNK1 Antikörper durch Cot Δ C aktiviertes SAPK β immunpräzipitiert. In der anschließenden Kinase-Reaktion wurden die ersten 135 N-terminalen Aminosäuren des Transkriptionsfaktors c-Jun fusioniert mit GST als *in vitro* Substrat angeboten (Abb. 8).

Sowohl SAPK β -MKK7, als auch durch Cot aktiviertes SAPK β riefen dabei eine Phosphorylierung des Substrates hervor.

Abb. 8: SAPK β -MKK7 phosphoryliert c-Jun *in vitro*.

2·10⁵ NIH 3T3 Zellen wurden mit 1.5 μ g Vektor (pcDNA3), 1.5 μ g Myc-SAPK β -MKK7 oder je 0.75 μ g der SAPK β + Cot Δ C Plasmid-DNAs transfiziert. Die für 24 h Serumgehungen (0.05%) Zellen wurden lysiert und mit einem anti-Myc (für SAPK β -MKK7) bzw. anti-JNK1 (für SAPK β) Antikörper versetzt. Die Kinaseaktivität wurde nachfolgend in einem *in vitro* Immunkomplex Kinase-Assay mit GST-c-Jun (Aminosäuren 1-135) als Substrat in Gegenwart von [³²P- γ] ATP überprüft. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm des Reaktionsansatzes nach Auftrennung durch SDS-Page und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran.



Ähnliche Ergebnisse lieferte auch ein Western-Blot, mit dessen Hilfe die *in vivo* Phosphorylierung von c-Jun durch Antikörper analysiert werden sollte (Abb. 9). NIH 3T3 Zellen wurden transient mit c-Jun und SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD kotransfiziert. Während die inaktive Variante SAPK β -MKK7 KD nicht in der Lage war c-Jun zu phosphorylieren (Abb. 9 Spur 1), führte die Expression von SAPK β -MKK7 zu einem langsameren Laufverhalten ('shift') der c-Jun Bande (Spur 2). Diese durch SAPK β -MKK7 ausgelöste Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ließ sich inhibieren, sobald zusätzlich in den NIH 3T3 Zellen die JNK-bindende Domäne (JBD) des Brückenproteins JIP-1 exprimiert wurde (Spur 3). JIP-1 ist in der Lage, gleichzeitig mit den SAPK/JNK Kinase Kaskadenmitgliedern MLK3, MKK7 und SAPK/JNK zu interagieren (Whitmarsh et al. 1998; Yasuda et al. 1999) (vgl. Einleitung Kapitel 2.4). Die Expression dieses verkürzten Proteins (JBD) hält die phosphorylierte Form der SAPK/JNK Kinase im Zytoplasma zurück. Sie verhindert dadurch deren Translokation in den Nukleus und damit auch die Aktivierung nukleärer Substrate. Die Phosphorylierung exogenen c-Juns durch SAPK β -MKK7 kann jedoch nicht nur mittels einer Koexpression der isolierten JNK-bindenden Domäne (JBD) unterbunden werden, auch die Überexpression des gesamten JIP-1 Brückenproteins konnte

diesen Effekt induzieren (Daten nicht dargestellt). Vergleichbare Ergebnisse konnten zusätzlich auf Ebene des endogen exprimierten c-Juns beobachtet werden (Daten hier nicht dargestellt).

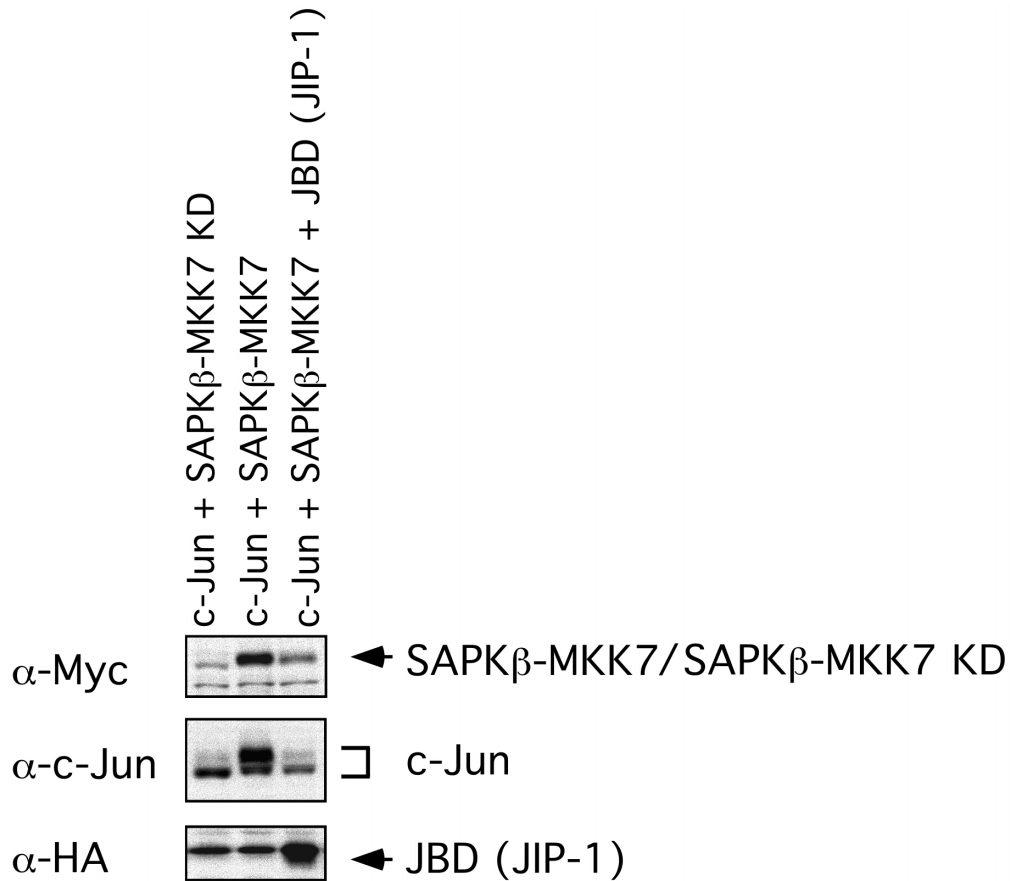


Abb. 9: SAPKβ-MKK7 ist eine konstitutiv-aktive Jun Kinase.

2·10⁵ NIH 3T3 Zellen wurden mit 1 µg des c-Jun Expressionsplasmid pMT35 sowie je 0.5µg der folgenden Konstrukte kotransfiziert: Myc- SAPKβ-MKK7 KD (Spur 1), Myc-SAPKβ-MKK7 (Spur 2) oder SAPKβ-MKK7 zusammen mit der JNK-bindenden Domäne (HA-JBD) des Brückenproteins JIP-1 (Spur 3). Vor der Herstellung der Proteinlysate wurden die Zellen 24 h mit 0.05% Serum gehungert. Nach der Separation der Proteine durch SDS-Page und ihrem Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurde die Expression der transfizierten Konstrukte mit einem anti-Myc (oben), anti-c-Jun (Mitte) oder einem anti-HA Antikörper (unten) überprüft.

5.4 SAPK β -MKK7 induziert die transkriptionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2

Bei den beiden Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2 handelt es sich um bekannte nukleäre Substrate der SAPK/JNK Kinasen. Während c-Jun anscheinend ausschließlich über den SAPK/JNK Signalweg aktiviert wird, kann ATF-2 daneben auch durch die p38 oder ERK Kinasen stimuliert werden (Zinck et al. 1995) (siehe auch Einleitung Kapitel 2.3.3.2). Um zu bestimmen, welches Verhalten das SAPK β -MKK7 Fusionsprotein gegenüber c-Jun und ATF-2 aufweist, wurde ein Reporteragen-Assay durchgeführt (Abb. 10). Hierbei sollte die Fähigkeit von SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD gemessen werden, die Transaktivierung der Konstrukte GAL4BD-c-Jun(AD) bzw. GAL4BD-ATF-2(AD) in HEK293 Zellen induzieren zu können. Die verwendeten Plasmide enthalten dabei an die aus der Hefe isolierten GAL4 Bindedomäne (BD) fusioniert die Aktivierungsdomäne (AD) von c-Jun bzw. ATF-2. Durch Koexpression mit einem Reporterplasmid (GC-Luci), welches für ein Luciferase Gen kodiert, kann die Aktivierung mittels Lumineszenz quantitativ bestimmt werden. In HEK293 Zellen führte, verglichen mit dem Leervektor, die Überexpression von SAPK β -MKK7 zu einer 240-fachen Stimulation der c-Jun Aktivierungsdomäne. Selbst die im Kinase-Assay als dominant-negativ identifizierte Mutante des Fusionsproteins SAPK β -MKK7 KD transaktivierte schwach (10-fach) c-Jun. Im Vergleich hierzu fiel in diesem Experiment die Stimulierung der Transkription des ATF-2 Konstruktes durch SAPK β -MKK7 deutlich geringer aus. Während SAPK β -MKK7 eine um das 24-fache gesteigerte Expression des ATF-2 getriebenen Reporteragens hervorrief, zeigte die inaktive Form SAPK β -MKK7 KD keinen erhöhten Wert im Vergleich zur Vektorkontrolle. Diese Resultate demonstrierten deutlich die Fähigkeit von SAPK β -MKK7, sowohl die Transaktivierung von c-Jun als auch von ATF-2 zu induzieren. In beiden Fällen war für diese Aktivierung die Kinasedomäne von SAPK β -MKK7 verantwortlich, da SAPK β -MKK7 KD lediglich eine schwache bis gar keine Stimulationen zu induzieren vermochte. Aufgrund des gewählten Versuchsansatzes ist es jedoch unmöglich, einen absoluten Vergleich zwischen den Promotoraktivierungen beider Transkriptionsfaktoren zu ziehen, da die maximalen Aktivitäten nicht bekannt sind. Ob eine isoformenspezifische Präferenz von SAPK β -MKK7 gegenüber c-Jun oder ATF-2 besteht, müssen weitere Versuche klären.

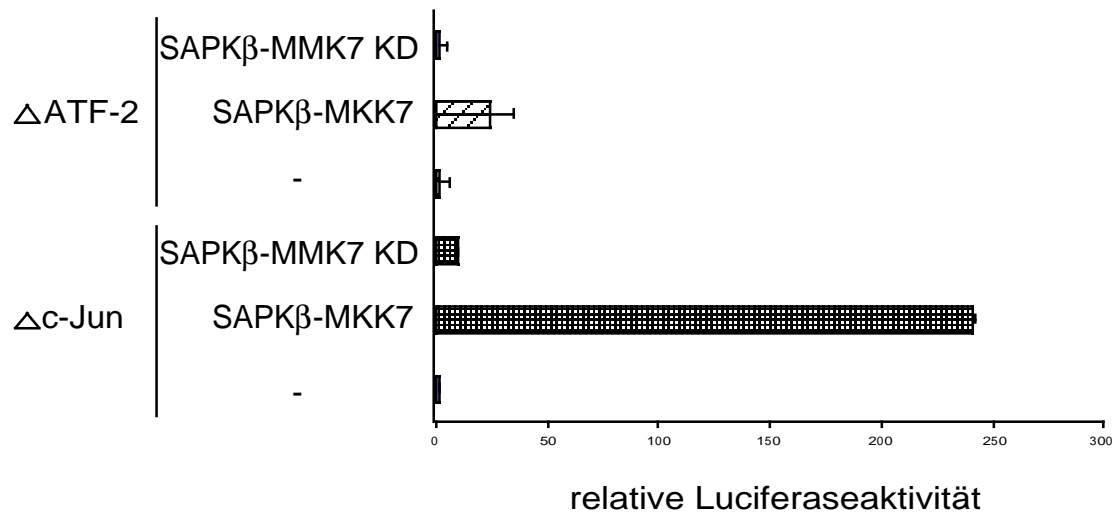


Abb. 10: Transkriptionelle Aktivierung von c-Jun und ATF-2 durch SAPKβ-MKK7.

5·10⁵ HEK 293 Zellen wurden transient mit 1 μg des Luciferase Reporterkonstruktes (GC-luci) und 1 μg SAPKβ-MKK7 oder SAPKβ-MKK7 KD Plasmid-DNA in Kombination mit 0.5 μg der Transaktivierungsvektoren Δc-Jun (GAL4BD-c-Jun(AD)) bzw. ΔATF-2 (GAL4BD-ATF-2(AD)) transfiziert. Vor der Durchführung des Luciferase-Assays wurden die Zellen für 40 h in 0.3% Serum gehungert. Die gemessene Luciferase-Aktivität der Zellysate wurde auf die Aktivität der Vektorkontrolle relativiert und auf die Proteinkonzentrationen normalisiert. Proteinkonzentrationen wurden mit einem Biorad-Kit photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichungen aus drei Versuchsansätzen.

5.5 Die Expression von SAPKβ-MKK7 beeinflusst nicht die Aktivität der MAP Kinasen ERK1/2, p38 oder ERK5/BMK1

Zwischen den einzelnen MAP Kinase Signalwegen besteht häufig ein *Crosstalk*, das heißt einzelne Komponenten einer Kaskade können direkt oder indirekt in andere MAP Kinase Signaltransduktionswege eingreifen. Um zu testen, ob die Expression von konstitutiv-aktivem SAPKβ-MKK7 auch zusätzliche MAP Kinase Kaskaden beeinflussen kann, wurde mit Hilfe transienter Transfektionen von NIH 3T3 Zellen eine mögliche Aktivierung von ERK überprüft. In diesem Versuchsansatz erfolgte jedoch nur dann eine Phosphorylierung von endogenem ERK2, wenn die zuvor Serum-gehungerten Zellen mit 10% Serum für 15 min stimuliert wurden (Abb. 11A Spur 1). Transfektion von SAPKβ-MKK7 hingegen induzierte, genauso wie die von SAPKβ-MKK7 KD oder der Leervektor, keine Phosphorylierung von ERK2 (Abb. 11A Spur 2, 4 und 3). Vergleichbare Daten wurden auch nach Kotransfektion

von SAPK β -MKK7 mit ERK2 in NIH 3T3 Zellen erhalten. Selbst die Überexpression beider MAP Kinasen führte also zu keiner ERK2 Aktivierung (Daten nicht gezeigt).

Um einen Effekt von SAPK β -MKK7 in der p38 Signalkaskade ausschließen zu können, wurden NIH 3T3 Zellen transient mit den aus Abb. 11B zu entnehmenden Konstrukten transfiziert. Eine deutliche Phosphorylierung von p38 konnte nur in jenen Serum-gehungerten Zellen festgestellt werden, die als Positivkontrolle mit dem p38 Aktivator Arsenit stimuliert wurden (Abb. 11B Spur 4). Daneben konnte selbst die Kofunktion von SAPK β -MKK7 mit p38 keine Aktivierung der MAP Kinase p38 induzieren (Daten nicht dargestellt).

Auch eine weitere MAP Kinase, ERK5/BMK1, wurde in ihrer Aktivität nicht durch das Fusionsprotein SAPK β -MKK7 beeinflusst (Abb. 11C). Eine Aktivierung von exogenem ERK5 wurde innerhalb dieses Experimentes durch die Koexpression mit seinem konstitutiv aktivierten Aktivator MEK5 (D) stimuliert, was einen deutlichen 'Shift' der Proteinbande zur Folge hatte (Abb. 11C Spur 3). Im Vergleich hierzu läuft die inaktive Form vom BMK1 (BMK1 AEF) deutlich tiefer (Abb. 11C Spur 1). Koexpression von SAPK β -MKK7 führte, ebenso wie die der Kontrollen, SAPK β -MKK7 KD und Leervektor, zu keiner Verlangsamung des Laufverhaltens, sprich zu keiner Phosphorylierung von BMK1 (Abb. 11C Spur 4, 5 und 2). Analysen auf Stufe des endogenen ERK5/BMK1 Proteins konnten nicht durchgeführt werden, da die Expression dieser MAP Kinase in NIH 3T3 Zellen zu gering ist (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von spezifischen Zelllinien, wie beispielsweise Muskelzellen, die ERK5/BMK1 in größeren Mengen exprimieren (Dinev et al. 2001), wäre daher sinnvoll.

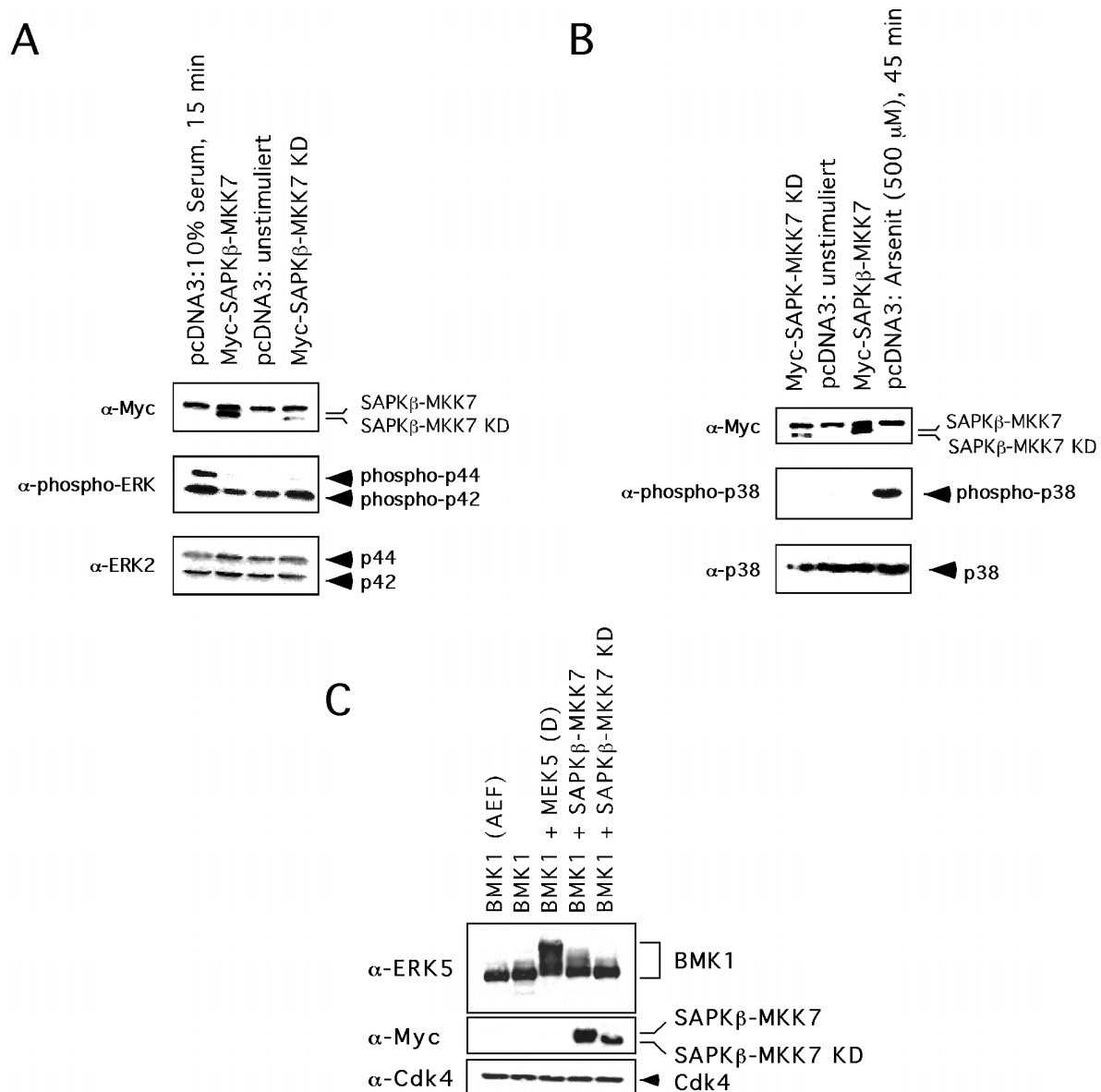


Abb. 11: Die Expression von SAPKβ-MKK7 beeinflusst nicht die Aktivität der MAP Kinasen ERK1/2, p38 und ERK5/BMK1.

2·10⁵ NIH 3T3 Zellen wurden transient mit 1.5 μg der Expressionplasmide für SAPKβ-MKK7, dessen inaktiver Mutante SAPKβ-MKK7 KD oder dem Leervektor pcDNA3 transfiziert. Nach 24 h in Niedrigserumbedingungen (0.05%) erfolgte die Gewinnung der Proteinlysate. Immunoblot-Analysen wurden mit Antikörpern gegen A) phospho-ERK und ERK2 durchgeführt, um den Aktivierungsstatus sowie die Expression der endogenen ERK Kinasen zu überprüfen. Als Positivkontrolle diente hierbei ein Lysat von Serum-stimulierten Zellen (10% Serum für 15 min). B) Weitere Blots wurden mit anti-phospho-p38 bzw. anti-p38 Antikörper inkubiert, um zusätzlich die Aktivität und Expression dieser endogenen MAP Kinase zu untersuchen. Phosphorylierung von p38 wurde für diesen Blot durch Arsenit-Behandlung (500 μM, 45 min) der Zellen induziert. C) ERK5/BMK1 Phosphorylierung wurde mit Hilfe eines ERK5 Antikörpers überprüft. Da lediglich die Kofunktions von BMK1 zusammen mit seinem konstitutiv-aktiven Aktivator MEK5 (D) zu einem verlangsamten Laufverhalten der exogenen BMK1 Proteinbande führte, kann daraus indirekt geschlossen werden, dass SAPKβ-MKK7 keinen Einfluß auf die Aktivität dieser MAP Kinase ausübte. Als Ladekontrolle

wurde eine zusätzliche Membran mit einem anti-Cdk4 Antikörper inkubiert. Die Expression von SAPK β -MKK7 und SAPK β -MKK7 KD wurde in A), B) und C) jeweils mit Hilfe eines anti-Myc Antikörpers nachgewiesen.

5.6 Intrazelluläre Lokalisation von SAPK β -MKK7

Wie bereits in Kapitel 2.3.3.2 angedeutet, translozieren SAPK/JNK Kinasen nach erfolgter Stimulation aus dem Zytoplasma in den Nukleus der Zelle. Im Zellkern aktivieren SAPK/JNKs eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel die Mitglieder der Jun Familie (Jang et al. 1991; Pulverer et al. 1991; Hibi et al. 1993; Kallunki et al. 1996), aber auch verwandte Transkriptionsfaktoren wie ATF-2 (Bocco et al. 1996; Ip and Davis 1998) und Elk1 (Whitmarsh et al. 1995) gehören zu den Substraten dieser MAP Kinase. Weitere nukleäre Proteine, die von SAPK/JNK erkannt und modifiziert werden, sind unter anderem p53 (Fuchs et al. 1998b), c-Myc (Noguchi et al. 1999) und NFAT4 (Chow et al. 1997). Während ein Großteil der aktivierten SAPK/JNK Kinase in den Zellkern eindringt, verbleibt jedoch immer ein Rest im Zytoplasma, um dort mit Proteinen zu interagieren bzw. sie zu phosphorylieren. Zu bislang identifizierten Targets zählen u.a. 3pK (Ludwig et al. 1996), MAP-2 (Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2) (Kyriakis and Avruch 1990) oder das anti-apoptotisch agierende Bcl-X_L Protein an den Mitochondrien (Kharbanda et al. 2000). Um die zelluläre Verteilung des Fusionsproteins SAPK β -MKK7 zu untersuchen, wurden transient NIH 3T3 Zellen mit SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD transfiziert und anschließend für *in situ* Lokalisationsstudien verwendet (Abb. 12). Während die dominant-negative Mutante ausschließlich im Zytoplasma zu finden war, konnte SAPK β -MKK7 sowohl im Zellkern als auch im Zytosol nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde SAPK β -MKK7 dabei selbst in den Spitzen der einzelnen Zellfortsätze exprimiert. Evtl. läßt sich hieraus eine Funktion von SAPK/JNKs beim Aufbau des Zellgerüst (Zytoskelett) oder der Zellbewegung ableiten (siehe hierzu auch Kapitel 5.12). Schwächer SAPK β -MKK7-exprimierende NIH 3T3 Zellen zeigten hauptsächlich ein nukleäres Vorkommen des aktivierten Fusionsproteins. Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten stehen in Übereinstimmung mit den von Zheng et al. präsentierten Ergebnissen ihres JNKK2-JNK1 Fusionsproteins (Zheng et al. 1999).

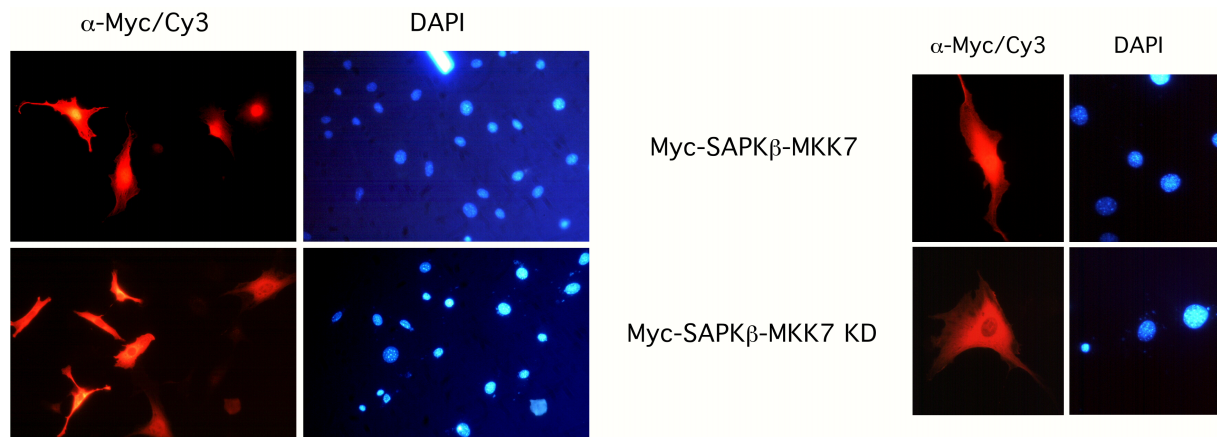


Abb. 12: Immunfluoreszenzstudien der Lokalisation von exogenen SAPK β -MKK7 und SAPK β -MKK7 KD in NIH 3T3 Fibroblasten.

2·10⁵ NIH 3T3 Zellen wurden transient mit je 1.5 μ g der Expressionskonstrukte SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD transfiziert. 24h nach Aussäen der transfizierten Zellen erfolgte die Visualisierung der Proteine über einen primären anti-Myc Antikörper, gefolgt von einem Cy3-konjugierten sekundären anti-Maus Antikörper (rot). Eine sich daran anschließende Färbung mit DAPI-Farbstoff ermöglichte die gleichzeitige Lokalisierung der Zellkerne (blau). Vergrößerung für die Darstellung von Einzelzellen: 40x; Übersichtsbilder wurden mit 25-facher Vergrößerung abgelichtet.

5.7 Herstellung einer Tetrazyklin-induzierbaren NIH 3T3 Fibroblastenzelllinie, die SAPK β -MKK7 exprimiert

Für weiterführende physiologische Untersuchungen wurde eine induzierbare NIH 3T3 Tet-off Zelllinie etabliert. Damit sollten Limitationen, die zwangsläufig durch die Verwendung von transienten Transfektionsexperimenten oder stabil transfizierte Zellen auftreten, vermieden werden. In einer solchen Zelllinie erfolgt die Expression von SAPK β -MKK7 nur dann, wenn diese in Tetrazyklin-freiem Zellkulturmedium wachsen. Umgekehrt inhibiert das Vorhandensein von Tetrazyklin eine Induktion des Fusionsproteins. Die Verwendung einer induzierbaren Zelllinie bietet hierbei den Vorteil, dass das zu untersuchende Protein keinen Effekt auf die Etablierung von Zelllinien hat und die gleiche Zellpopulation in Gegenwart oder Abwesenheit des Proteins analysiert werden kann. Für die Herstellung induzierbarer Zelllinien, die entweder SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD exprimieren, wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen in den Tet-off induzierbaren Expressionsvektor pREV-TRE kloniert und in eine bereits existierende NIH 3T3 Fibroblastenzelllinie NIH 5.15 (Kerkhoff et al. 1998) transfiziert, in der ein für die Regulation benötigtes Plasmid bereits

stabil integriert war. Im Anschluß an die Selektion wurden einzelne Klone isoliert und in Western-Blots auf die Induzierbarkeit des entsprechenden Fusionsproteins hin getestet. Im Vergleich zu transienten Transfektionen fiel dabei auf, dass alle induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Klone SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD in wesentlich geringeren Mengen exprimierten (Daten nicht dargestellt). Auffällig war weiterhin, dass sich mit zunehmender Passagenzahl die Expression weiter verringerte (Ergebnisse hier nicht abgebildet), was als Hinweis gewertet werden kann, dass die Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg die Anwesenheit der Fusionsproteine nicht tolerieren können. Theoretisch sollte die Präsenz von Tetrazyklin im Medium die Expression von SAPK β -MKK7 vollständig unterbinden. Es gelang jedoch bei insgesamt 60 getesteten Klonen nicht einen zu isolieren, der unter der maximal einsetzbaren Tetrazyklinkonzentration von 2 μ g/ml die Expression von SAPK β -MKK7 vollständig inhibierte (siehe hierzu auch Abb. 14). Zusätzlich zeigte sich in weiteren Experimenten, dass die Kultivierung der induzierbaren Zelllinie unter geringen Serumkonzentrationen von 0.3% sowie 0.05% rasch zu einer drastischen Reduktion der Expression von SAPK β -MKK7 führte. Innerhalb von 24 h war der Nachweis von SAPK β -MKK7 in den Zellen nicht mehr möglich (Daten nicht dargestellt). Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass der für die SAPK β -MKK7 Expression verantwortliche Promoter zusätzlich Serum-abhängig ist oder die Proteinstabilität über exogene Faktoren reguliert wird.

Um zusätzlich zu analysieren, welche Zeit benötigt wurde, um eine maximale Expression von SAPK β -MKK7 in der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie zu erzielen, wurden Zellen des isolierten Klons 1 in einem Experiment für jeweils unterschiedliche Zeiten mit bzw. ohne Tetrazyklin kultiviert (Abb. 13). Hierbei konnte beobachtet werden, dass während der ersten 8 h nach der Entfernung von Tetrazyklin aus dem Medium keine im Vergleich zum Grundgehalt (siehe alle + Tetrazyklin-Werte) erhöhte Expression von SAPK β -MKK7 erfolgte. Erst nach 10 h konnte eine deutlich gesteigerte Induktion von SAPK β -MKK7 verzeichnet werden. Diese stieg im Verlauf der folgenden Stunden stetig an und erreichte nach 48 h ihren Maximalwert. Spätere Zeitpunkte wiesen keine weitere Steigerung der Expression mehr auf (Daten hier nicht abgebildet). Aus diesem Grund wurden für alle nachfolgenden Untersuchungen die Zellen zu Beginn eines jeden Experimentes mindestens 48 h in Tetrazyklin-freiem Medium kultiviert.

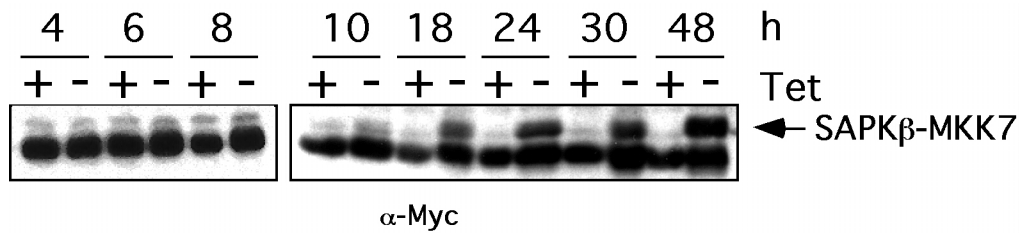


Abb. 13: Analyse der SAPKβ-MKK7 Expression in der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie.

Gleiche Zellzahlen der SAPKβ-MKK7 exprimierenden NIH 3T3 Tet-off Zelllinie (Klon 1) wurden über einen Zeitraum von 4-48 h mit (+) bzw. ohne (-) Tetrazyklin (2 µg/ml) und einer Serumkonzentration von 10% kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils Proteinlysate hergestellt und im Western-Blot mit einem anti-Myc Antikörper inkubiert, um die Expression von SAPKβ-MKK7 nachweisen zu können.

5.8 Induzierbares SAPKβ-MKK7 phosphoryliert c-Jun

Vor den eigentlichen Analysen, der Überproduktion aktivierter SAPKβ-MKK7 Kinase auf diverse physiologische Funktionen der Zelle, wurde auch für die induzierbare Zelllinie die korrekte Funktion des Fusionsproteins überprüft. In einem *in vitro* Immunokomplex Kinaseassay wurden drei unabhängige Klone der induzierbaren NIH 3T3 Zelllinie für 48 Stunden in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Tetrazyklin (Tet) kultiviert. Aus den Proteinlysaten wurde SAPKβ-MKK7 mit Hilfe eines Myc-Antikörpers immunpräzipitiert und in einer nachfolgenden Kinasereaktion mit GST-c-Jun (Aminosäuren 1–135) versetzt. Wie in Abb. 14 dargestellt, sind die SAPKβ-MKK7 Immunpräzipitate aus allen drei verwendeten Klonen in der Lage, c-Jun als Substrat zu phosphorylieren. Der obere Teil der Abbildung, in dem die Expression der präzipitierten SAPKβ-MKK7 Fusionsproteine kontrolliert wurde, zeigte zusätzlich die im Vergleich zur transienten Transfektion deutlich geringere Expression in den induzierbaren Klonen. Ein weiteres bereits erwähntes Problem wird ebenso ersichtlich: trotz Vorhandenseins von Tetrazyklin im Medium läßt sich die Expression von SAPKβ-MKK7 oder SAPKβ-MKK7 KD (Daten für SAPKβ-MKK7 KD nicht gezeigt) nicht völlig unterbinden. Da Klon 3 SAPKβ-MKK7 in relativ hohen Mengen exprimierte und die Inhibierung durch Tetrazyklin nahezu vollständig war, wurde dieser Klon als Arbeitsklon für kommende Versuche eingesetzt. Die erhaltenen Daten wurden aber immer zusätzlich als Kontrolle mit mindestens einem weiteren, unabhängig etablierten Klon überprüft. Ein im *in vitro* Immunokomplex Kinaseassay getesteter Klon, der als induzierbare Zelllinie SAPKβ-MKK7 KD exprimierte, zeigte keinerlei Aktivität im Bezug auf eine Phosphorylierung des c-

Jun Substrates (Daten hier nicht dargestellt). Die Phosphorylierung von c-Jun durch SAPK β -MKK7 exprimierende Klone der induzierbaren Zelllinie konnte zusätzlich im Western Blot bestätigt werden (Daten nicht dargestellt).

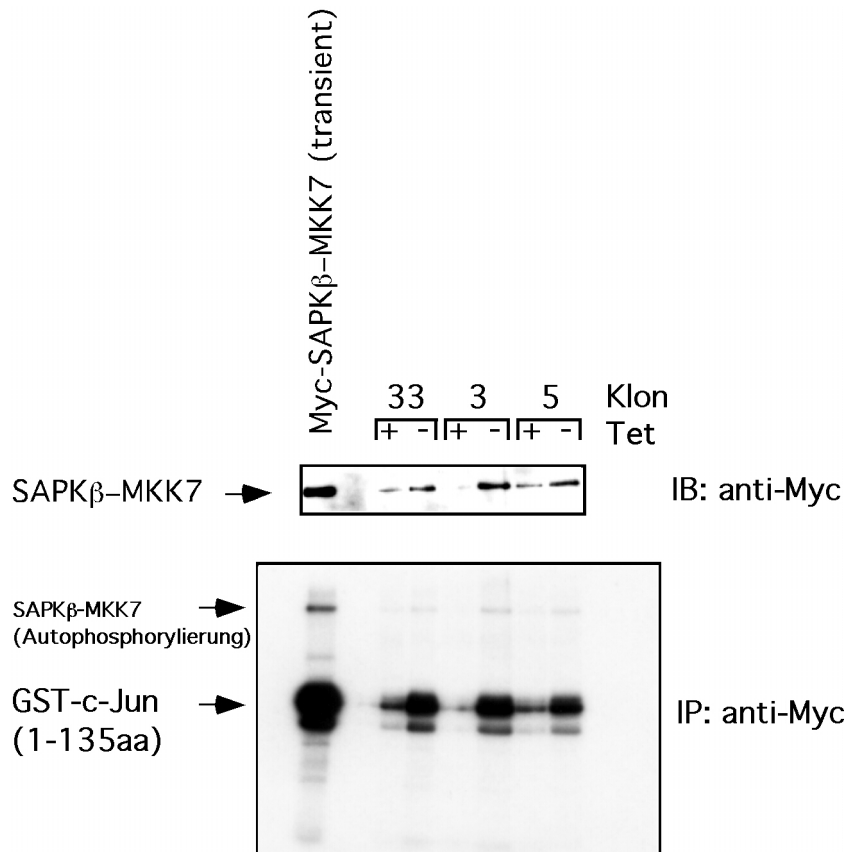


Abb. 14: Konstitutiv-aktives SAPK β -MKK7 immunpräzipitiert aus einer induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie führt zu einer *in vitro* Phosphorylierung von c-Jun.

Drei unabhängig isolierte Klone, die alle SAPK β -MKK7 induzierbar exprimieren, wurden für 48 h in der Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von Tetrazyklin (2 μ g/ml) unter 10% Serumbedingungen kultiviert. Nach der Lyse wurde SAPK β -MKK7 mit einem anti-Myc Antikörper immunpräzipitiert (IP). Die Kinaseaktivität wurde anschließend in einem *in vitro* Immunokomplex Kinaseassay mit GST-c-Jun (Aminosäuren 1-135) als Substrat bestimmt. Der unterer Teil der Abbildung zeigt ein Autoradiogramm des Kinaseassays. Im oberen Teil wurde die Expression bzw. die erfolgreiche Immunpräzipitation des Fusionsproteins auf der Nitrozellulosemembran mit einem anti-Myc Antikörper kontrolliert.

5.9 *In situ* Lokalisation von SAPK β -MKK7 in der NIH 3T3 Tet-off Zelllinie

Die Phosphorylierung von c-Jun setzt zwar das Vorhandensein einer nukleären Fraktion des SAPK β -MKK7 Fusionsproteins voraus (siehe Kapitel 5.3 und 5.8), um jedoch die Verteilung von SAPK β -MKK7 in den Zellen des NIH 3T3 Tet-off Klon 3 sichtbar zu machen, wurden diese für 48 Stunden mit oder ohne Tetrazyklin kultiviert und anschließend mit einem Myc-Antikörper angefärbt. Aus Abb. 15 lassen sich dabei folgende Ergebnisse ablesen. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, kann das Vorhandensein von Tetrazyklin im Medium die Expression von SAPK β -MKK7 nicht gänzlich unterbinden. Daher konnten auch in der Tetrazyklin-behandelten Kultur einige, wenn auch schwach exprimierende, Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erfolgte ein deutlicher Expressionsanstieg von SAPK β -MKK7 in Zellen, die in Tetrazyklin-freiem Medium heranwuchsen. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine homogene Verteilung der Expressionshöhe innerhalb der Zellpopulation. Während ca. 25-30% der Zellen SAPK β -MKK7 in relativ hohen Mengen produzierten, wurden ebenso schwach bis gar nicht exprimierende Zellen identifiziert. In den schwächer exprimierenden Zellen konnte SAPK β -MKK7 dabei hauptsächlich im Nukleus detektiert werden, während hochexprimierende Zellen sowohl eine zytoplasmatische als auch nukleäre Verteilung von SAPK β -MKK7 zeigten.

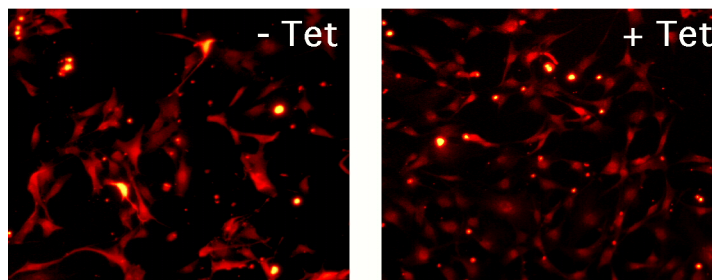


Abb. 15: *In situ* Lokalisation des Fusionsproteins SAPK β -MKK7 in der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie.

Zellen der SAPK β -MKK7 exprimierenden, induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie (Klon 3) wurden 48 h mit (+) bzw. ohne (-) Tetrazyklin (2 μ g/ml) in Medium mit 10% Serum kultiviert. Die Lokalisation von SAPK β -MKK7 in den Zellen erfolgte über eine Inkubation mit einem anti-Myc Antikörper gefolgt von einem sekundären Cy3-konjugierten anti-Maus Antikörper. Die verwendete Vergrößerung betrug 25x.

5.10 Konstitutiv-aktives SAPK β -MKK7 induziert die morphologische Transformation von NIH 3T3 Zellen und fördert das Wachstum dieser Zellen in Soft-Agar

Eine Beteiligung von SAPK/JNK Kinasen an zellulären Transformationsprozessen wurden bisher nur indirekt gezeigt (Davis 2000) (siehe auch Einleitung 2.3.3.4). Die Klonierung eines aktivierten SAPK β -MKK7 erzeugte ein ideales Instrument, um die transformierende Funktion von SAPK/JNK direkt zu untersuchen und mehr Details über die daran beteiligten Prozesse zu erfahren. Die Idee einer onkogenen Wirkung von aktiviertem SAPK/JNK wurde durch anfängliche Beobachtungen, in denen das Wachstum bzw. die Morphologie SAPK β -MKK7 exprimierender NIH 3T3 Tet-off Zellen über eine längere Zeitspanne hinweg protokolliert wurde, weiter bestärkt. Eine Kulturdauer von 4 Tagen, in denen SAPK β -MKK7 in den Zellen des Klon 3 induziert wurde, reichte aus, um eine deutliche Veränderung ihres Phänotyps zu verursachen (Abb. 16). Während nicht-exprimierende (+ Tet) Zellen die für NIH 3T3 charakteristische flache Zellmorphologie aufwiesen, induzierte die Expression von SAPK β -MKK7 eine längliche, spindelförmige Zellgestalt. Jedoch besaßen nicht alle Zellen diese morphologische Veränderung. Ursache hierfür könnte zum einen die unterschiedliche Expressionsmenge von SAPK β -MKK7 innerhalb der Zellpopulation sein (siehe auch Kapitel 5.8), zum anderen spielte evtl. auch die Expressionsdauer eine Rolle. Erst die Expression von aktiviertem von SAPK β -MKK7 über mehrere Tage hinweg könnte ausreichend sein, um die Morphologie einer Zelle so gravierend zu verändern. Die morphologischen Veränderungen der Zellen sind reversibel. Nachdem die SAPK β -MKK7 exprimierenden Zellen trypsiniert und erneut unter subkonfluenten Bedingungen, nun jedoch in Anwesenheit von Tetrazyklin, kultiviert wurden, induzierte dieses ausschließlich den Wildtyp-Phänotyp der NIH 3T3 Zellen. Die hier präsentierten Daten konnten ebenso mit einem zweiten unabhängigen induzierbaren Klon bestätigt werden (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Morphologisch betrachtet sind SAPK β -MKK7-transformierte Fibroblasten eher mit Raf- oder MLK3-, als mit Ras-transformierten NIH 3T3 Zellen zu vergleichen, welche einen eher gedrungenen runden Phänotyp zeigen. Raf- oder MLK3-transformierte Fibroblasten besitzen dagegen eine auffällig langgestreckte spindelförmige Zellgestalt, wobei der Nukleus das Zellvolumen nahezu komplett ausfüllt (Hartkamp et al. 1999). Für eine induzierbare konstitutiv-aktive C-Raf Mutante (C-Raf-BxB-ERTM) konnte gezeigt werden, dass die morphologische Transformation hierbei innerhalb von 24 h erfolgte (Kerkhoff and Rapp 1997). Ein Ergebnis, das das hohe onkogene Potential von Raf unterstreicht. Im Gegensatz dazu sind in SAPK β -MKK7-transformierten Zellen die morphologischen Veränderungen nur sehr schwach

ausgeprägt und wie bereits oben erwähnt erst nach vier Tagen Expression von SAPK β -MKK7 in der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie deutlich zu erkennen. Diese Tatsache spricht für ein sehr geringes transformierendes Potential von SAPK β -MKK7 bzw. von SAPK/JNK Kinasen generell. Auch die transiente Transfektion von SAPK β -MKK7 führte im Vergleich zu SAPK β -MKK7 KD oder dem Leervektor häufig zu einer leichten Änderung der Zellmorphologie. Oftmals fielen sie bei *in situ* Lokalisationsexperimenten durch die etwas schlankere Zellgestalt auf. Diese Veränderung musste dabei innerhalb von 24 h (nach dem Trypsinieren und Verteilen auf einzelne Deckgläschen) induziert worden sein (Daten nicht dargestellt).

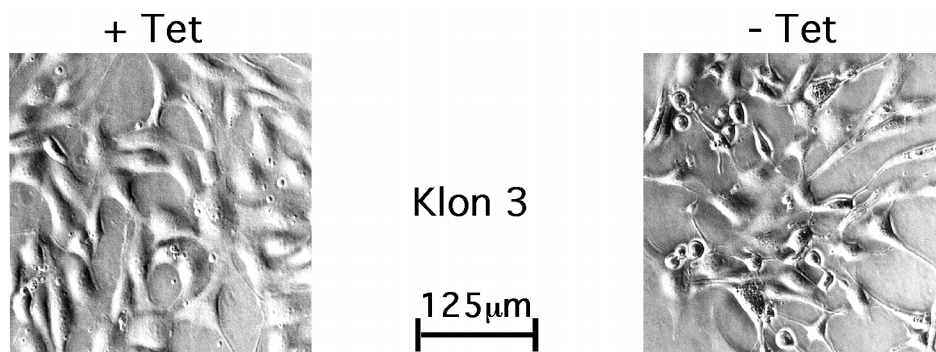


Abb. 16: Konstitutiv-aktives SAPK β -MKK7 induziert einen transformierten Phänotyp in NIH 3T3 Fibroblasten.

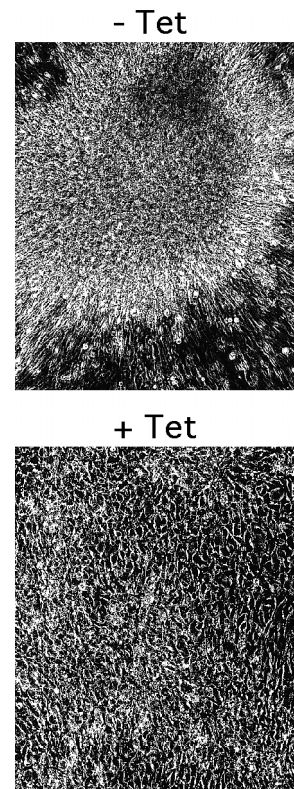
Gezeigt werden Fotos von SAPK β -MKK7 exprimierenden Zellen der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie (Klon 3) nach vier Tagen Wachstum auf Petrischalen unter Vollserumbedingungen (10% Serum) mit (+) bzw. ohne (-) Tetrazyklin (2 μ g/ml) im Medium. Die ausgewählte Vergrößerung betrug 20x.

Wurden oben beschriebene Zellexperimente über einen Zeitraum von insgesamt 24 Tagen weiterverfolgt, so führte die Expression von SAPK β -MKK7 in den NIH 3T3 Tet-off Zellen zur Bildung von sog. Foci („Zellhaufen“) auf den Petrischalen, die sich aus proliferierenden und morphologisch veränderten Zellen zusammensetzen (Abb. 17, - Tet). Für die Ausbildung solcher Foci müssen Zellen, die für adhärent wachsende Zellen charakteristische Kontaktinhibition verloren haben. Nur transformierte Zellen besitzen die Fähigkeit unter bereits konfluenten Bedingungen in Schichten übereinander zu wachsen. Erste Ansätze für eine Focusformation ließen sich dabei bereits nach etwa 12 Tagen beobachten. Betrachtet man das in Abb. 17 (- Tet) dargestellte Foto, so lassen sich am Rand des abgebildeten Focus noch deutlich spindelförmige Zellen ausmachen. Im Gegensatz dazu, erkennt man auf der Kontrollplatte (+ Tet) kleine flache Zellen, deren Zellgrenzen selbst nach 24 Tagen

Wachstum noch gut zu unterscheiden waren (Abb. 17, + Tet). Aufgrund der Kontaktinhibition stellten sie ihre Teilung ein. Vereinzelt ließen sich jedoch auch hier Bereiche mit einer höheren Proliferationsrate lokalisieren, in denen Zellen ihr natürliches Aussehen verloren hatten. Als Erklärung hierfür kann die nicht lückenlose Inhibierung der SAPK β -MKK7 Expression durch Tetrazyklin aufgeführt werden. Vermutlich spielen auch spontane Mutationen innerhalb der Zellpopulation eine Rolle.

Abb. 17: Überexpression von SAPK β -MKK7 führt zur Transformation von NIH 3T3 Tet-off Fibroblasten.

Gleiche Zellzahlen der induzierbaren Zelllinie (Klon 3) wurden ausgesät und für 24 Tage in Vollmedium mit (+ Tet) bzw. ohne (- Tet) Tetrazyklin (2 μ g/ml) auf Petrischalen herangezogen. Die Expression von SAPK β -MKK7 in den Zellen, induziert durch das Fehlen von Tetrazyklin in Medium, führte zur Transformation einiger Zellen und der daraus resultierenden Bildung eines Focus (- Tet). Die photographische Abbildung der Zellen wurde bei einer Vergrößerung von 20x durchgeführt.



Die Zellen wurden zusätzlich mit einer Giemsa-Färbung auf den Platten angefärbt. Abb. 18 zeigt NIH 3T3 Tet-off Zellen, die für 24 Tage mit (+) oder ohne (-) Tetrazyklin kultiviert wurden. Foci, entstanden aus morphologisch transformierten Zellen, sind als kleine schwarze Flecken zu erkennen. Festzuhalten bleibt dabei, daß die Expression von SAPK β -MKK7, im Gegensatz zu klassischen Onkogenen wie Ras oder Raf, nur zu einer Entwicklung von starken Zellanhäufungen mit sehr kleinen Durchmessern führte. Im Vergleich dazu zeichnen sich durch onkogenens Raf induzierte Foci vor allem durch ihr enormes Breitenwachstum aus (siehe auch Detailausschnitt einer Platte mit durch v-Raf transformierter NIH 3T3 Zellen). Statistische Analysen ergaben, dass von $8 \cdot 10^5$ ausgesäten Zellen im Durchschnitt 111.5 ± 21.6 Foci pro Platte (\varnothing 9 cm) mit SAPK β -MKK7 exprimierenden Zellen (- Tet) ausgebildet wurden. Während bei gleicher Zellzahl im nicht-induzierten Zustand lediglich 77.5 ± 13.2 Foci gezählt werden konnten. Als weitere Kontrolle dieser Ergebnisse sollte auch die

Fähigkeit zur Focibildung von mit SAPK β -MKK7 transient transfizierten NIH 3T3 Zellen überprüft werden. Allerdings konnte bei diesem Versuchsansatz keine Focusformation beobachtet werden. Parallele Platten, die nicht nach 24 Tagen mit Giemsa gefärbt wurden, dienten der Gewinnung von Proteinlysaten. In Western-Blot Analysen ergab sich hierbei, dass die transient transfizierten Zellen ihre Fähigkeit, SAPK β -MKK7 zu exprimieren, verloren hatten (Daten hier nicht dargestellt). Weitere Transformationsexperimente wurden mit zwei SAPK β -MKK7 stabil exprimierenden NIH 3T3 Zelllinien durchgeführt, die fortwährend unter Selektionsbedingungen gehalten wurden. Während ein Klon, der SAPK β -MKK7 nur in geringen Mengen exprimierte, keine Focusbildung erkennen ließ, konnten bei einem zweiten Klon, dessen Expressionsmenge um einiges höher lag, wenige, kleine Foci detektiert werden (Daten hier nicht dargestellt). Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass nicht nur hohe Mengen an aktiviertem SAPK β -MKK7 in den Zellen exprimiert werden müssen, um die Bildung von Foci zu induzieren, sondern die Zellen müssen auch unter permanenter Selektion stehen, um nicht von nicht-exprimierenden Zellen überwachsen zu werden. SAPK β -MKK7 KD transient, stabil oder induzierbar in NIH 3T3 Zellen exprimiert, verursachte in keinem Fall Focusformationen (Daten hier nicht gezeigt).

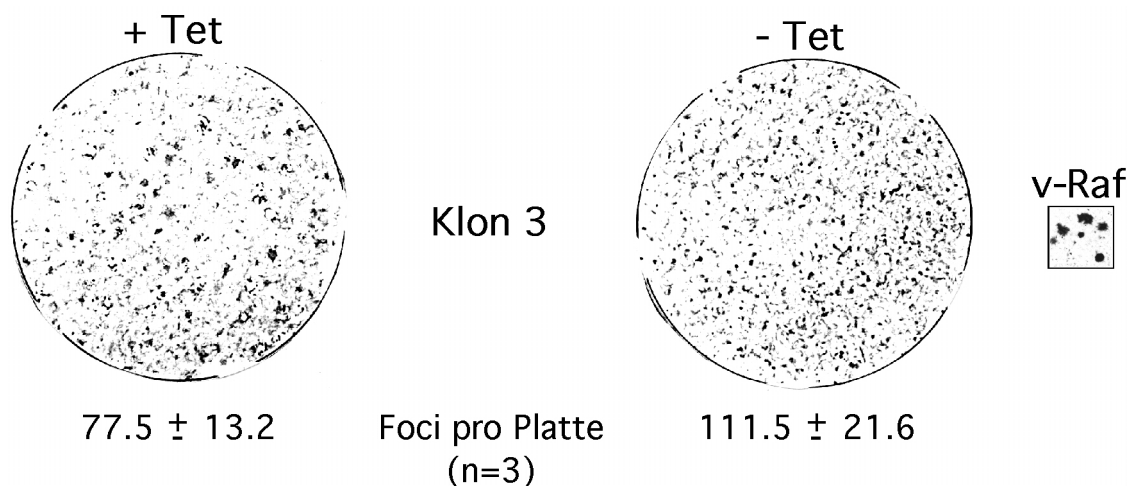


Abb. 18: Giemsa Färbung der durch die Expression von SAPK β -MKK7 erzeugten Foci.

$8 \cdot 10^5$ Zellen der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie wurden für 24 Tage unter Vollserumbedingungen (10%) auf Petrischalen (\varnothing 9 cm) kultiviert. Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium induzierte dabei die Expression von SAPK β -MKK7, während die Anwesenheit diese nahezu inhibierte. Pro Versuchsansatz (+ oder - Tet) wurden jeweils drei parallele Platten mit der gleichen Anzahl an Zellen ausgesät. 24 Tage später erfolgte die Giemsa Färbung. Die Auswertung fand unter dem Lichtmikroskop statt. Für die statistische Darstellung der Daten wurden der Mittelwert und die dazugehörige mittlere Standardabweichung berechnet.

Ein weiteres Charakteristikum transformierter Zellen stellt ihre Fähigkeit dar, in Soft-Agar zu wachsen, da sie keine feste Oberfläche mehr benötigen, auf der sie sich anheften müssen. Soft-Agar Experimente weisen somit, im Vergleich zu Focusanalysen, die stringenteren Versuchsbedingungen auf. Um zu überleben, muß das exprimierte Protein den Zellen spezifische Eigenschaften verleihen und nur seine permanente Präsenz garantiert ihr Wachstum. Zu Beginn dieses Experimentes wurden 1000 Zellen der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie in Soft-Agar enthaltenden Petrischalen ausgesät und mit (+) oder ohne (-) Tetrazyklin versetztem Kulturmedium überschichtet. Fotos, nach 18 Tagen Wachstum aufgenommen, belegen, dass SAPK β -MKK7 exprimierende Zellen, im Vergleich zur Negativkontrolle (unter + Tetrazyklin-Bedingungen), in der Lage waren, Kolonien in Soft-Agar zu bilden (Abb. 19A). Statistisch gesehen wuchsen etwa $19.9\% \pm 4.6$ der ausplattierten, SAPK β -MKK7 exprimierenden Zellen (- Tet) zu Kolonien heran. Im Gegensatz hierzu wuchsen lediglich $5.4\% \pm 0.6$ der ausgesäten Zellen zu Kolonien heran, in denen die SAPK β -MKK7 Expression durch die regelmäßige Gabe von Tetrazyklin inhibiert worden war. Vergleicht man hierbei die Koloniegröße mit der durch klassische Onkogene wie Ras oder Raf erzeugten Kolonien, so fällt vor allem der sehr kleine Durchmesser von SAPK β -MKK7 induzierten Kolonien auf. Ein Indiz, welches abermals auf ein nur schwach transformierendes Potential von SAPK/JNK Kinasen hindeutet. Nicht alle anfangs ausgesäten Zellen, die unter Tetrazyklin-freien Bedingungen kultiviert wurden, waren letztendlich zur Koloniebildung fähig. Nur etwa 20% der ursprünglich eingesetzten Zellen konnten in Soft-Agar überleben und proliferieren. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis liefern die stark variierenden Expressionen von SAPK β -MKK7 innerhalb der Zellpopulation (vgl. auch Kapitel 5.9). Vermutlich sind höhere Mengen an konstitutiv-aktivem SAPK β -MKK7 in einer Zelle nötig, um ihr Überleben zu garantieren. Einzelne Kolonien, die aus dem Soft-Agar isoliert und in Kultur genommen wurden, zeigten in Western-Blot Analysen einen relativ hohen Expressionslevel für SAPK β -MKK7 verglichen mit stabil exprimierenden Zelllinien (Daten nicht dargestellt). Als zusätzliche Kontrolle wurden NIH 3T3 Fibroblasten transient mit SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD, dem Leervektor pcDNA3 oder als Positivkontrolle mit onkogenem v-Raf transfiziert und anschließend sieben Tage mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert, bevor sie auf die Soft-Agar Platten verteilt wurden (Abb. 19B). Während die Expression von SAPK β -MKK7 KD ($3.0\% \pm 1.3$) und der Leervektor ($6.1\% \pm 2.8$) nur in geringen Maßen eine Koloniebildung hervorriefen, vermochten ($13.3\% \pm 2.6$) der SAPK β -MKK7 transient transfizierten Zellen Kolonien in Soft-Agar auszubilden. Ein

Größenvergleich mit v-Raf exprimierenden Zellen zeigte jedoch wiederum die schwach transformierende Wirkung von SAPK β -MKK7.

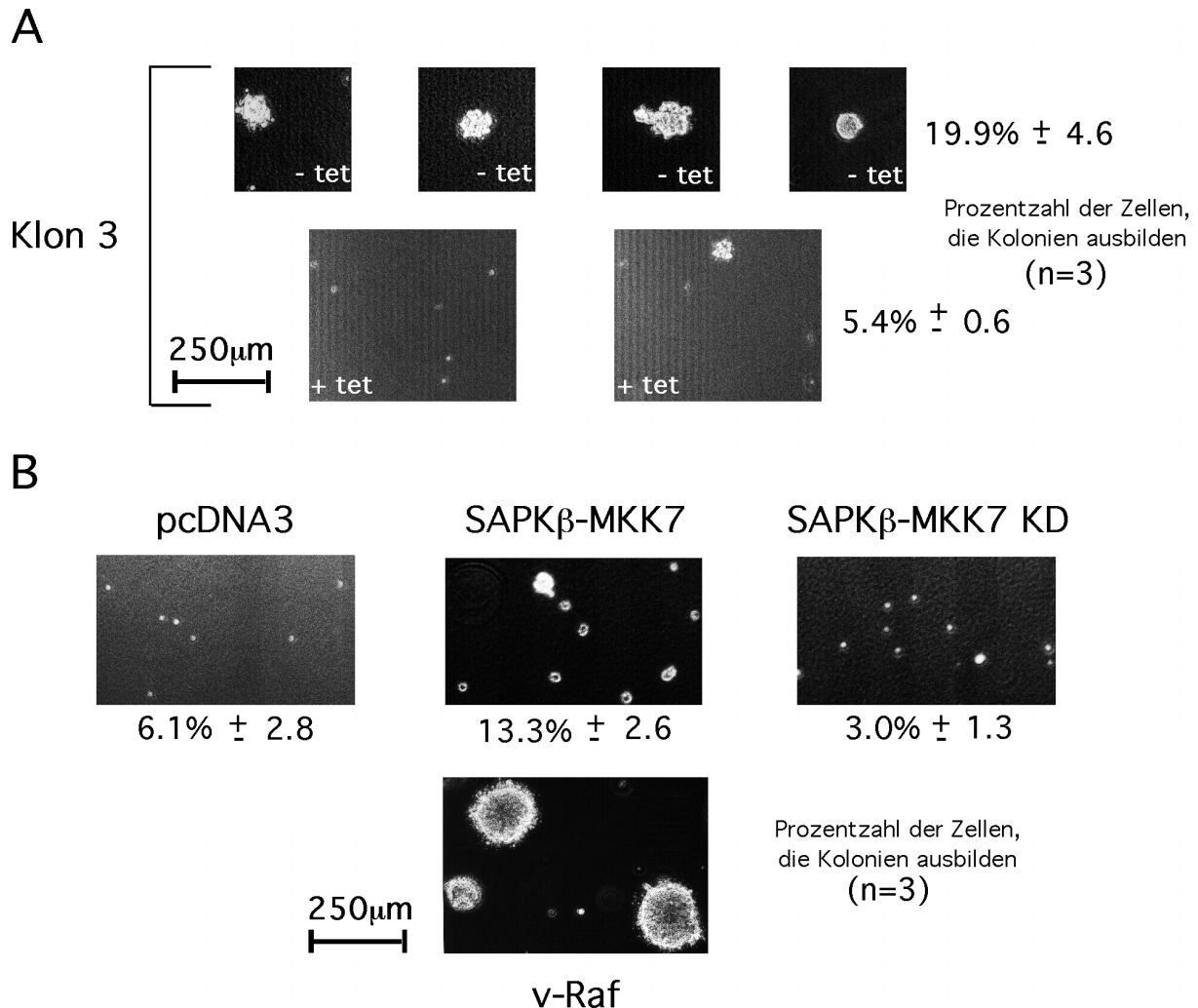


Abb. 19: Zellen, die das konstitutiv-aktive Fusionsprotein SAPK β -MKK7 exprimieren, sind zur Koloniebildung in Soft-Agar fähig.

A) 1000 Zellen der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie wurden in Soft-Agar enthaltenden Petrischalen (\varnothing 6 cm) ausgesät. Durch die regelmäßige Überschichtung des Agars mit frischem Tetracyclin-haltigem Medium (2 μ g/ml) wurde die Expression von SAPK β -MKK7 in der Hälfte aller angesetzten Platten inhibiert (+ Tet). B) NIH 3T3 Fibroblasten wurden mit Expressionsplasmiden für SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD, dem Leervektor oder v-Raf transfiziert. Am nächsten Tag wurde jeweils 4/5 des Transfektionsansatzes auf eine Petrischale (\varnothing 9 cm) ausplattiert. Nach einer Woche Selektion in Geneticin G418 (450 μ g/ml) erfolgte das Aussäen von je 5000 Zellen in Soft-Agar Platten. Für die statistische Auswertung wurden sowohl für A) als auch B) 18 Tage nach Beginn des Soft-Agar Experimentes Kolonien mit einer Größe von mehr als 12 Einzelzellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die angegebenen Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils drei parallelen Platten mit der dazugehörigen Standardabweichung.

5.11 SAPK β -MKK7 führt nur zu einer sehr schwachen Stimulation eines AP-1/Ets-1-abhängigen Promotors

Cot und MLK3, zwei Aktivatoren der SAPK/JNK Kaskade, und viele weitere Proteine mit onkogenem Potential (wie beispielsweise aktiviertes C-Raf) sind in der Lage, die Transkription von Promotoren mit AP-1/Ets Bindestellen zu regulieren (Bruder et al. 1992; Wasylyk et al. 1998; Hagemann et al. 1999; Hartkamp et al. 1999). Um die Stärke des transformierenden Potentials von SAPK β -MKK7 besser einordnen zu können, wurde dessen Fähigkeit die Transkription eines pB4X Luciferase Reporterkonstruktes zu aktivieren, gemessen. pB4X (Wasylyk et al. 1998) beinhaltet vier Kopien des ORE (*oncogene esponsive element*) aus dem Polyomavirus Enhancer, wobei jede der vier Kopien eine AP-1 Bindestelle, die mit einer Ets-1 Bindestelle überlappt, besitzt (Wasylyk et al. 1998). Dieser Enhancer wurde stromaufwärts (*upstream*) von mit einem *Luciferase* Gen fusionierten β -Globin Promotors inseriert. Verglichen mit dem Leervektor induzierte die Überexpression von SAPK β -MKK7 in transient transfizierten HEK293 Zellen eine um den Faktor 5 gesteigerte transkriptionelle Aktivierung des Reporterkonstruktes (Abb. 20). Die Werte für die inaktive Mutante SAPK β -MKK7 KD lagen auf dem Niveau der Vektorkontrolle. Überexpression von MLK3 diente als Positivkontrolle und führte zu einem 22-fachen Anstieg der Transkription. Dieses Experiment bestätigte nochmals, dass nur sehr schwach ausgeprägte, transformierende Potential von SAPK β -MKK7 und zeigte, dass die Kinasedomäne hierfür von essentieller Bedeutung ist. Die für MLK3 verifizierten Werte korrelierten gut mit denen von Hartkamp et al. publizierten Ergebnissen (Hartkamp et al. 1999). Innerhalb dieser Studie führte die Expression von aktiviertem C-Raf-BxB zu einer 36-fachen Induktion des Reporterkonstruktes (Hartkamp et al. 1999).

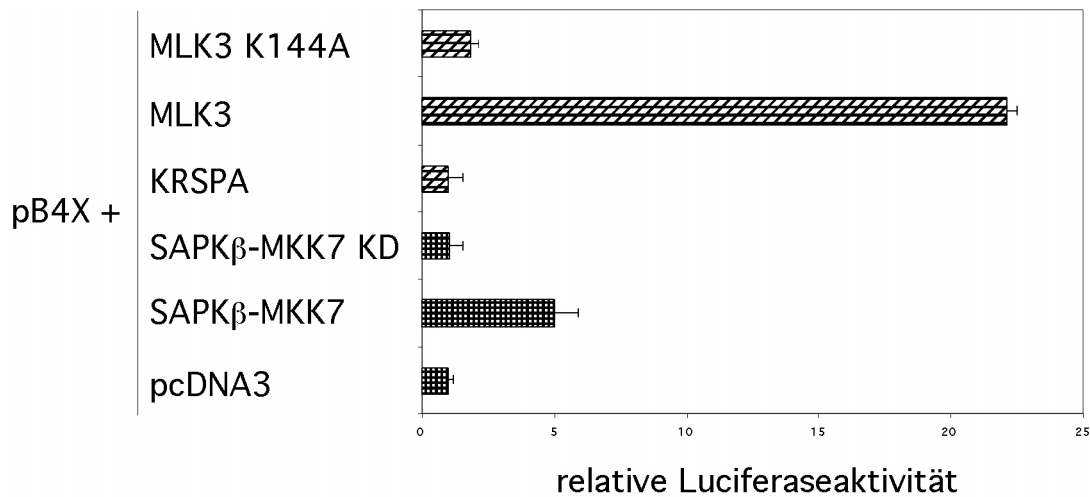


Abb. 20: SAPKβ-MKK7 induziert eine schwache Transaktivierung des AP-1/Ets-1-abhängigen Promoters.

HEK 293 Zellen wurden transient mit 0.5 µg pB4X Luciferase Reporterkonstrukt und 2 µg SAPKβ-MKK7, SAPKβ-MKK7 KD oder dem Leervektor pcDNA3 kotransfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit 2 µg KRSPA Leervektor bzw. MLK3 oder deren inaktive Mutante MLK3 K144A analysiert. Nach 40 h in Medium mit 0.3% Serum wurde der Luciferase-Assay ausgeführt. Die Werte wurden dabei auf die durch einen Biorad-Kit ermittelten Proteinkonzentrationen standartisiert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Luciferaseaktivität der beiden Leervektoren, die jeweils auf den Wert '1' gesetzt wurden. Wiedergegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Transfektionsansätzen.

5.12 SAPKβ-MKK7 Expression verursacht in NIH 3T3 Zellen die Zerstörung des F-Aktin Zytoskeletts

Morphologische Veränderungen von Zellen, wie sie im vorangegangenen Kapitel 5.10 vorgestellt wurden, sind mit Veränderungen des Zytoskeletts verknüpft (Rao and Cohen 1991). Kleine GTPasen der Rho-Familie spielen dabei eine essentielle Rolle. Rac und Cdc42, die die Filopodien- und Lamellipodienformation regulieren sowie für die Migration von Zellen entscheidend sind, konnten als Aktivatoren von SAPK/JNK Kinasen identifiziert werden (Ridley and Hall 1992; Nobes and Hall 1995; Nobes and Hall 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse lag es nahe zu untersuchen, ob auch aktiviertes SAPKβ-MKK7 Veränderungen des Zytoskeletts hervorrufen kann. Daher wurden in einem *in situ* Testsystem zum einen das F-Aktin durch eine Phalloidin-färbung markiert (grün), zum anderen wurde parallel in den gleichen Zellen die Expression von SAPKβ-MKK7 durch einen Myc-Antikörper kontrolliert (rot). Es zeigte sich, dass in induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zellen (Klon 3), die 48 Stunden in

Abwesenheit von Tetrazyklin wuchsen, die Ausbildung der einzelnen Aktinstressfasern stark beeinträchtigt war (Abb. 21A - Tet). Je nach Expressionsmenge der aktivierten SAPK β -MKK7 Kinase und/oder Expressionsdauer, erfolgte hierbei eine totale oder zumindest teilweise Zerstörung des Aktinskeletts. Maximale Degradation konnte nur bei einem sehr hohen Expressionslevel von SAPK β -MKK7 verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu blieb das Aktingerüst in nicht-exprimierenden Zellen intakt (Abb. 21A + Tet). Die in Kapitel 5.10 erwähnten Soft-Agar Klone, die SAPK β -MKK7 exprimieren, zeigten ebenfalls das gleiche Verhalten (Daten nicht dargestellt). Diese Ergebnisse ließen sich zusätzlich in mit SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD transient transfizierten NIH 3T3 Zellen bestätigen (Abb. 21B). Abermals konnte die Expression von SAPK β -MKK7 die Aktinskelettausbildung deutlich vermindern bzw. vollständig unterbinden, während die Expression von SAPK β -MKK7 KD ohne Folgen für den Zustand des Aktingerüsts blieb. Auch die Koexpression von SAPK β zusammen mit aktiviertem Cot Δ oder MLK3, beides Aktivatoren von SAPK β (Hagemann et al. 1999; Hartkamp et al. 1999), führte zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 21B). Die alleinige Transfektion von konstitutiv-aktivem MKK7 (S3E) hingegen führte nur selten zur Reduktion bzw. zu einer kompletten Degradation des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 21B). Da MKK7 (S3E) als relativ schwacher Aktivator endogener SAPK/JNK Kinasen gilt (belegt in eigenen Western-Blot Analysen, sowie durch Ergebnisse aus dem Labor von M. Kracht, persönliche Mitteilung), sind vermutlich auch die auf das Zytoskelett einwirkenden Aktivitäten endogener SAPK/JNK Kinasen entsprechend schwach ausgeprägt. Koexpression von MKK7 (S3E) mit SAPK β hingegen induzierte mit Cot Δ und MLK3 vergleichbare Degradationen der F-Aktinstressfasern (Abb. 21B). Transfektion einer inaktiven MKK7 (S3A) Mutante führte zu keiner Beeinträchtigung der Zytoskelettformation (Abb. 21B).

Abb. 21: Konstitutiv-aktives SAPK β -MKK7 verursacht eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts von NIH 3T3 Fibroblasten.

A) Induzierbare NIH 3T3 Tet-off Zellen wurden für 48 h mit (+) bzw. ohne (-) Tetrazyklin (2 μ g/ml) in Vollmedium kultiviert, bevor die *in situ* Immunfluoreszenzanalyse erfolgte. B) NIH 3T3 Zellen wurden transient mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und 48 h später in *in situ* Immunfluoreszenzanalysen untersucht. In A) und auch B) wurden SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD oder SAPK β in den Zellen mit Hilfe eines anti-Myc Antikörpers lokalisiert, der von einem Cy3-konjugierten anti-Maus Antikörper sichtbar gemacht wurde (rot). Der Einsatz von FITC-Phalloidin markierte spezifisch das Aktin-Zytoskelett (grün). Die Expression aller übrigen, transfizierten Konstrukte wurden in Western-Blot Analysen überprüft. (Abb. siehe nächste Seite)



5.13 Erfordert die Degradation des F-Aktin-Zytoskeletts in NIH 3T3 Fibroblasten die nukleärer Lokalisation von SAPK β -MKK7?

Nachdem im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Befund einer durch die Expression von SAPK β -MKK7 induzierten Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts stellte sich nachfolgend die Frage, über welche spezifischen Zielproteine der SAPK/JNK Kinasen dieser Effekt vermittelt wird. Diese Frage konnte im Rahmen der Doktorarbeit nicht beantwortet werden und bedarf weiterer intensiver Analysen unter Zuhilfenahme von z.B. Microarray-Techniken oder Two-Hybrid Methoden, um durch SAPK β -MKK7 regulierte Gene bzw. bislang unbekannte Interaktionspartner zu ermitteln. Wie jedoch in der Einleitung bereits erwähnt, können Zielproteine von SAPK/JNKs in zwei Kategorien aufgeteilt werden. Neben zytoplasmatischen Substraten und Interaktionspartnern existieren auch nukleäre Zielproteine. Meist handelt es sich hierbei um Transkriptionsfaktoren, die die Funktion von SAPK/JNKs bei der Genregulation vermitteln. In einem ersten Schritt wurde daher untersucht, ob zytoplasmatische bzw. nukleäre Interaktionspartner von SAPK β -MKK7 die Degradation des F-Aktin-Zytoskeletts verursachen. Nukleäre Proteine erfordern die Kerntranslokation von SAPK β -MKK7. Um diese Lokalisation von konstitutiv-aktivem SAPK β jedoch zu unterbinden, wurden NIH 3T3 Fibroblasten mit JIP-1 sowie SAPK β -MKK7 oder SAPK β -MKK7 KD kotransfiziert und mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen das Zytoskelett analysiert. JIP-1 dient als Brückenprotein innerhalb der SAPK/JNK Kaskade und sorgt für die exakte, rasche Weiterleitung von Signalen (Dickens et al. 1997) (siehe Einleitung Kapitel 2.4). Überexprimiert, verhindert es nicht nur die effiziente Aktivierung von SAPK/JNKs (Dickens et al. 1997), sondern auch die Translokation von aktiviertem SAPK β (vgl. auch Kapitel 5.3). Bei der Kotransfektion von JIP-1 mit SAPK β -MKK7 wurden folglich jene Zellen für die Untersuchung herangezogen, in denen die Lokalisation des Fusionsproteins ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkt war. Betrachtete man das Aktin-Zytoskelett dieser Zellen, so konnte festgestellt werden, dass es trotz SAPK β -MKK7 Expression normal entwickelt war (Abb. 22). Der oben beschriebene Effekt des aktivierten Fusionsproteins auf die F-Aktinstressfasern konnte also durch die Beschränkung der Lokalisation auf das Zytoplasma eindeutig inhibiert werden. Folglich wären nukleäre Proteine für die Vermittlung des Zytoskelettphänotyps notwendig. Koexpression von JIP-1 und SAPK β -MKK7 KD als auch die alleinige Überexpression von JIP-1 in Fibroblasten hatten keinerlei Einfluß auf das Aktin-Zytoskelett. Parallel wurde auch statt des vollständigen JIP-1 Proteins die isolierte JNK-bindende Domäne (JBD) für dieses Experiment eingesetzt. Hierbei zeigte sich jedoch,

dass es nicht möglich war, durch die Koexpression von JBD die Lokalisation von aktiviertem SAPK β -MKK7 ausschließlich auf das Zytoplasma zu beschränken. Wenn auch in seiner Menge deutlich reduziert, konnte auch weiterhin aktiviertes SAPK β im Nukleus lokalisiert werden, weshalb die F-Aktinstressfasern dieser Zellen ganz fehlten bzw. in ihrer Zahl stark reduziert waren (Daten nicht gezeigt).

Um Informationen über die Geschwindigkeit der SAPK β -MKK7-induzierten Aktindegradation zu erhalten, wurde der SAPK/JNK Aktivator Arsenit verwendet. Hierbei ergaben sich in NIH 3T3 Zellen, die 24 Stunden vor der Induktion mit Arsenit (500 μ M für eine Stunde) mit Niedrigserumkonzentrationen kultiviert wurden, keine morphologischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts (Daten hier nicht dargestellt). Parallel wurde auch der Einfluß einer 24-stündigen Stimulation mit Arsenit (die Konzentration betrug 35 μ M) analysiert. Viele der betrachteten Zellen zeigten hierbei ein komplett zerstörtes Zytoskelett (Daten hier nicht abgebildet). Allerdings handelt es sich bei dem gewählten Aktivator Arsenit um keinen Stimulus der spezifisch nur den Signalweg induziert, der zu einer Aktivierung von SAPK/JNKs führt. Beispielsweise wird auch der p38 MAP Kinase Signaltransduktionsweg stimuliert. Des Weiteren können toxische Effekte nach einer Langzeitwirkung von Arsenit auf die Zellen nicht ausgeschlossen werden, da sich insgesamt der morphologische Phänotyp der Zellen verändert hatte. Eine parallele Analyse der Kinaseaktivität von SAPK/JNKs über den Zeitraum von 24 Stunden nach Arsenitstimulierung wurde nicht durchgeführt. Literaturdaten demonstrierten jedoch eine anhaltende Stimulierung von JNK1-3 innerhalb der ersten 0.5-20 Stunden nach Zusatz von 10 μ M Arsenit (Namgung and Xia 2000).

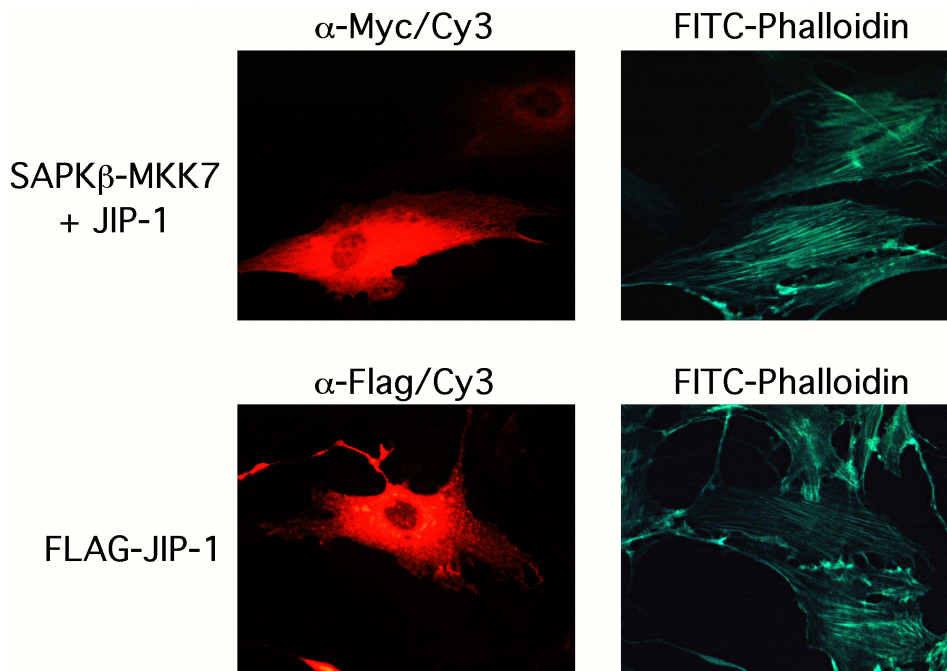


Abb. 22: Die nukleäre Lokalisation von SAPKβ-MKK7 in NIH 3T3 Fibroblasten könnte essentiell für eine Degradation des Aktin-Zytoskeletts sein.

2·10⁵ NIH 3T3 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden kodierend für Flag-JIP-1 alleine (alleine: 1.5 µg; in Kotransfektion: 1 µg) oder in Kombination mit Myc-SAPKβ-MKK7 bzw. Myc-SAPKβ-MKK7 (je 0.5 µg) transfiziert. Die Zellen wurden in Medium mit einer Konzentration von 10% Serum kultiviert, bevor sie für *in situ* Lokalisationsstudien verwendet wurden. Der Nachweis der SAPKβ-MKK7 bzw. SAPKβ-MKK7 KD Expression erfolgte mit einem anti-Myc Antikörper, gekoppelt mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper. Ausbildung des F-Aktin-Zytoskeletts wurde mit FITC-Phalloidin analysiert. Die Expression von Flag-JIP-1 wurde im Western-Blot überprüft (Daten hier nicht abgebildet). Die verwendete Vergrößerung betrug 40x.

Bei JIP-1 handelt es sich um ein Brückenprotein (*scaffold*) des SAPK/JNK Signaltransduktionsweges, das mehrere Komponenten der Kaskade zu binden vermag (Dickens et al. 1997) (siehe auch Einleitung 2.4). Dabei ist der Mechanismus dem die Komplexbildung zwischen den SAPK/JNK Kaskaden Mitgliedern und JIP-1 zugrunde liegt, sowie dessen Regulation, völlig unverstanden. In vielen Studien wird die Überexpression von JIP-1 oder dessen isolierte JNK-bindende Domäne (JBD) benutzt, um die Aktivierung der SAPK/JNK Kaskade und die daraus resultierende Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zu unterbinden. Es wird angenommen, dass die Überexpression von JIP-1 die Ausbildung von funktionstüchtigen Multienzymkomplexen verhindert und SAPK/JNKs im Zytoplasma zurückhält (Dickens et al. 1997). In Abb. 9 wurde gezeigt, dass die Überexpression von JIP-1 die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun durch

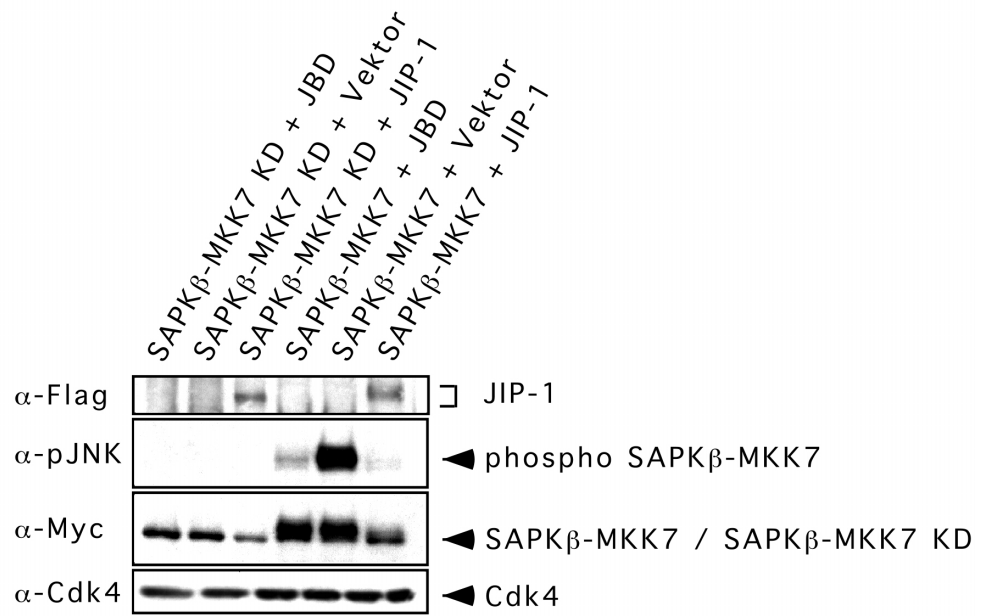
SAPK β -MKK7 verhindert. Ergebnisse aus Abb. 22 demonstrierten zusätzlich, dass die Überexpression von JIP-1 für eine auf das Zytoplasma beschränkte Lokalisation von SAPK β -MKK7 verantwortlich war. Folglich lag es nahe anzunehmen, dass JIP-1 auf unbekannte Weise den Transport von aktivierten SAPK/JNKs verhindert. Erst kürzlich konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid der JBD von JIP-1, als Inhibitor aktivierter SAPK/JNKs *in vitro* fungieren konnte (Barr et al. 2002). In transienten Transfektionsexperimenten sollte daher der Einfluß von JIP-1 bzw. JBD auf die Aktivität von SAPK β -MKK7 analysiert werden. NIH 3T3 Zellen wurden transient mit den in Abb. 23A/B genannten Expressionsplasmiden transfiziert. Einflüsse von Wachstumsfaktoren auf Signalkaskaden wurden verhindert, indem die Zellen 24 Stunden vor der Präparation der Proteinlysate mit nahezu serumfreien Medium (0.05%) versetzt wurden. Die Analyse im Western-Blot mit Hilfe eines phospho-JNK Antikörpers ergab eine klare Reduktion der Phosphorylierung von SAPK β innerhalb des Fusionsproteins, sobald dieses mit JIP-1 bzw. dessen isolierter JNK-bindenden Domäne (JBD) koexprimiert wurde (Abb. 23A Spur 6 und 4). Kotransfektion zusammen mit dem entsprechendem Leervektor führte dagegen zu einem deutlich aktivierten Fusionsprotein (Abb. 23A Spur 5). Eine leichte Reduktion der Expression beider Fusionsproteine (Abb. 23A Spur 6 und 3; α -Myc Blot) durch die Kotransfektion mit JIP-1 kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um den resultierenden Aktivitätsverlust von SAPK β -MKK7 zu demonstrieren, wurde als spezifisches Substrat die MAPKAP Kinase 3pK (MAPKAPK3) verwendet, da sie ein zytoplasmatisches Zielprotein aktivierter SAPK/JNKs darstellt (Ludwig et al. 1996) (Abb. 23B). Die Verwendung eines phospho-MAPKAP Kinase2 (MAPKAPK2) Antikörpers, der allerdings auch phosphoryliertes 3pK erkennt, zeigte hierbei deutlich die Inhibierung der Phosphorylierung von 3pK, sobald sie zusammen mit SAPK β -MKK7 und JIP-1 bzw. JBD kotransfiziert wurde (Abb. 23B Spur 2, 6 und 7). Im Gegensatz hierzu verursachte die Verwendung des SAPK/JNK und p38 Stimuli Arsenit eine eindeutige Phosphorylierung von 3pK (Abb. 23B Spur 4). Gleiches traf auch für die Koexpression von 3pK zusammen mit SAPK β -MKK7 zu (Abb. 23B Spur 3 und 5). Mit Hilfe eines anti-Flag Antikörpers sollte die Expression des Flag-getaggten JIP-1 Proteins nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die Koexpression mit SAPK β -MKK7 zu einem leichten zusätzlichen 'Shift' von JIP-1 führte, der als Zeichen für eine Phosphorylierung gewertet werden kann (Abb. 23A Spur 6). Bei Kotransfektion zusammen mit dem inaktiven Fusionsproteins (Abb. 23A Spur 3) oder dem Leervektor (hier nicht dargestellt), erfolgte keine Phosphorylierung von JIP-1. Die Beobachtung, dass JIP-1 durch seine MAPK SAPK/JNK phosphoryliert werden kann, wurde bereits in einer Publikation von Dickens et al.

beschrieben (Dickens et al. 1997) Die physiologische Funktion dieser Phosphorylierung ist allerdings vollkommen unbekannt. Zusammenfassend läßt sich aus diesen Daten die folgende Hypothese entwickeln: aktiviertes SAPK β -MKK7 bindet an JIP-1 und phosphoryliert dieses, wodurch nachfolgend SAPK β -MKK7 durch JIP-1 inaktiviert wird. Somit beeinflussen JIP-1 bzw. JBD nicht den direkten nukleären Translokationsprozess von aktiviertem SAPK β -MKK7, sondern SAPK β -MKK7 verbleibt vielmehr deshalb im Zytoplasma, da seine Phosphorylierung durch JIP-1 aufgehoben wurde. Insgesamt betrachtet, erlauben diese neuen Daten keine konkreten Aussagen, über die Notwendigkeit von nukleärem aktiviertem SAPK β -MKK7 bei der Degradation des F-Aktin-Zytoskeletts, zu formulieren. Die in Abb. 22 dargestellten Ergebnisse sind daher mit einem großen Fragezeichen zu versehen und bedürfen weiterer Experimente, um den Sachverhalt vollständig klären zu können!

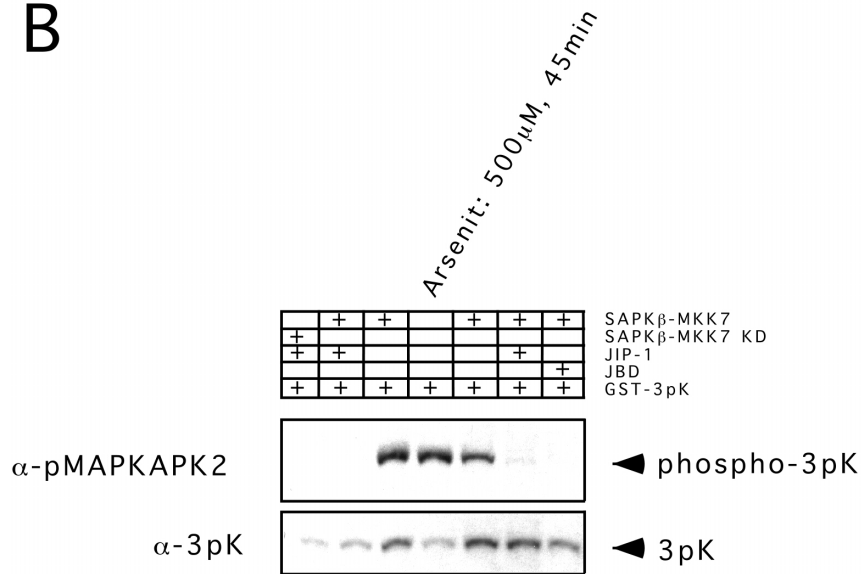
Abb. 23 Die Koexpression von JIP-1 bzw. JBD inhibiert die Kinaseaktivität von SAPK β -MKK7.

2·10⁵ NIH 3T3 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden kodierend für Flag-JIP-1, HA-JBD, Myc-SAPK β -MKK7, Myc-SAPK β -MKK7 KD und GST-3pK transfiziert (je 0.5 μ g). Um konstante DNA-Mengen zu transfizieren, wurde gegebenenfalls mit Leervektor (pcDNA3) ausgeglichen. Einflüsse von Wachstumsfaktoren auf Signalkaskaden wurden verhindert, indem die Zellen 24 Stunden vor der Präparation der Proteinlysate mit nahezu serumfreien Medium (0.05%) versetzt wurden. A) Der Nachweis über die Phosphorylierung von SAPK β -MKK7 erfolgte mit einem anti-phospho-JNK Antikörper. Für die nachfolgenden Expressionskontrollen wurde der Antikörper jeweils mit Stripping-Puffer von der Nitrozellulosemembran entfernt und der Blot anschließend mit einem anti-Myc Antikörper inkubiert, um die Expression von SAPK β -MKK7 und dessen inaktiver Form nachzuweisen. Des Weiteren wurde auf dieser Membran die Expression von JIP-1 mit Hilfe eines anti-Flag Antikörpers analysiert. Als Ladungskontrolle wurde ein zusätzliches Gel mit gleichen Proteinmengen beladen und die Nitrozellulosemembran mit einem anti-Cdk4 Antikörper inkubiert. B) Der Nachweis von phosphorylierter 3pK erfolgte mit Hilfe eines anti-phospho-MAPKAPK2 Antikörpers. Als Kontrolle dienten hierbei NIH 3T3 Zellen die mit GST-3pK transfiziert und mit Arsenit (500 μ M, 45 min) stimuliert wurden. Nachfolgend wurde der Antikörper von der Membran abgelöst und diese dann mit einem anti-3pK Antikörper inkubiert, um dessen Expression nachweisen zu können. (Abb. siehe nächste Seite)

A



B



5.14 Konstitutiv-aktives SAPK β induziert die Tumorbildung *in vivo*

Vorangegangene Experimente demonstrierten ein schwach transformierendes Potential für SAPK β -MKK7. Um dessen *in vivo* Tumorgenizität zu analysieren, wurden ein SAPK β -MKK7 stabil exprimierender Zellpool von NIH 3T3 Fibroblasten beidseitig subkutan in die Flanken einer Nacktmaus injiziert. Da diese Tiere keinen Thymus besitzen, können fremde Zellen auch nicht vom körpereigenen Immunsystem abgestoßen werden. Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Illert aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg durchgeführt. 36 Tage nach Injektion der Zellen konnte die Entwicklung eines sehr flach angelegten Tumors registriert werden (Durchmesser zu diesem Zeitpunkt etwa 7 mm) (Abb. 24). Obwohl beidseitig je 3 Millionen Zellen in die Maus injiziert wurden, kam es nur auf einer Seite zur Tumorbildung, wobei es sich jedoch um kein außergewöhnliches Phänomen handelte (unveröffentlichte Ergebnisse aus dem Arbeitskreis von Dr. Illert). Die Tumorentstehung in Mäusen, ausgelöst durch akut transformierende Onkogene wie beispielsweise v-Raf, ist in zahlreichen Publikationen beschrieben worden (Übersichtsartikel siehe: Hampton et al. 1990). v-Raf transformierte NIH 3T3 Zellen wurden daher als Positivkontrolle in eine zweite Maus gespritzt. Bei dieser Maus konnte bereits nach 17 Tagen eindeutig die beidseitige Tumorformation festgestellt werden. Nach weiteren acht Tagen musste die v-Raf Maus aufgrund der Tumorgröße getötet werden. Als Negativkontrolle wurden nicht-transformierte NIH 3T3 Fibroblasten in eine dritte Maus injiziert. Diese Maus zeigte auch nach über vier Monaten keine Tumorformation.

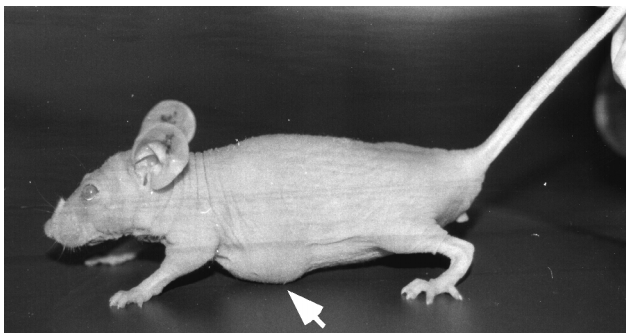


Abb. 24: Tumorwachstum in einer Nacktmaus, induziert durch die Injektion eines SAPK β -MKK7 stabil exprimierenden Pools an NIH 3T3 Zellen.

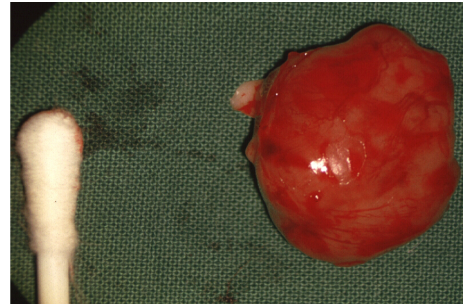
$2 \cdot 10^5$ NIH 3T3 Zellen wurden mit 1.5 μ g des Expressionsplasmid pcDNA3: Myc-SAPK β -MKK7 transfiziert und für 2 Wochen in Anwesenheit von G418 selektiert. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden sie

einmal in PBS gewaschen und anschließend in neuem PBS aufgenommen. Jeweils 3 Millionen Zellen wurden pro Mausflanke subcutan injiziert. 36 Tage später konnte die beginnende Formation eines Tumores beobachtet werden. Die fotografische Aufnahme der Nacktmaus erfolgte 40 Tage nach der Injektion. Die Vorgehensweise bei zwei weiteren Nacktmäusen, die mit Wildtyp NIH 3T3 Zellen bzw. mit durch EHneo: v-Raf transfizierte und selektionierte Fibroblasten injiziert worden waren, entsprach den oben genannten Bedingungen (Daten sind jedoch hier nicht dargestellt).

48 Tage nach der Zellinjektion wurde der Tumor aus der SAPK β -MKK7 Nacktmaus entnommen, wobei dieser jedoch noch keine Größe erreicht hatte, die eine Tötung des Tieres aus ethischen Gesichtspunkten dringend erforderlich machte. Der Tumor zeigte neben Verwachsungen mit den Rippen des Tieres ein auffallend stark ausgeprägtes Gefäßsystem (Abb. 25). Bei den durch v-Raf induzierten Tumoren handelte es sich um infiltrierende, nicht eingekapselte Tumoren (Daten hier nicht abgebildet).

Abb. 25: Präparation des SAPK β -MKK7-induzierten Tumors aus der Nacktmaus.

48 Tage nach der Zellinjektion wurde der SAPK β -MKK7 induzierte Tumor aus der Nacktmaus entnommen. Deutlich zu erkennen ist die stark ausgeprägte Gefäßversorgung des Tumors.



Stücke des SAPK β -MKK7 Tumors wurden für die Gewinnung von Tumorzellen eingesetzt. Die Zellen konnten hierbei ohne Wachstumsprobleme in Kultur genommen werden (selbst die permanente Selektion mit G418 stellte für sie kein Problem dar) und zeigten normale Proliferationsraten. Im Vergleich zu einer Wildtyp NIH 3T3 Fibroblastenlinie fielen sie vor allem durch ihren extrem transformierten Phänotypen auf (Abb. 26). Die Zellen wiesen durchgehend eine langgestreckte, spindelförmige Gestalt auf und sind durchaus mit der Morphologie von v-Raf transformierten Zellen vergleichbar (Abb. 26). Im Gegensatz dazu war das Aussehen von SAPK β -MKK7 exprimierenden NIH 3T3 Zellen, die aus Soft-Agar Klonen gewonnen wurden oder Zellen der induzierbaren NIH 3T3 Tet-Off (siehe auch Kapitel 5.10), vergleichsweise schwach morphologisch verändert.

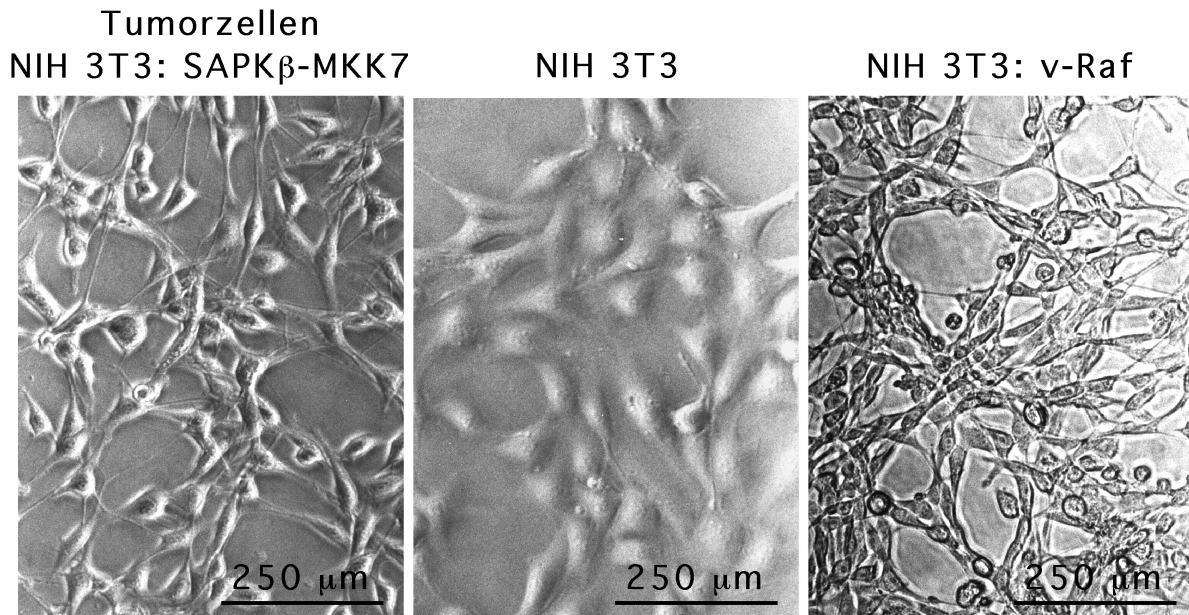


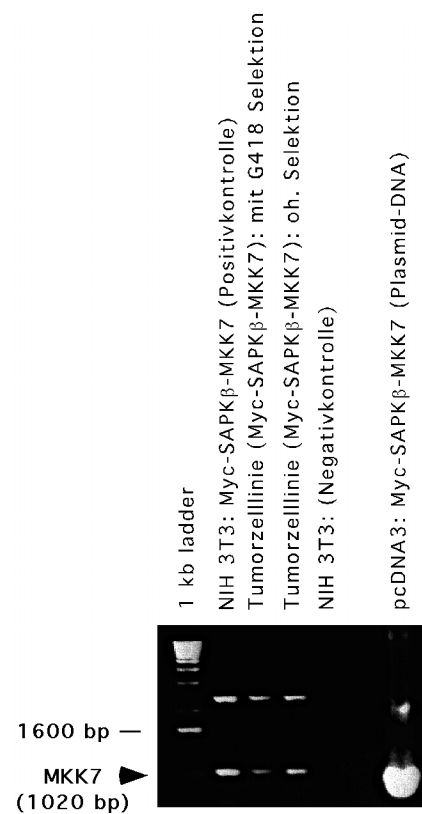
Abb. 26: Fotografische Aufnahme der aus dem SAPK β -MKK7-induzierten Tumor kultivierten Zellen.

Kleine Stückchen des Tumors wurden einmal in PBS gewaschen, unter sterilen Bedingungen mit dem Stempel einer Einwegspritze zerquetscht und anschließend auf eine 24-Well Platte verteilt. Als Kulturmedium wurde DMEM Medium mit 10% Serum verwendet. Zum Vergleich sind zusätzlich Zellen einer EHneo: v-Raf NIH 3T3 Fibroblastenlinie sowie Wildtyp NIH 3T3 Zellen dargestellt.

Tumorzellen wurden vor Beginn weiterführender Experimente expandiert, um in ihnen die Expression von SAPK β -MKK7 kontrollieren zu können. Der Nachweis erfolgte primär über eine PCR Analyse. Chromosomale DNA aus Primärzellen, die in An- bzw. Abwesenheit von G418 wuchsen, wurde mit Hilfe des „QIAamp Tissue Kits“ isoliert. In der nachfolgenden PCR Reaktion sollte die Anwesenheit von MKK7, welches für die Klonierung des konstitutiv aktiven Fusionskonstruktes SAPK β -MKK7 eingesetzt worden war, mit zwei spezifischen Primern kontrolliert werden, die ebenfalls bereits bei der Klonierung Verwendung fanden. Wie aus Abb. 27 zu ersehen, führte die isolierte genomische DNA aus den Tumorzellen (mit oder ohne G418 Selektion) in beiden Fällen zur Amplifikation des 1020 bp großen MKK7 Fragmentes (Abb 27 Spur 2 und 3). Als Positivkontrolle wurde chromosomale DNA aus SAPK β -MKK7 stabil exprimierenden NIH 3T3 Zellen verwendet, die nach Soft-Agar Experimenten in Kultur genommen worden waren (vgl. Kapitel 5.10). Im Gegensatz dazu konnte das spezifische MKK7 Fragment nicht aus isolierter DNA von Wildtyp NIH 3T3 Zellen (= Negativkontrolle) amplifiziert werden (Spuren 4 und 5).

Abb. 27: PCR Nachweis von SAPK β -MKK7 im Tumorgewebe.

Jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen wurden für die Isolierung von chromosomaler DNA mittels des „QIAamp Tissue Kits“ von Qiagen bereitgestellt. Als weitere Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA des Expressionsvektors Myc-SAPK β -MKK7 benutzt. Die PCR Ansätze wurden nach den Angaben der Hersteller der Taq-Polymerase zusammenpipettiert. Als spezifische Primer dienten 'MKK7-up (mouse; N-Ter)' sowie 'MKK7-low' (für die genauen Sequenzen: siehe Material und Methoden 3.1.9). Die gewählte Annealing-Temperatur betrug 70°C und die Elongationszeit wurde auf 90 s festgelegt. Nachfolgend wurden die PCR Ansätze mit DNA-Ladepuffer versetzt und jeweils 10 μ l der Aliquots auf ein 1% Agarosegel geladen.



Neben des Nachweises von SAPK β -MKK7 in den Tumorzellen wurden zusätzlich kleine Tumorstücke der Nacktmaus in RIPA-Puffer lysiert, um die Expression des Fusionsproteins im Western-Blot zu analysieren (Abb. 28). Zu einem wurde hierbei ein Teil des RIPA Lysates direkt mit Laemmli-Puffer versetzt, aufgekocht und somit Totallysate hergestellt (siehe rechte Hälfte des Western-Blots). Zum anderen wurden Immunpräzipitationen mit einem anti-Myc Antikörper durchgeführt, um Myc-SAPK β -MKK7 gezielt aus den RIPA Lysaten zu präzipitieren (Spur 1). Mit beiden Versuchsansätzen konnte eindeutig die Expression von SAPK β -MKK7 im Tumorgewebe belegt werden. Das Vorhandensein des Fusionsproteins SAPK β -MKK7 konnte zusätzlich auch aus Proteintotallysaten der Tumorzelllinie nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt).

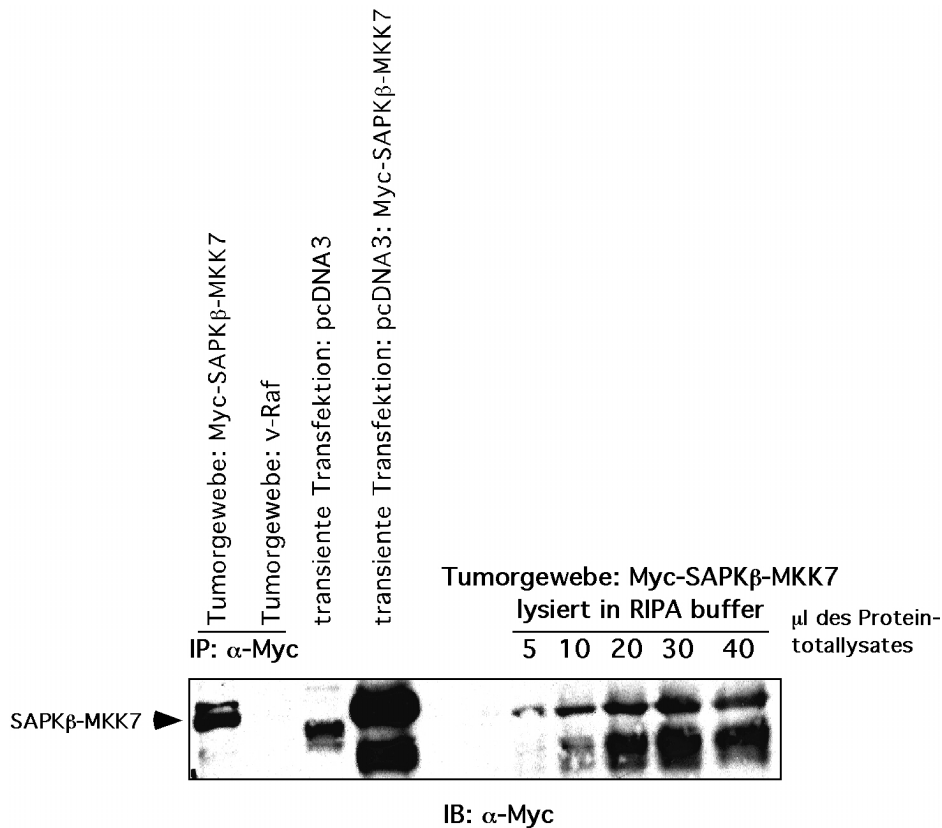


Abb. 28: Expressionsnachweis von SAPKβ-MKK7 im Tumorgewebe der Nacktmaus.

Kleine Tumorstücke der SAPKβ-MKK7 bzw. v-Raf Nacktmäuse wurden in RIPA lysiert. Ein Teil der Lysate wurde für Immunopräzipitationen verwendet, bei denen die Kopplung von Myc-SAPKβ-MKK7 an Protein A-Agarose Kügelchen mit Hilfe eines anti-Myc Antikörpers erfolgte (Spur 1 und 2). Daneben wurde RIPA-Lysat direkt in Laemmli-Puffer aufgekocht, um Totallysate aus dem Tumorgewebe zu generieren (rechter Teil des Blots). Als Expressionskontrollen dienten mit dem Leervektor pcDNA3 bzw. mit pcDNA3: Myc-SAPKβ-MKK7 transfizierte und in Laemmli-Puffer lysierte NIH 3T3 Fibroblasten (Spur 3 und 4). Der Immunoblot erfolgte mit einem anti-Myc Antikörper.

Für die histologische Analyse der SAPKβ-MKK7 bzw. v-Raf induzierten Tumore wurde von weiteren Tumorstücken in Zusammenarbeit mit Tamara Potapenko und Alla Gancher (beide Mitarbeiter des MSZ) Paraffinschnitte hergestellt und mit Eosin- und Hämatoxylin angefärbt. Dr. Axel Greiner (Pathologisches Institut, Würzburg) übernahm die pathologische Begutachtung der Schnitte (Abb. 29): Beim v-Raf Tumor (Abb. 29A) handelte es sich um ein hoch proliferierendes Fibrosarkom, das invasiv ins peritoneale Fettgewebe einwuchs. Auffällig war vor allem das Vorkommen von fischzugartigen (spindelförmigen) Tumorverbänden. Die Zellen wiesen hierbei 6-8 Mitosen pro HPF (*high power field*) auf (zum Vergleich: gutartiges Gewebe darf nicht mehr als 2 Mitosen pro HPF zeigen). Ein Wert, der somit die hohe proliferierende Aktivität des Tumorgewebes widerspiegelt. Da die

Vaskularisierung des Tumorgewebes gleichmäßig angelegt worden war, konnten deshalb wahrscheinlich auch keine Nekrosen festgestellt werden. Im direkten Vergleich dazu, war der durch die Expression von SAPK β -MKK7 induzierte Tumor (Abb. 29B) viel stärker vaskularisiert. Der Fachmann spricht hierbei auch von „pathologischen Gefäßen“. Es ließen sich sowohl viele große, weit verzweigte Gefäße ausmachen, daneben konnten auch viele kleinste Kapillaren entdeckt werden. Auffällig ist vor allem das dabei ausgebildete irreguläre Verzweigungsnetz. Aufgrund der nicht optimalen Gefäßversorgung erfolgte eine Mangelversorgung von Zellen innerhalb des Gewebes. Insgesamt zeigte der Tumor ein heterogenes Wachstumsprofil. Neben zell dichteren (lobulierten) Abschnitten existieren auch zellärmere Bereiche. Eine unregelmäßige Verteilung bestand auch beim Verhältnis Tumorgewebe zu Binde-(Begleit-) gewebe. Deutlich überwog die Existenz von Bindegewebe. Selbst die Zellgrundstruktur ist im Vergleich zu v-Raf Tumorzellen verändert. Statt der Spindelstruktur herrschten im SAPK β -MKK7-induzierten Tumor kleine, dafür kompaktere Zellen vor, die auch deutlich weniger Mitosen pro HPF aufwiesen. Die Ursache für die auftretenden Heterogenitäten innerhalb des SAPK β -MKK7 Tumors könnte in der Verwendung eines transfizierten Zellpools (statt einer klonalen Zelllinie) zu suchen sein. Zwar sollten die injizierten NIH 3T3 Zellen aufgrund der verwendeten Selektionsbedingungen alle SAPK β -MKK7 exprimieren, allerdings kann die Expressionsmengen von Zelle zu Zelle sehr differieren, was u.a. in *in situ* Lokalisationsexperimenten oder Focusformationsanalysen beobachtet werden konnte.

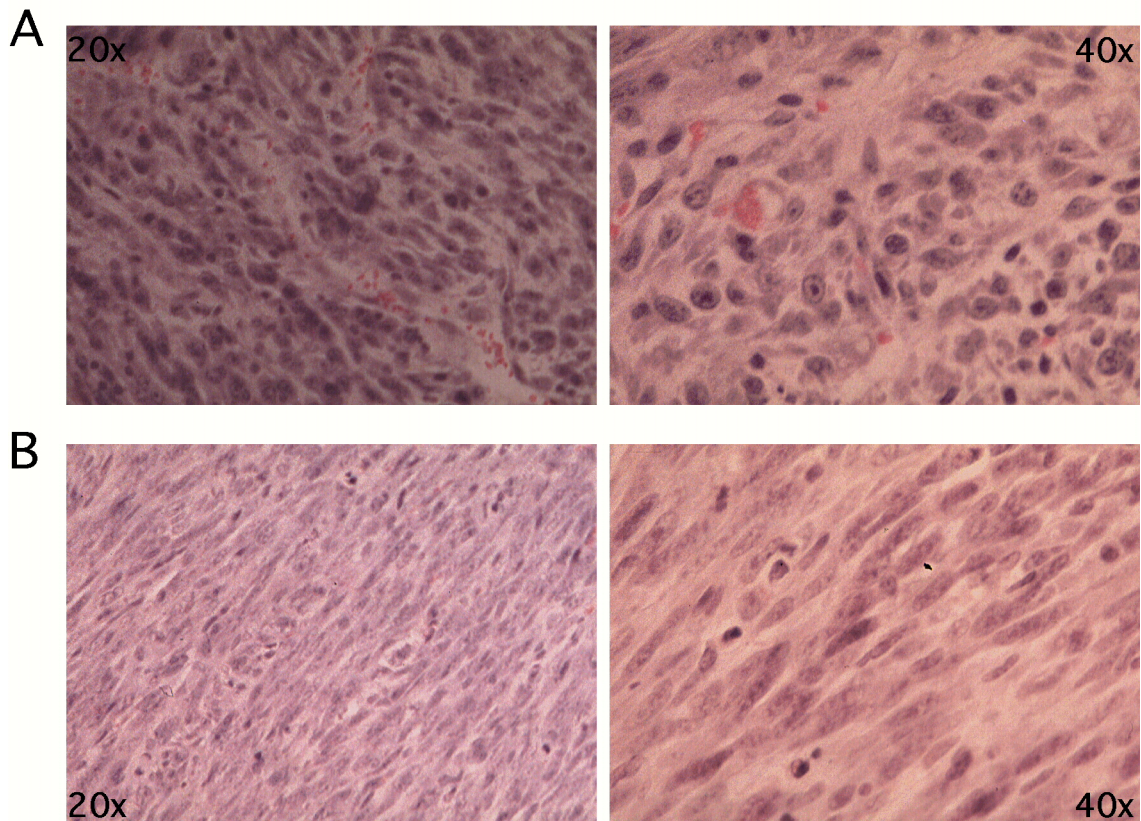


Abb. 29: Histologische Analyse des SAPKβ-MKK7-induzierten Tumorgewebes.

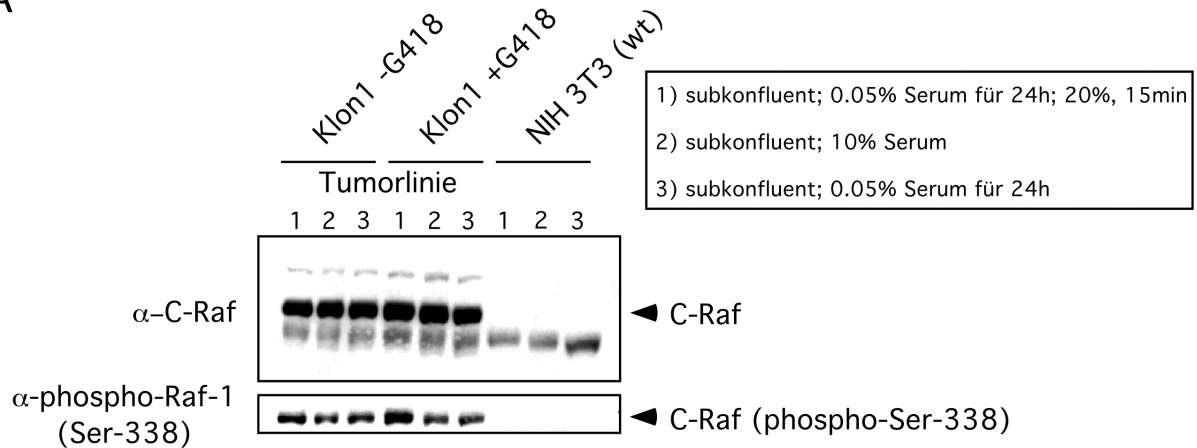
Stücke des A) SAPKβ-MKK7- und B) v-Raf-induzierten Tumors wurden in Paraffin eingebettet. Dünnschnitte wurden mit Eosin und Hämatoxylin gefärbt. Die verwendete Vergrößerung betrug 20x bzw. 40x.

Die Etablierung der durch SAPKβ-MKK7-induzierten Tumorzelllinie bietet die Möglichkeit eingehender zu analysieren, wie aktiviertes SAPKβ zur Entwicklung von Tumoren beitragen könnte. Aus diesem Anlass wurden Tumorzellen subkonfluent entweder unter nahezu serumfreien (0.05%) oder in Anwesenheit von 10% Serum kultiviert bzw. nach 24 Stunden in 0.05% Serum mit 20% FCS für 15 min stimuliert. Als Vergleich wurden Wildtyp NIH 3T3 Fibroblasten unter den gleichen Bedingungen herangezogen. Die aus den Zellen gewonnenen Proteinlysate wurden anschließend in diversen Western-Blot Ansätzen eingesetzt, um zu identifizieren, welche Proteine im Vergleich zu den Kontrollzellen, ein verändertes Expressions- und gegebenenfalls auch Phosphorylierungsmuster in der Tumorzelllinie aufweisen. Hierbei zeigte sich, dass in der durch SAPKβ-MKK7-induzierten Tumorzelllinie C-Raf deutlich überexprimiert wurde (Abb. 30A Spur 1-6). Für den Nachweis wurde ein Raf-Antikörper verwendet, der ausschließlich gegen C-Raf gerichtet ist. Seine Qualität war jedoch nicht ausreichend, um auch geringere Mengen an endogenem C-Raf in Wildtyp NIH 3T3 nachweisen zu können (Abb. 30A Spur 7-9). Literaturdaten belegen eindeutig die Existenz

von Raf-Proteinen in NIH 3T3 Zellen (Kolch et al. 1990). Zusätzlich wurde die gleiche Nitrozellulosemembran mit einem C-Raf spezifischen Antikörper inkubiert, der gegen das phosphorylierte Ser-338 in C-Raf gerichtet ist (Mason et al. 1999). Bei Ser-338 handelt es sich um eine der Schlüsselaminosäuren, die die Aktivität von C-Raf positiv regulieren können (Diaz et al. 1997; King et al. 1998; Mason et al. 1999). Hierbei zeigte sich, dass das C-Raf aus der Tumorzelllinie phosphoryliertes Ser-338 aufwies (Abb. 30A Spur 1-6). Dessen Menge konnte durch Serumstimulation (20% Serum, 15min) noch leicht gesteigert werden (Abb. 30A Spur 1 und 4).

Zusätzlich wurde mit Hilfe eines Peptid-Kompetitionsexperimentes überprüft, ob es sich eindeutig um C-Raf handelt, das in der Tumorzelllinie überexprimiert vorliegt (Abb. 30B). Hierfür wurden Tumorzellen subkonfluent mit 10% Serum, unter nahezu serumfreien (0.05%) Bedingungen, sowie unter 0.05% Serum mit einer kurzen Restimulationsphase von 15 Minuten mit 20% Serum kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert. Jeweils 300µg des Totallysats wurden mit einem Gemisch aus dem Raf-Antikörper SP63 und A- bzw. C-Raf Peptiden versetzt. Durch die Vorinkubation des Antikörpers mit dem C-Raf Peptid, ist die entsprechende Bindestelle auf dem Antikörper für C-Raf Protein blockiert. Folglich kann es in der Immunopräzipitation nicht aus dem Totallysat isoliert werden. Als Positivkontrolle wurden Immunopräzipitationen ausgeführt, in denen kein Peptid bzw. ein spezifisches A-Raf Peptid eingesetzt wurden. Das A-Raf Peptid ist aufgrund seiner Sequenz nicht in der Lage, an den C-Raf Antikörper (SP63) zu binden. Der Nachweis der präzipitierten Proteine im Western-Blot erfolgte über den C-Raf Antikörper (SP63). Bei diesem Experimente zeigte sich ebenso eindeutig, das C-Raf in der SAPKβ-MKK7-induzierten Tumorzelllinie überexprimiert vorliegt. Wurden Proteinlysate der Tumorzelllinie mit keinem Peptid (Abb. 30B Spur 4) oder mit einem spezifischen A-Raf Peptid (Abb. 30B Spur 5) inkubiert, so konnte eine Bande nachgewiesen werden, die leicht unter der 84 kDa Proteinmarkerbande verlief und somit das 72 kDa große C-Raf repräsentiert. Dagegen konnte durch die Verwendung des spezifischen C-Raf Peptides die Immunopräzipitation dieser Raf-Isoform unterbunden werden (Abb. 30B Spur 1, 2 und 3).

A



B

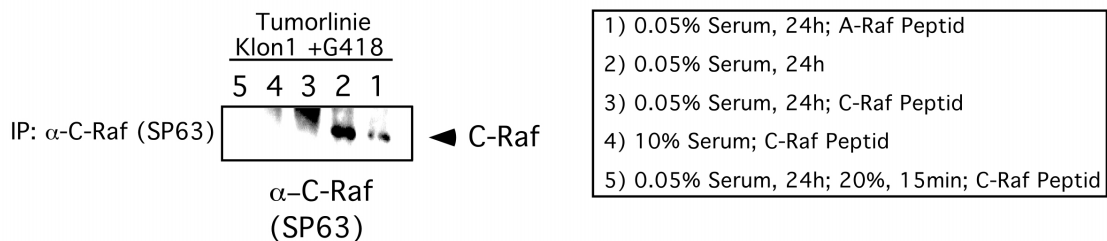


Abb. 30 SAPK β -MKK7-induzierte Tumorzellen weisen eine Überexpression an C-Raf auf.

SAPK β -MKK7-induzierte Tumorzellen und Wildtyp NIH 3T3 wurden, wie aus der Abbildung zu entnehmen, kultiviert. A) Die Zellen wurden in Laemmli-Puffer lysiert und jeweils 75 μ g der Proteintotallysate auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nachfolgend wurde die Nitrozellulosemembran mit einem anti-phospho-Raf-1 (Ser-338) Antikörper inkubiert, um die Existenz von aktiviertem C-Raf in den Zellen nachweisen zu können (unterer Blot). Nachdem die Membran mit Hilfe von Stripping-Puffer von diesem Antikörper befreit wurde, erfolgte die Analyse der C-Raf Expression durch einen anti-C-Raf Antikörper (oberer Teil der Abbildung). In beiden Fällen wurden identische Expositionszeiten verwendet. B) Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und jeweils 300 μ g dieser Totallysate für das Experiment eingesetzt. Bei der Verwendung von Peptiden (5 μ g pro Ansatz) wurden diese für 30min zusammen mit einem anti-C-Raf (SP63) Antikörper bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Diese Zeit ist ausreichend, um die Bindung des C-Raf Peptids an den Antikörper zu ermöglichen. Anschließend konnte das Proteinlysate hinzugefügt werden. Wurde kein Peptid verwendet, so wurde lediglich das Proteinlysate zusammen mit dem anti-C-Raf Antikörper inkubiert. Der Nachweis des immunopräzipitierten C-Rafs erfolgte auf der Nitrozellulosemembran mit Hilfe des anti-C-Raf (SP63) Antikörpers.

Insgesamt dürfen die in diesem Kapitel 5.14 dargestellten Ergebnisse nicht überbewertet werden, da sie auf der Analyse einer einzigen Nacktmaus beruhen. Weitere Nacktmäuse, denen SAPK β -MKK7-exprimierende Zellen injiziert werden, sind nötig, um diese ersten Tendenzen zu bestätigen. Diese Experimente sind momentan in Arbeit.

5.15 Die Expression von SAPK β -MKK7 in der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen

Neben der morphologischen Transformation von Zellen ist die Induktion einer deregulierten Proliferation ein weiteres Charakteristikum von klassischen Onkogenen (Kerkhoff and Rapp 1997; Kerkhoff and Rapp 1998; Hanahan and Weinberg 2000). SAPK/JNK Kinasen wurden als Proteine identifiziert, die mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun interagieren und diesen transaktivieren können (Karin et al. 1997). c-Jun fungiert als positiver Regulator der Zellproliferation (Schreiber et al. 1999). Die Inhibierung der SAPK/JNK Aktivität bzw. der in der Kaskade oberhalb befindlichen Aktivatoren verursacht einen Zellzyklusarrest (Smith et al. 1997; Auer et al. 1998). Daneben kann onkogenes Jun (v-Jun) zur deregulierten Proliferation führen (Angel and Karin 1991; Rapp et al. 1994). Um zu analysieren, welchen Einfluß eine konstitutive Aktivierung von SAPK/JNK ausübte, wurden SAPK β -MKK7 exprimierende induzierbare NIH 3T3 Tet-off Zellen des Klon 3 in Abwesenheit bzw. in der Gegenwart von Tetrazyklin für mehrere Tage bei einer Serumkonzentration von 10% kultiviert. Der Anstieg der Zellzahlen wurde mit Hilfe einfacher Zählexperimente verifiziert. Wie in Abb 31A zu sehen, induzierte die Expression von SAPK β -MKK7 (ausgelöst durch das Fehlen von Tetrazyklin im Medium) eine deutlich erhöhte Proliferationsrate. 48 h nach dem Aussäen der Zellen auf Kulturschalen lagen beide Populationen noch relativ gleich auf. Nach vier Tagen konnten jedoch im Falle der SAPK β -MKK7 exprimierenden Zellen im Schnitt ca. 30% mehr Zellen auf den Platten gezählt werden. Sechs Tage nach Starten des Versuches betrug die Differenz etwa 42%. Nach insgesamt acht Tagen lag die Differenz nur noch bei 25%. SAPK β -MKK7 exprimierende Zellen hatten bereits ihre Sättigungsdichte erreicht, die Proliferation stagnierte, während die Zellen, die in Anwesenheit von Tetrazyklin kultiviert wurden, ihre Zellzahl auf den Platten noch minimal steigern konnten. Verglichen mit der Sättigungsdichte für SAPK β -MKK7 exprimierende Zellen, lag die maximale Zahl an Zellen - bevor auch der Zellzyklusarrest bei den mit Tetrazyklin kultivierten Zellen einsetzte - deutlich unter diesem Wert. Die hier präsentierten Werte wurden mit einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen erzielt. Parallele Experimente mit $2 \cdot 10^5$ Zellen bestätigten die Ergebnisse (Daten hier nicht dargestellt). Klon 33 der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie wies ebenfalls vergleichbare Tendenzen auf, allerdings fielen die Differenzen insgesamt geringer aus, da dieser Klon eine stärkere Grundexpression von SAPK β -MKK7 im uninduzierten Zustand (+ Tet) zeigte. Der Einfluß von konstitutiv-aktivem SAPK β -MKK7 auf die Proliferationsraten von Zellen unter geringen Serumkonzentrationen von 0.3% bzw. 0.05% konnten nicht

analysiert werden, da wie bereits in Kapitel 5.7 erwähnt, unter diesen Versuchsbedingungen die Expression von SAPK β -MKK7 in den induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zellen rapide sank und nach spätestens 24 h nicht mehr nachzuweisen war.

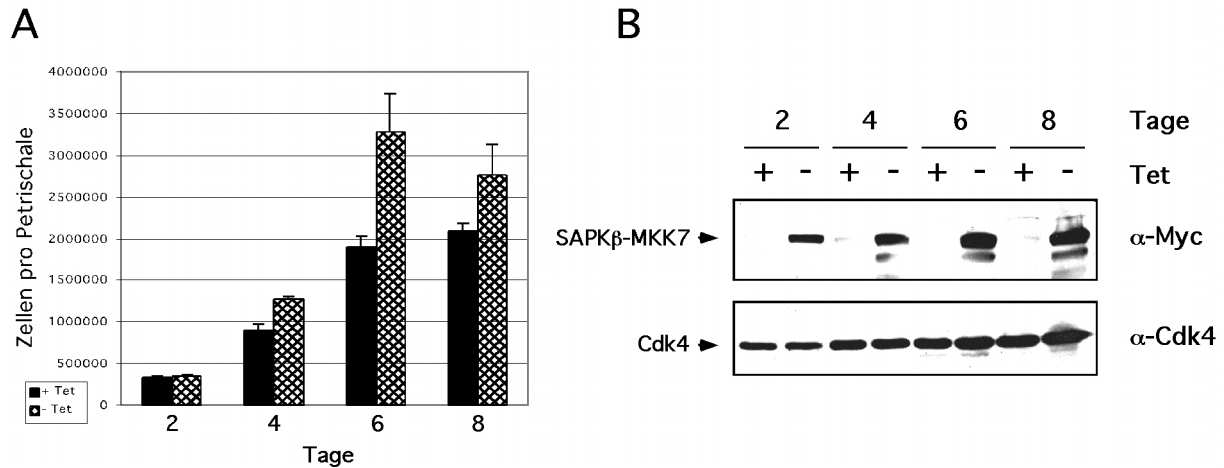


Abb. 31: SAPK β -MKK7 exprimierende NIH 3T3 Tet-off Zellen proliferieren schneller und wachsen zu einer höheren Dichte.

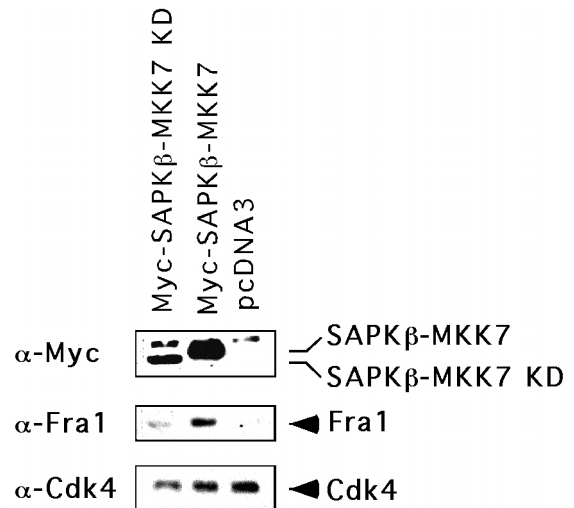
NIH 3T3 Tet-off Zellen des Klons 3 wurden zweimal mit PBS gewaschen, um Tetrazyklinrückstände von den Zellen zu entfernen. Zum Zeitpunkt 0 h wurden je $1 \cdot 10^5$ Zellen auf Petrischalen (\varnothing 6 cm) ausgesät und in Medium, welches 10% Serum, mit (+) bzw. ohne (-) Tetrazyklin (2 μ g/ml) enthielt, kultiviert. A) Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen wurden Zellen von den entsprechenden Platten typsinisiert und mit Hilfe einer Zählkammer die jeweiligen Zellzahlen bestimmt. Für die graphische Darstellung des Zählassays wurden die Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet. Die Mittelwerte stammen von drei unabhängig ausgezählten Platten. Nach vier Tagen wurden beide Ansätze einmal mit frischem Medium mit bzw. ohne Tetrazyklin versorgt. B) Nach dem Auszählen wurden die Zellen in Laemmli-Puffer lysiert und die Expression von SAPK β -MKK7 mit einem anti-Myc Antikörper kontrolliert. Die Verwendung eines anti-Cdk4 Antikörpers diente als Ladungskontrolle.

Eine Analyse des Einflusses von SAPK β -MKK7 auf die Zellzyklusprogression der NIH 3T3 Tet-off Fibroblasten zeigte, im Vergleich zur Kontrolle, unter sub- bzw. konfluenten Vollserumbedingungen in Western-Blot Experimenten keine Auffälligkeiten bei der Expression von charakteristischen Proteinen der Zellzyklusmaschinerie (Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D1, p21, p27, Cdk4 und Rb) (Daten nicht gezeigt). Auch mit SAPK β -MKK7 transient transfizierte NIH 3T3 Fibroblasten zeigten, im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle oder SAPK β -MKK7 KD transfizierten Zellen keine Veränderungen in den Expressionsmengen charakteristischer Zellzyklusproteine. Hierbei wurden Serumkonzentrationen von 0.05% und 10% ausgetestet (Daten hier nicht dargestellt).

Zusätzlich wurde die Suche nach potentiellen SAPK/JNK Zielproteinen mit transient transfizierten Proteinlysaten weiter ausgebaut. Als Ergebnis konnte eine deutlich gesteigerte Fra1-Expression durch die Induktion von aktiviertem SAPK β -MKK7 verzeichnet werden (Abb. 32). Ein Resultat, das sich auch mit Hilfe der induzierbaren Zelllinie (Klon 3) reproduzieren ließ (Daten hier nicht dargestellt).

Abb. 32: Konstitutiv-aktives SAPK β -MKK7 induziert eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Fra1.

Mit je 1.5 μ g der Expressionsplasmide für SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD oder dem Leervektor pcDNA3 transient transfizierte und für 24 h unter nahezu serumfreien (0.05%) Kulturbedingungen aufgezogene $2 \cdot 10^5$ NIH 3T3 Fibroblasten wurden in Laemmli-Puffer lysiert und die Expression von Fra1 in einem Western-Blot überprüft. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Stripping-Puffer behandelt und anschließend neu mit einem anti-Cdk4 Antikörper inkubiert. Expression der transfizierten Plasmide wurde mit einem anti-Myc Antikörper nachgewiesen.



5.16 SAPK β -MKK7 und seine Rolle bei der Stress-vermittelten Induktion von Apoptose

Ein Charakteristikum vieler Onkogene ist nicht nur die Vermittlung von Signalen, die zur unkontrollierten Proliferation der Zelle führen. Gleichzeitig sind sie auch in der Lage, gezielt das Überleben dieser entarteten Zelle zu unterstützen (Cleveland et al. 1994; Trosko and Ruch 1998; Davis 2000). Letzteres geschieht entweder über das Abschalten von Apoptose-induzierenden Signalwegen und/oder durch die Aktivierung von Überlebenssignalkaskaden (Davis 2000). Die Funktion von SAPK/JNK Kinasen in der Stress-vermittelten Induktion von Apoptose-Prozessen wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.3.5 der Einleitung). Dies mag vor allem an der Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme liegen. Abhängig vom jeweiligen biologischen Kontext können SAPK/JNKs sowohl Apoptosesignale als auch Überlebenssignal übermitteln (Davis 2000). Bislang präsentierte Daten dieser Arbeit deuten auf ein schwach transformierendes Potential von SAPK/JNK Kinasen hin. Folglich lag es auf der Hand, auch den möglichen Einfluß von aktiviertem SAPK β auf das Überleben der transformierten Zellen zu analysieren. Um diese Hypothese auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, wurden anfänglich von SAPK β -MKK7 exprimierenden Zellen der induzierbaren Zelllinie (Klon 3) die Überlebensraten mit FACS-Untersuchungen verifiziert. Ein charakteristisches Merkmal apoptotischer Zellen ist die fortschreitende Degradation ihrer genomischen DNA (Bursch et al. 1985). Wird der DNA-Gehalt einer Zelle durch Anfärben mit Propidiumiodid (PI) und nachfolgender FACS-Analyse bestimmt, so zeigen apoptotische Zellen ein charakteristisches Sub-G1 Maximum (*peak*). Als Ergebnis konnte zunächst einmal festgehalten werden, dass die Expression von SAPK β -MKK7 in NIH 3T3 Zellen keine Apoptose zu induzieren vermochte (Daten nicht dargestellt). Um daher zu determinieren, ob das aktivierte Fusionsprotein gezielt Überlebenssignalwege stimuliert, wurden die Zellen der induzierbaren Zelllinie zusätzlich mit Apoptose-auslösenden Reizen behandelt. Stimulierung der Zellen mit ActinomycinD, Arsenit, Coffein, Cycloheximid, Dexamethason, Doxorubicin, Staurosporin, TNF- α und UV-C Bestrahlung führten jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen zu keinen Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollpopulation (+ Tet) (Ergebnisse nicht abgebildet). HEK 293 Zellen können aufgrund der verwendeten spezifischen Transfektionsmethode mit mehr DNA transfiziert werden, als dies vergleichsweise bei NIH 3T3 Zellen der Fall ist. Deshalb wurden zusätzlich HEK 293 Zellen transient mit SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD oder dem Leervektor transfiziert, um die exprimierenden Proteinmengen an SAPK β -MKK7 zu erhöhen. Verwendung der oben

genannten Apoptose-Stimuli führte jedoch auch in diesem Fall zu keinen auffällig veränderten Werten (sämtliche Daten hier nicht dargestellt).

Für weitere Experimente wurde daher auf eine für Apoptose-Studien gebräuchliche Zelllinie zurückgegriffen. Bei dieser 32D Zelllinie handelt es sich um eine aus der Maus stammende IL-3-abhängige immortalisierte promyeloische Suspensionslinie, die nach Entzug von IL-3 nicht nur mit einem Arrest der Zellen in der G1-Phase reagiert, sondern auch einen Apoptosetod von ca. 80% der Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden zeigt (Palaszynski and Ihle 1984). 32D-Zellen wurden mit retroviralen Überständen infiziert, um so stabil exprimierende Zellpools für SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD und den Leervektor pBabe Puro etablieren zu können. In ersten Vortests wurden die Überlebensraten nach IL-3 Entzug für alle drei Zellpools mit Hilfe von Trypan-Blau Zählungen bestimmt (Abb. 33A). Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Effekt, dass in toten bzw. absterbenden Zellen die Zellmembran mehr und mehr ihre Barrierefunktion verliert und der Farbstoff Trypan Blau somit ungehindert in die Zelle eindringen kann. Unter dem Lichtmikroskop betrachtet, erscheinen diese Zellen blau. Lebende Zellen bleiben dagegen ungefärbt. Interessanterweise induzierte, wie in Abb. 33A ersichtlich, die Expression von SAPK β -MKK7 ein schnelleres Absterben der Zellen nach IL-3 Entzug, als dies für die Vektorkontrollpopulation registriert werden konnte. Teilweise betrug die Differenz bis zu 17% (vgl. Abb. 33A 23-Stunden Wert). Die Überlebensrate für SAPK β -MKK7 KD exprimierende 32D-Zellen bewegte sich nahezu auf dem selben Niveau wie die der aktivierten Form. Folglich spielt vermutlich für die Apoptose-fördernde Eigenschaft von SAPK β -MKK7 nicht seine Aktivität die entscheidende Rolle, sondern reicht bereits ein inaktives Fusionsprotein aus, um beispielsweise die benötigten Interaktionspartner zu rekrutieren. Betrachtet man die in Abb. 33B dargestellte Expressionsanalyse der drei 32D Zelllinien, so fällt auf, dass SAPK β -MKK7 KD in geringeren Mengen exprimiert wird. Es wäre daher möglich, dass gleiche Expressionslevel beider Fusionsproteine identische Apoptoseraten in den Zellen induzieren könnten.

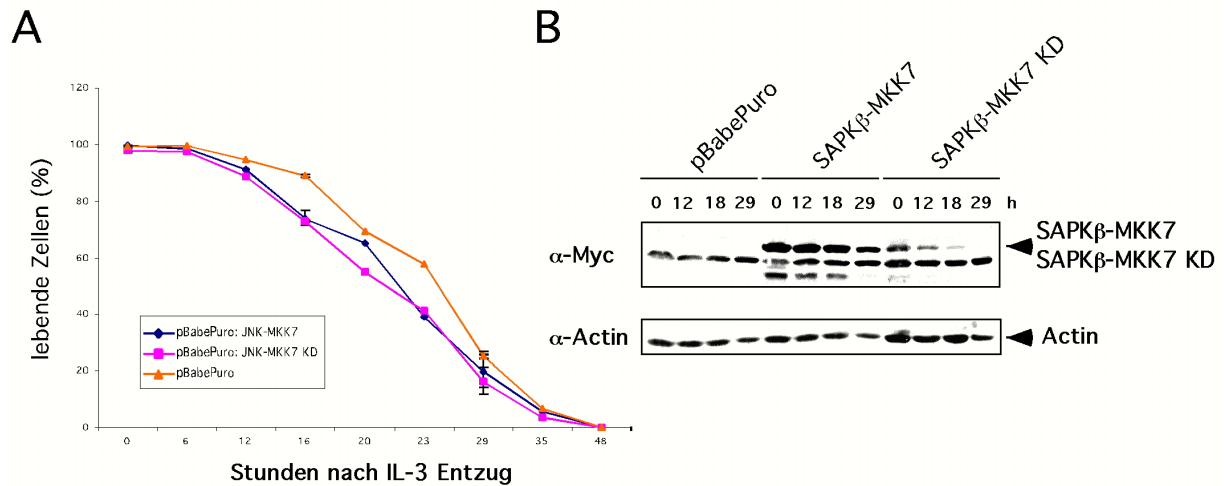


Abb. 33: SAPKβ-MKK7 und SAPKβ-MKK7 KD führen nach Entzug von IL-3 aus dem Medium von 32D-Zellen zu erhöhten Apoptoseraten.

32D-Zellen, die SAPKβ-MKK7, SAPKβ-MKK7 KD oder den Leervektor pBabe Puro stabil exprimieren, wurden dreimal in IL-3 freiem Medium gewaschen und in dreifachen Ansätze jeweils $0.5 \cdot 10^6$ Zellen auf Wells einer 24-Lochplatte ausgesät. A) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellproben entnommen, mit Trypan Blau gefärbt und anschließend die Gesamtzellzahl sowie die Zahl der markierten Zellen unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Aus den jeweils drei Ansätzen wurde der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung ermittelt. B) Parallel wurden Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten in Laemmli-Puffer lysiert und die Expression von SAPKβ-MKK7 und SAPKβ-MKK7 KD mit einem anti-Myc Antikörper überprüft. Die Verwendung eines anti-Actin Antikörpers diente als Ladekontrolle.

Um die aus den Trypan Blau Zählungen gewonnenen Daten weiter zu untermauern, wurde das Experiment wiederholt, wobei die Überlebensraten diesmal jedoch mit Propidiumjodid (PI) Färbungen in Kombination mit einer anschließenden FACS Analyse bestimmt wurden. Da die in FACS Experimenten als apoptotisch identifizierten Zellen, im Western-Blots die für Apoptose charakteristische Aktivierung von Caspasen, Freisetzung von Cytochrom c zeigen oder bei Bestimmung ihres äußeren Mitochondrienmembranpotentials unterhalb des normalen gemessenen Bereiches liegen (Le Mellay et al., eingereicht), stellen FACS Messungen eine geeignete Methode dar, die Anzahl an apoptotischen Zellen innerhalb einer Population zu quantifizieren. Auf unsere stabilen 32D Zelllinien angewendet, zeigten sich mit den Trypan Blau Färbungen nahezu vergleichbare Ergebnissen. SAPKβ-MKK7 exprimierende Zellen sterben wiederum am schnellsten, während Leervektor infizierte 32D Zellen, nach IL-3 Entzug aus dem Medium, deutlich länger zu überleben vermochten (Abb. 34).

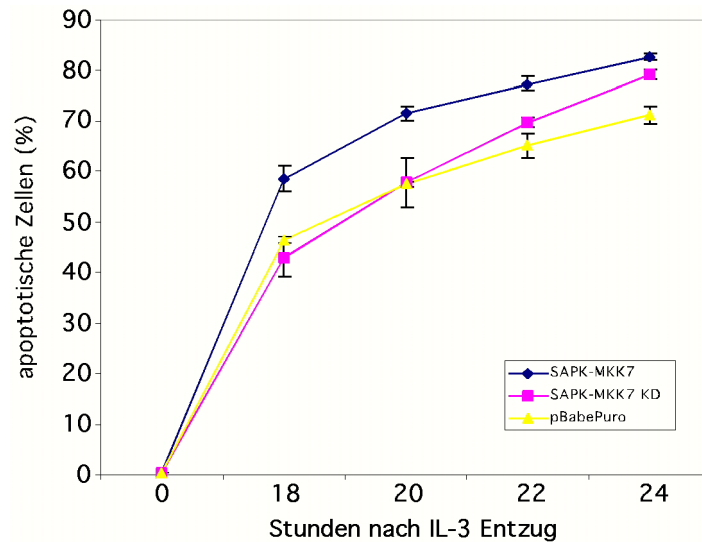


Abb. 34: SAPK β -MKK7 exprimierende 32D-Zellen zeigen erhöhte Apoptoseraten nach Entzug von IL-3.

32D-Zellen, die SAPK β -MKK7, SAPK β -MKK7 KD oder den Leervektor pBabe Puro stabil exprimieren, wurden dreimal in IL-3 freiem Medium gewaschen und in dreifachen Ansätze jeweils $0.5 \cdot 10^6$ Zellen auf Wells einer 24-Lochplatte ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellproben entnommen, fixiert, mit PI gefärbt und die Zahl der apoptotischen Zellen mit Hilfe von FACS Messungen bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem 'Cell Quest' Programm. Aus den jeweils drei Ansätzen wurde der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung berechnet.

6. DISKUSSION UND AUSBLICK

6.1 SAPK β -MKK7 stellt eine spezifische und konstitutiv-aktive MAP Kinase dar

SAPK/JNKs repräsentieren eine Untergruppe aus der Familie MAP Kinasen, die in Reaktion auf diverse extrazelluläre Stimuli die Genexpression regulieren können. Deletionsanalysen (*knockouts*) belegten eine Notwendigkeit des SAPK/JNK Signalweges bei der embryonalen Entwicklung, in der Immunantwort, dem Überleben bzw. induzierten Sterben (Apoptose) von Zellen und ihrer Differenzierung (Einleitung 2.3.3.1). Über die exakte Wirkungsweise von SAPK/JNKs bei der zellulären Transformation ist vergleichsweise nur sehr wenig bekannt, da aktivierte Mutanten von SAPK/JNKs in der Vergangenheit nicht zur Verfügung standen. Für die Abschätzung des Transformationspotential einer Kinase sind sie jedoch unabdingbar. Aus diesem Anlaß wurde im Rahmen der Doktorarbeit durch die direkte Fusion von SAPK β mit seinem spezifischen Aktivator MKK7 ein Fusionsprotein SAPK β -MKK7 generiert. Die biochemische Charakterisierung ergab hierbei, dass es sich dabei um eine funktionelle und konstitutiv aktivierte Form der MAP Kinase SAPK β handelte. Die Verwendung eines phospho-spezifischen JNK Antikörpers demonstrierte, dass in SAPK β -MKK7 sowohl Thr-183 als auch Tyr-185 innerhalb der Aktivierungsschleife phosphoryliert vorlagen (Kapitel 5.2). Zusätzlich besaß das Fusionsprotein signifikante c-Jun Kinaseaktivität (Kapitel 5.3) und zeigte die Fähigkeit, die transkriptionelle Aktivität von c-Jun und ATF-2 stimulieren zu können (Kapitel 5.4). Auch das intrazelluläre Lokalisationsverhalten von SAPK β -MKK7 entsprach dem von aktivierten endogenen SAPK/JNK Kinasen (Kapitel 5.6). Vorteilhaft für die spätere Analyse von physiologischen Funktionen, bei denen SAPK/JNKs eine Rolle spielen, wirkte sich die Tatsache aus, dass SAPK β -MKK7 sehr spezifisch agierte. Einflüsse auf die MAP Kinasen ERK1/2, p38 oder ERK5/BMK1 konnten nicht beobachtet werden (Kapitel 5.5). Selbst eine Aktivierung endogener SAPK/JNK Kinasen ließ sich nicht nachweisen (Kapitel 5.2).

Parallel wurde eine inaktive Form des Fusionsproteins (SAPK β -MKK7 KD) kloniert. Hierfür mussten essentielle Lysinreste innerhalb der ATP Bindungsstellen von SAPK β und MKK7 gegen Alanin- bzw. Glutaminsäurereste ausgetauscht werden (Kapitel 5.1). Interessanterweise führte sowohl die transiente als auch die stabile Expression von SAPK β -MKK7 KD in den unterschiedlichsten Zelllinien zu deutlich geringeren Proteinmengen, verglichen mit SAPK β -MKK7. Um die Ursache für diese Beobachtung aufzuklären, bedarf es weiterer Experimente.

Da jedoch Qualitätsunterschiede zwischen den DNAs ausgeschlossen werden können, wäre es denkbar, dass die Expression von SAPK β -MKK7 Überlebenssignalwege der Zelle inhibiert und es dadurch zu einem vermehrten Sterben kommt. Erste Analysen, in denen der Einfluß von SAPK β -MKK7 und seiner inaktiven Form auf das Überleben von exprimierenden Zellen überprüft wurden, konnten diese Theorie jedoch nicht bestätigen (Kapitel 5.17).

Ungeklärt bleibt bislang auch der exakte Mechanismus, dem die SAPK β Aktivierung durch MKK7 im Fusionsprotein zu Grunde liegt. Die Aktivierung ist jedoch nicht das Resultat der Fusion *per se*, da sowohl funktionelles SAPK β als auch MKK7 benötigt werden (Daten nicht dargestellt). Obwohl MKK7 nur basale Aktivität besaß, musste diese ausreichend gewesen sein, um SAPK β innerhalb des Fusionsproteins zu aktivieren. Transiente Kotransfektion von MKK7 und SAPK β -MKK7 verursachte eine Phosphorylierung von MKK7 durch aktiviertes SAPK β (Western-Blot Daten; nicht dargestellt). Folglich wäre es denkbar, dass in einer Art Rückkopplungsschleife beide Kinasen sich gegenseitig aktivieren. Die Existenz solcher Rückkopplungsschleifen konnte bereits für zwei andere Komponenten des SAPK/JNK Signalweges nachgewiesen werden. So phosphoryliert aktiviertes SAPK/JNK MEKK1 (Xu and Cobb 1997) und MLK2 (Phelan et al. 2001), wobei jedoch bislang nicht bekannt ist, ob diese Phosphorylierung einen Effekt auf die Aktivität der beiden Kinasen ausübt. Dieser Mechanismus hätte hierbei den Vorteil, dass die Aktivitäten von Phosphatasen keinen Einfluß auf den Nettosphosphorylierungsstatus von SAPK β -MKK7 haben können.

6.2 SAPK β -MKK7 zeigt bevorzugt eine nukleäre Lokalisation

Wie bereits eingangs erwähnt, konnte überexprimiertes aktiviertes SAPK β -MKK7 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden, wobei eine eindeutige Präferenz für den Nukleus bestand (Kapitel 5.6). Die Lokalisation des inaktiven Fusionsprotein hingegen blieb ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkt (Kapitel 5.6). Überexprimiertes MKK7 (aktiv oder inaktiv) ist jedoch gleichmäßig auf beide Zellkompartimente verteilt (Zheng et al. 1999; Wolter et al. 2002). Folglich dominierte das Lokalisationsverhalten von SAPK β über das von MKK7 und erst die Phosphorylierung bzw. Aktivität lieferte das essentielle Initiationssignal für die Translokation von aktiviertem SAPK β in den Zellkern. Die alleinige Fusion war hierfür nicht ausreichend. Translokation von konstitutiv-aktivem SAPK β -MKK7 konnte durch die Koexpression von JIP-1 inhibiert werden (Kapitel 5.13). Bei JIP-1 handelt

es sich um ein zytoplasmatisches Brückenprotein, das mehrere Komponenten der SAPK/JNK Kaskade zu binden vermag (Dickens et al. 1997) (siehe auch Einleitung 2.4). Es wird ubiquitinär exprimiert, vor allem jedoch in neuronalen Zellen des Gehirns sowie, in Niere, Lunge und Testis (Dickens et al. 1997). Über den Mechanismus der Komplexbildung und seine Regulation ist bislang wenig publiziert. Als gesichert gilt, dass SAPK/JNKs unabhängig von allen anderen am Komplex beteiligten Kinasen mit JIP-1 interagieren können (Whitmarsh et al. 1998). JIP Proteine agieren als Homo- und Heterodimere und stellen Phosphoproteine dar, die durch ihre bindende MAP Kinase (SAPK/JNK) phosphoryliert werden können (Whitmarsh and Davis 1998). Die Signifikanz dieser Beobachtungen für die Komplexbildung ist ebenfalls noch nicht geklärt. Auch aktiviertes SAPK β war in der Lage JIP-1 zu phosphorylieren (Kapitel 5.13). Bei Ste5p handelt es sich um ein Brückenprotein des Pheromonsignalweges in *S. cerevisiae* (Elion 2001). Es wird durch seine MAP Kinase Fus3p sowie durch weitere Kinasen phosphoryliert (Elion 2001). Die Bedeutung der Phosphorylierung für den Ste5p-vermittelten Signaltransduktion ist völlig unverständlich. Eventuell könnte sie zu einer Destabilisierung des Komplexes führen und somit als negative Rückkopplungsschleife fungieren (Whitmarsh and Davis 1998). Vielleicht spielt auch die Fähigkeit von aktivierten SAPK/JNKs die eigenen Kaskadenkomponenten phosphorylieren zu können (Kapitel 6.1) bei der Komplexauflösung eine Rolle. Da SAPK β -MKK7 durch die Koexpression mit JIP-1 im Zytoplasma zurückgehalten wurde, dürfte die Phosphorylierung von SAPK β nicht das Signal für JIP-1 darstellen, den Komplex aufzulösen. JIP-1 bleibt scheinbar weiterhin gebunden und maskiert somit evtl. essentielle Sequenzen, die für den nukleären Transportmechanismus von SAPK/JNKs benötigt werden. Letzteres müsste allerdings erst noch durch zusätzliche *in situ* Kollokalisationsstudien oder Koimmunopräzipitationsexperimente intensiver untersucht werden. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein 21 Aminosäuren großes Peptid von JIP-1 (Aminosäuren 143-163) die Aktivität von SAPK/JNKs *in vitro* inhibieren konnte (Barr et al. 2002). Koexpression von SAPK β -MKK7 mit JIP-1 oder der isolierten JBD (JNK-bindende Domäne) von JIP-1 führten ebenfalls zu einer klaren Reduktion der Aktivität von SAPK β -MKK7 (Kapitel 5.13). Somit wäre auch denkbar, dass die Translokation von SAPK β -MKK7 nicht stattfinden konnte, da die Überexpression von JIP-1 eine Inaktivierung des Fusionsproteins verursachte. Folglich würde JIP-1 neben seiner Funktion als Brückenprotein innerhalb des SAPK/JNK Signalweges auch als negativer Regulator von aktivierten zytoplasmatischen SAPK/JNKs fungieren können. Eine effiziente Aktivierung von SAPK/JNK Kinasen erfolgt, wenn die einzelnen Komponenten dieses Signalweges in einem ausgewogenen Verhältnis innerhalb

einer Zelle exprimiert werden und mit JIP-1 einen Multienzymkomplex ausbilden. Existiert jedoch ein zytoplasmatischer Überschuss an aktivierten SAPK/JNKs in der Zelle, so bindet JIP-1 unabhängig von allen anderen Komponenten an SAPK/JNK Proteine und sorgt für ihre Inaktivierung. Vielleicht spielt die Phosphorylierung von JIP-1 durch seine aktivierte MAP Kinase für die Initiation dieses Prozesses eine essentielle Rolle. Bei dieser Modellvorstellung bleibt jedoch unklar, wie JIP-1 diesen regulatorischen Effekt bewirkt. Es ist anzunehmen, dass JIP-1, da es keine Phosphataseaktivität besitzt, zur Rekrutierung der für die Inaktivierung benötigten Proteine beiträgt. Diese bislang nicht identifizierten Proteine müssten allerdings permanent am Fusionsprotein SAPK β -MKK7 gebunden bleiben, da dieses ansonsten sofort wieder seinen aktivierten Status erlangen würde. Da SAPK/JNKs mit wesentlich größerer Affinität an JIP-1, als beispielsweise an die Transkriptionsfaktoren c-Jun oder ATF-2, binden können (Dickens et al. 1997), führt die Interaktion mit JIP-1 somit letztendlich zu einer sehr effizienten Inaktivierung der SAPK/JNK Kinasen. Um die Richtigkeit dieser Theorie zu verifizieren, sind zusätzliche Studien, die die Situation für endogene Proteine betrachten, unabdingbar. Bisherige Analysen basieren auf Zelltransfektionen, in denen JIP, MLK3 und JNK koexprimiert wurden (Whitmarsh et al. 1998; Yasuda et al. 1999; Kelkar et al. 2000). Der Aktivierungsstatus von JNK innerhalb des JIP Komplexes wurde dabei jedoch nicht untersucht (Nihalani et al. 2001).

6.3 Aktiviertes SAPK β besitzt ein sehr schwaches Potential NIH 3T3 Zellen zu transformieren

MAP Kinase Kaskaden spielen in Prozessen, die zur zellulären Transformation führen eine wichtige Rolle (siehe Einleitung 2.2, 2.3.1 und 2.3.3.4). Sie agieren hierbei als Effektoren unterhalb von Mitgliedern der Familie der kleinen GTPasen Ras und Rho. Eine essentielle Beteiligung der klassischen mitogenen Kaskade Ras-Raf-MEK-ERK an der Onkogenese ist bereits detailliert beschrieben worden. ERK Signalwege werden für die Transformation durch die meisten Onkogene benötigt (Troppmair et al. 1994; Lewis et al. 1998; Hartkamp et al. 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass konstitutiv-aktive ERK oder MEK Mutanten ausreichend sind, um einen transformierten Zellphänotypen zu etablieren (Cowley et al. 1994; Robinson et al. 1998). Die Verwendung diverser dominant-negativer Formen einzelner ERK Kaskadenmitglieder oder synthetischer MEK-Inhibitoren konnte die Transformation von Zellen unterbinden (Pearson et al. 2001). Zwar belegen Literaturdaten durchaus auch eine

funktionelle Rolle von SAPK/JNK Kinasen in der onkogenen Transformation (vgl. Einleitung 2.3.3.4), exakte Wirkungsmechanismen konnten allerdings bislang noch nicht entschlüsselt werden. Verwendung von dominant-negativen SAPK/JNK Mutanten blockierte die durch Onkogene wie *ras* (Xiao and Lang 2000), *met* (Rodrigues et al. 1997) oder *bcr-abl* (Raitano et al. 1995; Dickens et al. 1997) verursachte Transformation. Ein wichtiges Zielprotein von SAPK/JNKs bei diesen Vorgängen dürfte der Transkriptionsfaktor c-Jun darstellen. Experimente mit einer dominant-negativen Mutante von c-Jun hemmten ebenfalls die durch Onkogene induzierte Transformation (Binetruy et al. 1991; Smeal et al. 1992; Rapp et al. 1994; Dickens et al. 1997). Die Verwendung des SAPK β -MKK7 Fusionsproteins erlaubte erstmalig die direkte Analyse des Einflusses einer konstitutiv-aktiven SAPK/JNK Kinase auf die zelluläre Transformation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von verschiedenen Versuchsansätzen ein, im Vergleich zu Onkogenen wie *v-Raf*, schwach transformierendes Potential für aktiviertes SAPK β nachgewiesen. Bis zur Ausprägung eines morphologisch veränderten Phänotypen waren vier Tage der Expression von SAPK β -MKK7 innerhalb der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie nötig (Kapitel 5.10). Dagegen kann eine Hormon-induzierbare Form des onkogenen C-Rafs eine Veränderung der Zellmorphologie innerhalb von 24 Stunden induzieren (Kerkhoff and Rapp 1997), wobei zusätzlich das spindelförmige Erscheinungsbild der Zellen noch wesentlich stärker entwickelt ist, als dies bei SAPK β -MKK7 der Fall war. Obwohl sich beide Induktionssysteme nur schwerlich miteinander vergleichen lassen, denn nach Hormongabe erfolgt die Aktivierung von Raf innerhalb weniger Minuten in den Zellen (Kerkhoff and Rapp 1997), während sich im Tet-regulierten Zellsystem die Expression von aktiviertem SAPK β -MKK7 erst allmählich über Stunden aufbaut (Kapitel 5.7), bleibt dennoch eine deutliche Diskrepanz zwischen den transformierenden Fähigkeiten beider Kinasen bestehen. Ähnliche Aussagen lieferten auch Focus- und Soft-Agar-Experimente. Zwar führte die Expression von SAPK β -MKK7 zur Transformation der NIH 3T3 Zellen und zu einem verankerungsunabhängigen Wachstum der Zellen in Soft-Agar, doch im Vergleich zu *v-Raf*-transformierten Zellen waren diese Effekte wesentlich geringer ausgeprägt. So dauerte es ca. 2 Wochen, bis konfluente SAPK β -MKK7exprimierende Fibroblasten der induzierbaren Tet-off Zelllinie eine deutlich sichtbare Focusbildung erkennen ließen (Kapitel 5.10), im Gegensatz zu 7-9 Tagen bei potenten Onkogenen wie *raf* oder *ras* (Daten nicht dargestellt). Die Beobachtung deutet die Notwendigkeit von zusätzlichen zellulären Ereignissen an. Diese Hypothese wird auch durch das Ergebnis unterstützt, dass die transiente Transfektion von SAPK β -MKK7 keine Focus-Formation in NIH 3T3 Zellen induzieren konnte, da die exprimierenden Zellen im Verlauf des

Versuches von nicht-transfizierten Zellen überwachsen wurden. Folglich könnte die Initiation der Zelltransformation zusätzliche Signale erfordern, die nicht alleine über die SAPK/JNK Kaskade vermittelt werden können. Denkbar wäre dabei, dass die Überexpression von aktiviertem SAPK β -MKK7 sich nachteilig auf das Wachstum der Zellen auswirkte und sie daher im Vergleich zu nicht-exprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten nicht konkurrenzfähig waren. Stringentere Versuchsansätzen, unter denen Wildtyp NIH 3T3 Zellen nicht überleben konnten, wie etwa die Kultivierung unter permanenten Selektionsbedingungen oder die Analyse der Fähigkeit verankerungsunabhängig in Soft-Agar zu wachsen, führten zu positiven Resultaten für aktiviertes SAPK β (5.10). SAPK β -MKK7-exprimierende Kolonien, die aus Soft-Agar Experimenten isoliert wurden, sind etwa um den Faktor 10-12 kleiner als v-Raf-induzierte Kolonien, was auf ein verlangsamtes Wachstum dieser klonalen Zelllinien hinweist. Direkte Hinweise, dass auch die Expression von aktiviertem MKK7 die Transformation fördern kann, sind in der Literatur bislang noch nicht beschrieben worden. Die Ursache hierfür könnte evtl. in der Tatsache begründet sein, dass bislang klonierte konstitutiv-aktive MKK7 Mutanten nur als schwache Aktivatoren von SAPK/JNKs verifiziert wurden (Zheng et al. 1999). Daneben werden *MKK4* und evtl. auch *MKK7* als Tumorsuppressorgene innerhalb der SAPK/JNK Kaskade gehandelt (Teng et al. 1997; Su et al. 1998). Des Weiteren wurden Proteine, wie Evi-1 und GST π , identifiziert, die die Aktivität von SAPK/JNKs inhibieren und somit auch deren transformierendes Potential reduzieren können (Adler et al. 1999; Kurokawa et al. 2000).

Die Überexpression von MLK3, eine MAPKKK des SAPK/JNK Signalweges, resultiert in einem dem SAPK β -MKK7 sehr ähnlichen Phänotypen (Hartkamp et al. 1999) (Hartkamp: unveröffentlichte Daten). Auch MLK3 besitzt, im Vergleich zu klassischen Onkogenen wie *ras* oder *raf*, ein nur sehr schwach ausgeprägtes Potential, Fibroblastenzellen zu transformieren. MLK3 vermittelt jedoch neben der Aktivierung der SAPK/JNK Kaskade auch eine schwache Stimulation von MEK und ERK, die vermutlich benötigt werden, um den vollständig transformierten Phänotypen von NIH 3T3 Zellen zu erzielen (Hartkamp et al. 1999). Das Vermögen zwei verschiedene Signalwege zu aktivieren, erklärt somit vermutlich auch die im Vergleich zu SAPK β -MKK7 gesteigerte Fähigkeit von MLK3, die transkriptionelle Aktivierung von Promotoren mit AP-1 und Ets-1 Bindungsstellen zu stimulieren (Kapitel 5.4). Für zwei synthetische Inhibitoren PD098059 (Dudley et al. 1995) und UO126 (Favata et al. 1998) konnte gezeigt werden, dass sie Raf- und Ras-induzierte Transformation unterbinden (Hartkamp et al. 1999). Beide Inhibitoren können jedoch nur partiell die Morphologie von MLK3-transformierten NIH 3T3 Zellen revertieren

(Hartkamp et al. 1999). Dieses Ergebnis belegte abermals, dass durchaus auch die alleinige Aktivierung des SAPK/JNK Signalweges transformierend auf Zellen wirken kann, wobei allerdings für die Initiation dieses Prozesses weitere SAPK/JNK-unabhängige Signale benötigt werden. MLK3-transformierte Fibroblasten zeigen eine deutliche Reduktion der JunB Expression (Hartkamp et. al, in Vorbereitung). JunB gilt als negativer Regulator der Zellproliferation (Schorpp-Kistner et al. 1999) und fungiert daneben auch als Antagonist der transformierenden Aktivität von c-Jun (Schutte et al. 1989a). SAPK β -MKK7-transformierte NIH 3T3 Zellen besaßen nicht die Fähigkeit, die Expression von JunB zu drosseln (Daten nicht dargestellt). Folglich repräsentieren diese Resultate eine weitere Ursache für die geringe Fähigkeit von SAPK β -MKK7 Zellen zu transformieren. Kooperierende Onkogene weisen synergistische Effekte beim Prozess der Zelltransformation auf (Blasi et al. 1985; Rapp and Wrzos 1985). Da MLK3 zwar zusammen mit aktiviertem MEK (MEK1 LIDEMANE) bei der Zelltransformation kooperieren kann, MLK3 jedoch nicht die Aktivität von MEK1 LIDEMANE zu modulieren vermag (Hartkamp, unveröffentlicht), liefern auch diese Daten einen weiteren Hinweis, dass MLK3 einen ERK-unabhängigen Signalweg stimuliert, der für die Zelltransformation wichtig sein kann. Im Vergleich zur klassischen zytoplasmatischen Kaskade ist das transformierende Potential der SAPK/JNK Kaskade allerdings nur sehr schwach entwickelt und bedarf zusätzlicher Ereignisse innerhalb der Zellen, um seinen Effekt entfalten zu können. Versucht man eine mögliche Klassifizierung der Kinasen oder Signalproteine im Bezug auf ihr transformierendes Potential zu erstellen, so ergibt sich hierbei folgendes Bild: die Fähigkeit Zellen zu transformieren ist bei SAPK β -MKK7 eindeutig am geringsten entwickelt. MLK3, ein Aktivator von SAPK/JNKs auf Stufe der MKKKs, zeigt dagegen ein bereits deutlich erhöhtes Potential, was an seiner Fähigkeit liegt, im geringeren Maße auch Signale an die ERK Kaskade vermitteln zu können. Nochmals einige Stufen darüber können die klassischen Onkogene wie *raf* oder *ras* eingeordnet werden, die ihre Signale in zahlreiche, für die Onkogenese essentielle, Kaskaden (wie z.B. PI3K, PKB und NF- κ B gesteuerte Signalwege) einspeisen. In ihrer Größenordnung bewegt sich auch das Potential von aktiviertem Cot (Cot Δ C), welches sowohl die SAPK/JNK Kaskade als auch den ERK Signalweg effektiv zu stimulieren vermag (Hagemann et al. 1999).

6.4 Warum handelt es sich bei aktiviertem SAPK β lediglich um eine schwach transformierende Kinase?

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, handelt es sich bei SAPK β -MKK7 um eine Kinase, die nur über ein sehr geringes Potential verfügt, Zellen zu transformieren. Im Gegensatz dazu stehen die klassischen Onkogene wie *raf* oder *ras*. Durch ihre Fähigkeit an unterschiedlichen Signalwegen zu partizipieren, haben sie letztendlich die Möglichkeit alle Teilaspekte, die zur Onkogenese führen, zu regulieren (Farber 1984; 1997; Hanahan and Weinberg 2000; Jochum et al. 2001). Neben einer morphologischen Transformation der Zellen, induzieren sie zusätzlich auch deren deregulierte Proliferation sowie ihr gezieltes Überleben bzw. ihren Schutz vor Apoptosemechanismen der Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher analysiert werden, ob auch aktiviertes SAPK β in der Lage ist, diese zusätzlichen Aspekte der Onkogenese selbst zu vermitteln bzw. durch Kooperation mit weiteren Signalkaskaden diese Fähigkeit erlangt.

6.4.1 Die Expression von aktiviertem SAPK β induziert gesteigerte Proliferation von NIH 3T3 Fibroblasten

Ähnlich wie klassische Onkogene (Kerkhoff and Rapp 1997; Kerkhoff and Rapp 1998), resultierte die Expression von aktiviertem SAPK β in der induzierbaren NIH 3T3 Tet-off Zelllinie, in einem Anstieg der Proliferationsrate (Kapitel 5.16). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit einer 32D Zelllinie erzielt, die SAPK β -MKK7 stabil exprimierte. Verglichen mit Zellen der Vektorkontrolle bzw. Zellen, die die inaktive Form von SAPK β -MKK7 exprimierten, besaß diese deutlich gesteigerte Proliferationsraten, die selbst nach Herabsetzung der IL-3 Konzentrationen sich deutlich von den Kontrollzelllinien unterschied (J. Toppmair, persönliche Kommunikation). Die 32D Zellergebnisse stehen dabei in guter Übereinstimmung mit einer Publikation in der eine IL-3 abhängige BAF Zelllinie verwendet wurde (Smith et al. 1997). SAPK/JNK Aktivität wird bei der durch IL-3 vermittelten Zellproliferation benötigt (Smith et al. 1997). Weder die alleinige Stimulierung von Ras oder ERK2 ist hierbei ausreichend, um die Zellproliferation in Abwesenheit von IL-3 zu induzieren (Kinoshita et al. 1995; Perkins et al. 1996). Es wird daher vermutet, dass die SAPK/JNK Aktivierung einen potentiellen Effektorschritt darstellt, zu dem Ras- und weitere

Tyrosinkinase-abhängige Signalwege führen (Terada et al. 1997), um die Proliferation als Antwort auf Zytokingabe stimulieren zu können (Smith et al. 1997). Unsere Analysen, wie SAPK β -MKK7 in die Zellzyklusmaschinerie eingreifen kann, stehen allerdings noch ganz am Anfang. Als potentielle Substrate bzw. Interaktionspartner, die zusammen mit aktiviertem SAPK β an diesen Prozessen beteiligt sind, wurden bislang c-Jun, ATF-2 und Fra-1 identifiziert (Kapitel 5.4 und 5.16). Alle drei Transkriptionsfaktoren stellen Komponenten des AP-1 Komplexes dar (Angel and Karin 1991; Karin et al. 1997). Dieser kann aus Homo- oder Heterodimeren bestehen. Je nach Zusammensetzung können AP-1 Proteine gegensätzliche Funktionen in der Regulation der Zellproliferation ausüben (Shaulian and Karin 2001; van Dam and Castellazzi 2001). Obwohl Fra-1 durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird, spielt es bei der Zellzyklusprogression keine Rolle (Brusselbach et al. 1995; Schreiber et al. 2000) und kann daher in weiterführenden Studien vermutlich ausgeklammert werden. Weder *fra-1*^{-/-} Fibroblasten noch embryonale Stammzellen zeigen Proliferationsdefekte (Brusselbach et al. 1995; Schreiber et al. 2000). Im Gegensatz hierzu belegen einschlägige Literaturdaten eine essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors c-Jun bei der Zellproliferation (Shaulian and Karin 2001). c-Jun gilt als positiver Regulator der Proliferation. *c-jun* defiziente Fibroblasten weisen dramatische Proliferationsdefekte auf und stellen ihr Wachstum nach wenigen, stark verlangsamten Zellzyklen vorzeitig ein (Johnson et al. 1993). Der Verlust an *c-jun* führt zu einem Expressionsanstieg von p53 und seinem Zielprotein p21, wodurch der Eintritt der Zellen in die S-Phase ihres Zellzyklus verhindert wird (Schreiber et al. 1999). Daneben reguliert c-Jun auch die Expression von Cyclin D1, einem positiven Regulator des Zellzyklus (Wisdom et al. 1999). Nach Beheben von DNA Schäden ist c-Jun für den Wiedereintritt in den Zellzyklus verantwortlich und hebt den durch einen Checkpoint ausgelösten Arrest wieder auf (Shaulian et al. 2000). ATF-2 ist an der Regulation der c-Jun Expression beteiligt (Huguier et al. 1998), sowie an der Transaktivierung des Cyclin A Promotors (Desdouets et al. 1995). Cyclin A wird sowohl für den G1/S als auch für den G2/M Phasen Übergang benötigt (Sherr 1993). Nur wenige Literaturbeispiele demonstrieren den direkten Einfluß von SAPK/JNKs auf die Proliferation (Bost et al. 1997; Lallemand et al. 1998; Bost et al. 1999). Dennoch belegen auch Deletionsanalysen die Notwendigkeit von spezifischen SAPK/JNKs für die normale Proliferation von Mausembryofibroblasten (MEF). *jnk1*^{-/-} MEFs proliferieren langsamer und erreichen niedrigere Sättigungsdichten auf Petrischalen, als vergleichbare Wildtyp-Zellen (Tournier et al. 2000). Im Gegensatz dazu hat der Verlust von *jnk2* in MEFs einen äußerst geringen Effekt auf die Proliferation, während kombinierte *jnk1*^{-/-}*jnk2*^{-/-} MEFs deutlich langsamer proliferieren (Tournier et al. 2000). Dieses reduzierte

Proliferationspotential korreliert mit Daten von *c-jun* defizienten MEFs (Johnson et al. 1993; Schreiber et al. 1999) oder mit MEFs die eine c-Jun Mutante exprimieren, in der die SAPK/JNK Phosphorylierungsstellen eliminiert wurden (Behrens et al. 1999; Shaulian et al. 2000). SAPK β , welches für die Etablierung des Fusionsproteins verwendet wurde, bezeichnet eine aus der Ratte isolierte SAPK/JNK Kinase (Kyriakis et al. 1994). In Sequenzvergleichen auf Proteinebene zeigt sie die größten Homologien mit muriner und humaner JNK3 Kinase. Studien, die die spezifische Relevanz bzw. Funktion von SAPK β /JNK3 in der Proliferation belegen, existieren bislang nicht. Da das Vorkommen von JNK3 auf Gewebe des Gehirns, Herzens und Testis beschränkt ist (Kyriakis et al. 1994), würde dies eher gegen eine so essentielle Funktion wie die Kontrolle der Zellproliferation sprechen, die ja in allen Geweben erfolgen muss. Andererseits bestehen zwischen allen SAPK/JNKs große Homologien, so dass sie durchaus in der Lage sind, in *in vitro* Experimenten die Funktion einer anderen Kinase einzunehmen. Ob sie diese Tätigkeit auch *in vivo* ausüben können ist fraglich. Im Gegensatz zu eigenen Daten, schlagen eine Reihe von publizierten Studien auch einen negativen Einfluß der SAPK/JNK Kaskade vor. MKK7-vermittelte Signaltransduktion fungiert als negativer Regulator des Zellwachstums in einer Vielzahl von hämatopoetischen Zelllinien (Sasaki et al. 2001). Der Einsatz einer konstitutiv-aktiven MKK7 Mutante bei Microarray Experimenten deutet auf eine negative Regulation des *c-myc* Gens durch MKK7 hin (Wolter et al. 2002). Bei c-Myc handelt es sich um ein relevantes Protein bei Zellproliferations- und Transformationsprozessen (Facchini and Penn 1998; Noguchi et al. 1999). Die Bewertung dieser Resultate ist jedoch äußerst schwierig. Bislang gilt MKK7 als spezifischer Aktivator von SAPK/JNKs (Lu et al. 1997; Wu et al. 1997). Diese Exklusivität scheint nahezu einzigartig im Vergleich zu den anderen MAPK Signaltransduktionswegen zu sein (Wolter et al. 2002) und es dürfte vermutlich nur eine Frage der Zeit sein, bis weitere Substrate von MKK7 identifiziert werden. Daher können theoretisch SAPK/JNK-unabhängige Einflüsse von MKK7 nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Wie bereits erwähnt, stehen die Analysen des Einflusses von aktiviertem SAPK β -MKK7 auf die Zellproliferation noch im Anfangsstadium. Weiterführende Studien in denen beispielsweise verschiedene reversible Zellzyklusinhibitoren eingesetzt werden, könnten helfen, zu bestimmen, in welcher Phase des Zellzyklusses die Aktivität von SAPK β die Progression beschleunigt. Die Überexpression von c-Jun ist in der Lage Zellzyklusparameter über die Herabregulation von p53 und p21 zu verändern und trägt somit zu einer Zunahme der

Zellen in S, G2 und M Phase bei, während die Zahl an Zellen in der G1 Phase deutlich reduziert wird (Pfarr et al. 1994).

6.4.2 SAPK β -MKK7 ist nicht in der Lage, dass gezielte Überleben von transformierten Zellen zu stimulieren

Erste Proliferationsstudien belegten eine höhere Vermehrungsrate für SAPK β -MKK7 exprimierende Zellen und deuten somit, neben der morphologischen Transformation, ebenfalls Parallelen zu klassischen Onkogenen an. Worin liegt dann, das nur schwach ausgeprägte Potential von SAPK β -MKK7 Zellen zu transformieren, begründet? Eine teilweise Antwort hierauf, lieferten Experimente, in denen die Fähigkeit von aktiviertem SAPK β untersucht wurde, gezielt das Überleben von Zellen zu induzieren. Onkogene wie *ras* oder *raf* sind in der Lage das Überleben durch die Stimulierung von Überlebenssignalwegen und/oder durch die Inhibierung von Apoptose-einleitenden Signalkaskaden sicherzustellen (Cleveland et al. 1994; Wang et al. 1994; Erhardt et al. 1999). Im Gegensatz dazu vermittelte die Expression von SAPK β -MKK7 keinerlei Effekt auf die Überlebensrate von NIH 3T3 oder HEK293 Zellen (Kapitel 5.17). Anscheinend bleibt diese Funktion in den verwendeten Zelllinien somit der klassischen zytoplasmatischen Signalkaskade sowie PI3K-, PKB- oder NF- κ B-vermittelten Signalwegen vorbehalten. Das Unvermögen, gezielt das Überleben von transformierten Zellen sicherstellen zu können, führt wahrscheinlich zu einer drastischen Herabstufung des transformierenden Potentials von aktivierten SAPK/JNKs führt. In vielen Studien wird darauf hingewiesen, dass es sich bei der MKK7-JNK Signalkaskade in der Tat um keinen essentiellen, für die Induktion von apoptotischen Prozessen benötigten, Signaltransduktionsweg handelt (Davis 2000; Sasaki et al. 2001). Viele physiologische und pathologische Bedingungen, die zu einer SAPK/JNK Aktivierung führen, verursachen selbst in neuronalen Zellen keine Apoptose (Xu et al. 1997; Herdegen et al. 1998; Kenney and Kocsis 1998).

Die Tatsache, dass aktiviertes SAPK β keinerlei Effekt auf das Überleben von NIH 3T3 und HEK293 Zellen hatte, mag auf den ersten Blick verwunderlich klingen, wurde doch mit SAPK β (größte Homologien bestehen zu humaner bzw. muriner JNK3) eine Kinase verwendet, für die in der Literatur eindeutige Belege existieren, für eine Funktion bei der Stressinduzierten Apoptose (Yang et al. 1997; Behrens et al. 1999). Wie bereits erwähnt, wird JNK3 hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert (Martin et al. 1996). Unterschiedliche

SAPK/JNK Isoformen besitzen verschiedene Substrataffinitäten und sind folglich oft an getrennten biologischen Funktionen beteiligt (Gupta et al. 1996). Der Effekt von aktivierten SAPK/JNKs hängt zusätzlich auch vom zellulären Kontext, der Art und Dauer des verwendeten Stimulus und der simultanen Aktivierung weiterer Signalwege ab. Die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Zielgenen legt fest, ob eine Zelle überlebt oder Selbstmord begeht (Shaulian and Karin 2002).

NIH 3T3 Fibroblasten und HEK293 Zellen stellen beides Zellsysteme dar, in denen endogenes SAPK β /JNK3 kaum exprimiert werden dürfte. Das bedeutet, dass auch Interaktionspartner, Substrate und regulierende Proteine, die bei der Tätigkeit von SAPK β /JNK3 benötigt werden, in nichtphysiologischen Mengen vorliegen können. Erst vor kurzem wurde in einer Studie gezeigt, dass JNK2 die Phosphorylierung von JNK1 negativ regulieren kann (Hochedlinger et al. 2002). Es wäre daher nicht völlig auszuschließen, dass ubiquitinär exprimiertes JNK1 und/oder JNK2 einen vergleichbaren Effekt auf SAPK β /JNK3 ausüben könnte und dessen Aktivität unter einen spezifischen Schwellenwert sinkt, der für die Stimulation der Apoptose benötigt wird. Durch den Einsatz eines induzierbaren *c-jun-ER* Fusionsgens konnte zweifelsfrei die Induktion von Apoptosesignalwegen durch aktiviertes c-Jun nachgewiesen werden (Bossy-Wetzel et al. 1997). Dieser Effekt war jedoch wesentlich höher, wenn man die Zellen statt in ausreichenden Serumkonzentrationen lediglich unter Niedrigserumbedingungen kultivierte (Bossy-Wetzel et al. 1997). Vermutlich enthält Serum Faktoren, die entweder die c-Jun-stimulierte Apoptose vermindern oder evtl. sogar vollständig unterbinden können. Zytokine wie z.B. EGF oder IGFI/II (*insulin-like growth factor I/II*) sind in der Lage, die Viabilität Serum-gehungerter Fibroblasten, die aktiviertes c-Jun exprimieren, zu erhöhen (Bossy-Wetzel et al. 1997). Da eigene Experimente immer unter ausreichenden Serumkonzentrationen durchgeführt wurden, könnte der c-Jun Effekt zu gering gewesen sein, um letztendlich Apoptose zu induzieren.

Zwar konnte durch den Einsatz einer IL3-abhängigen 32D Zelllinie gezeigt werden, dass SAPK β -MKK7 statt das Überleben der Zellen zu fördern, genau das Gegenteil, also den Tod der Zellen durch Apoptose induzierte (Kapitel 5.17). Interessanterweise scheint jedoch die Kinasefunktion von SAPK β -MKK7 keine essentielle Rolle bei diesem Effekt zu spielen, da ähnliche Resultate auch mit der inaktiven Form des Fusionsproteins erhalten wurden (Kapitel 5.17). Folglich müsste die Apoptosestimulation von SAPK β vermutlich durch die Interaktion mit unbekanntem Zielprotein/en ausgelöst werden, während für eine Phosphorylierung von c-Jun keine Notwendigkeit besteht. c-Jun Phosphorylierung gilt jedoch als sicherer Indikator von

Stressinduzierter

Apoptose

(Brenner et al. 1989; Devary et al. 1991; Manome et al. 1993). Wie korrelieren daher diese Befunde mit bisherigen Literaturdaten? Normalerweise ist davon auszugehen, dass die Haupttätigkeit einer Kinase wie SAPK/JNK in der Phosphorylierung seiner spezifischen Substrate liegt. Dennoch wurden auch durch SAPK/JNK hervorgerufene Effekte beschrieben, die aufgrund der alleinigen Bindung mit seinem Interaktionspartner ausgelöst werden können. Beispielsweise verursacht die Bindung von SAPK/JNK an p53 die Ubiquitinierung des letztgenannten (Fuchs et al. 1998a). Zahlreiche Analysen belegen eindeutig eine Funktion von JNK3 in der Stress-vermittelten Apoptose von neuronalen Zellen (Yang et al. 1997; Behrens et al. 1999). Allerdings basieren sie auf der Verwendung von *jnk3*^{-/-} defizienten Mäusen bzw. Mausembryofibroblasten. Dabei kann jedoch aufgrund der gewählten Versuchsbedingungen nicht differenziert werden, ob eine aktive JNK3 Kinase für die Apoptoseinduktion benötigt wird, oder bereits inaktives JNK3 ausreichend ist. Experimente in denen aktivierte JNK3 eingesetzt wurden, fehlen bislang gänzlich.

6.5 SAPK β -MKK7 und seine Funktion bei der Tumorbildung *in vivo*

Die Rolle der klassischen zytoplasmatischen Kaskade an der Tumorgenese *in vivo* ist gut dokumentiert (Einleitung 2.2), die Funktion des SAPK/JNK Signalweges ist dagegen kaum charakterisiert. Verschiedene Studien in der Vergangenheit belegen zwar die Beteiligung von SAPK/JNK an zellulären Transformationsprozessen (vgl. Einleitung 2.3.3.4), allerdings existieren nur wenige *in vivo* Analysen. Erst kürzlich konnte durch zwei Publikationen gezeigt werden, dass JNK2 zwar nicht die Initiation von TPA induzierten Hauttumoren in Mäusen fördern kann, dafür aber deren Wachstum und Progression deutlich unterstützt (Chen et al. 2001). Im Gegensatz hierzu supprimiert JNK1 die Entstehung von Hauttumoren (She et al. 2002). Diese Analysen basierten auf der Verwendung von *jnk* defizienten Tieren. Daneben existieren allerdings auch Daten, die andeuten, dass SAPK/JNKs zumindest nicht in allen Stadien der Tumorentwicklung *in vivo* benötigt werden. Cot-induzierte Tumorentwicklung erfolgte unabhängig von einer Aktivierung der SAPK/JNK Kinasen bzw. der daraus resultierenden Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor c-Jun (Matenia et al., eingereicht). Untersuchen, die die direkte Verbindung zwischen der Kinaseaktivität von SAPK/JNKs und einer Tumorentwicklung *in vivo* beweisen, konnten in der Vergangenheit aufgrund fehlender aktivierter Mutanten dieser MAP Kinase nicht durchgeführt werden. Mit der Etablierung von SAPK β -MKK7 wurde dieses Problem behoben. Die subkutane Injektion von NIH 3T3

Zellen, die SAPK β -MKK7 stabil exprimierten, induzierte nach 37 Tagen das Wachstum eines Tumors in einer Nacktmaus. Auch dieses Experiment bestätigte somit das bereits zuvor in *in vitro* Analysen beobachtete schwach transformierende Potential für aktiviertes SAPK β . Denn im Vergleich dazu entwickelte eine Kontroll-Nacktmaus, die mit v-Raf transformierten Fibroblastenzellen injiziert wurde, bereits nach 17 Tagen einen deutlich sichtbaren Tumor. Histologische Untersuchungen der beiden Tumoren ließen große Unterschiede erkennen (Kapitel 5.15), die evtl. auch auf unterschiedliche Mechanismen schließen lassen, Zellen zu transformieren. Auffällig war vor allem die starke Gefäßversorgung des durch SAPK β -MKK7-induzierten Tumors. Interessanterweise werden SAPK/JNK Kinasen in der Literatur durchaus mit diversen Angiopathien, z.B. Arteriosklerose, Ischämie, Veränderungen bei der Vaskularisation und Ausbildung von Herzfehlern, in Verbindung gebracht (Pombo et al. 1994; Morooka et al. 1995; Force et al. 1996; Wang et al. 1998b; Tibbles and Woodgett 1999; Garay et al. 2000). Detaillierte funktionelle Zusammenhänge sind dabei bislang noch kaum identifiziert. c-Jun und JunB, beides Substrate von SAPK/JNKs, verursachten in einem Fibrosarkoma-Zellkulturmodell verstärkte Angiogenese, indem sie die Expression des *Proliferin* Gens (*FL1*) aktivierten (Toft et al. 2001). Da die FL1 Expression mit dem Stadium der Fibrosarkomaentwicklung korreliert, schlagen diese Ergebnisse zusätzlich eine Rolle von c-Jun und JunB bei der Tumorprogression vor (Toft et al. 2001). Der Verlust von *MEKK3*^{-/-}, eine MAPKKK des SAPK/JNK Signalweges, verursacht embryonale Letalität aufgrund fehlender Angiogenese und kardiovaskulärer Entwicklung (Yang et al. 2000). Inwieweit diese Defekte alleine durch den Verlust von SAPK/JNK Signalen hervorgerufen werden, ist jedoch unklar (Davis 2000).

Aufgrund des beobachteten *in vitro* als auch *in vivo* Potentials von SAPK β -MKK7, NIH 3T3 Zellen transformieren zu können, entwickelte sich die Frage nach den möglichen Zielproteinen, die zusammen mit aktiviertem SAPK β an diesem Prozess beteiligt sind. H-Ras-induzierte Transformation von Mausfibroblasten benötigt die Expression von c-Jun (Johnson et al. 1996). c-Jun kooperiert mit H-Ras bei der Transformation von Rattenembryofibroblastenzellen (REF) (Schutte et al. 1989a; Schutte et al. 1989b), wobei die Expression von onkogenem H-Ras zur Aktivierung von ERK und SAPK/JNK führt und somit letztendlich zur verstärkten transkriptionellen Aktivität von Fos Proteine durch ERK und c-Jun Phosphorylierung durch SAPK/JNK führt (White et al. 1995). Diese Daten lassen eine wichtige Rolle des SAPK/JNK Signalweges und der damit gekoppelten Aktivierung von AP-1 Faktoren bei der zellulären Transformation vermuten. Ras und Raf benötigen c-Jun für die

Transformation (Rapp et al. 1994), sind aber beide nicht in der Lage SAPK/JNKs direkt zu aktivieren (Troppmair et al. 1998). Alleinige Überexpression von c-Jun transformiert Rat1a Fibroblasten (Schutte et al. 1989a), nicht jedoch NIH 3T3 Zellen. Folglich müssen noch zusätzliche Faktoren bei der SAPK/JNK-vermittelten Transformation involviert sein. Neben c-Jun als Mitglied der Jun Familie konnte auch für ein Mitglied der Fos Familie ein deutlicher Expressionsanstieg in SAPK β -MKK7 transformierten Zellen gemessen werden. Sowohl transiente Transfektionsstudien als auch Proteinanalysen der Tumorzelllinie wiesen deutliche Expressionsanstiege an Fra-1 auf (Kapitel 5.16 und Daten nicht abgebildet). In Fibroblasten ist Fra-1 die dominierende Komponente des AP-1 Komplexes, der durch aktiviertes Ras induziert wird (Mechta et al. 1997). In Kombination mit c-Jun ist Fra-1 in der Lage, NIH 3T3 Zellen zu transformieren (Mechta et al. 1997). Die transformierende Aktivität von Fra-1 (sowie Fra-2) ist jedoch im Vergleich zu anderen Fos Proteinen deutlich geringer. Überexpression von Fra-1 in Fibroblasten führt weder zur morphologischen Transformation noch zur Focus-Formation, obwohl es verankerungsunabhängiges Wachstum *in vitro* und die Tumorbildung *in vivo* in Nacktmäusen induzieren kann (Wisdon and Verma 1993; Bergers et al. 1995). Darüber hinaus fördert Fra-1 das invasive Wachstum von Tumorzellen (Kustikova et al. 1998). Eine direkte Phosphorylierung von Fra1 durch aktivierte SAPK/JNKs ist nicht publiziert worden. Stattdessen können Fra1/2 nach Stimulierung durch Wachstumsfaktoren direkt durch ERKs phosphoryliert werden, wodurch ihre Fähigkeit der DNA-Bindung mit c-Jun weiter erhöht wird (Gruda et al. 1994). Durch den Einsatz zweier synthetischer MEK Inhibitoren PD098059 und UO126 konnte die Überexpression von Fra-1 unterbunden werden (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen lässt, dass es sich um einen indirekt durch SAPK β -MKK7 induzierten Effekt handelte, der zusätzlich die Aktivierung des ERK Signalweges erforderte. Zusätzlich konnte die Verwendung des PD098059 Inhibitors (50 μ M, 24 h) eine teilweise Reversion des morphologischen Phänotyps induzieren (Daten nicht dargestellt). Obwohl durch transiente Transfektionsexperimente ein Einfluß von SAPK β -MKK7 auf die Aktivität endogener ERK Kinasen ausgeschlossen wurde (Kapitel 5.5), deutet dieses Ergebnis dennoch eine mögliche Kooperation der ERK und SAPK/JNK Signaltransduktionskaskade an. Eventuell ist diese Kooperation der beiden Signalwege für die Initiation der Tumorbildung notwendig. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde in den SAPK β -MKK7-induzierten Tumorzellen der Nacktmaus eine deutliche Überexpression von C-Raf detektiert (Kapitel 5.14). Folglich findet eine mögliche Kooperation auf Ebene von Raf statt. Erste Western-Blot Analysen lieferten Beweise, dass das überexprimierte C-Raf z.T. in phosphorylierter Form an Ser-338 in den Tumorzellen

vorlag (Kapitel 5.14). Phosphorylierung des Ser-338 von C-Raf wird durch Ras stimuliert (Diaz et al. 1997). Daneben konnte Pak als Regulator dieser C-Raf Phosphorylierungsstelle identifiziert werden (King et al. 1998). Somit handelt es sich bei Ser-338 um eine Aktivierungsstelle, die die Integration von Signalen verschiedener Signalwege erlaubt (Chong et al. 2001). Zusätzliche Kinase-Assays sollen helfen den Effekt von aktiviertem C-Raf auf die Kaskadenmitglieder MEK und ERK zu verifizieren. Bei ersten Western-Blot Analysen vermochte die beobachtete Überexpression von C-Raf nur eine schwachen MEK und ERK Phosphorylierung zu stimulieren, die aber ausreichte, um gleichzeitig die Expression von c-Jun deutlich zu steigern (Daten hier nicht dargestellt). In der Folge kann c-Jun von SAPK β -MKK7 aktiviert werden, wodurch gleichzeitig auch dessen Stabilität erhöht wird (Ip and Davis 1998). Die daraus resultierenden Folgen für die zelluläre Transformation wurden bereits diskutiert.

Einflüsse der klassischen zytoplasmatischen Kaskade auf den SAPK/JNK Signalweg sind in zahlreichen Publikationen beschrieben worden (Minden et al. 1994; McCarthy et al. 1995; Kerkhoff and Rapp 1998). Welche Indizien lassen sich jedoch für den umgekehrten Fall finden? Existieren Anzeichen für das Einfließen von SAPK/JNK Signalen in die ERK Kaskade? SAPK/JNKs tragen zur Stabilisierung der IL-2 (Chen et al. 2000) und IL-3 (Ming et al. 1998) mRNA in aktivierten T-Zellen bei. Allgemein wird die Genexpression sowohl auf transkriptioneller als auch post-transkriptioneller Ebene kontrolliert. Post-transkriptionelle Regulation der Genexpression beinhaltet bei eukaryontischen Zellen die Prozessierung (*processing*), Umsatzrate (*turnover*) und Translation von mRNA. Der SAPK/JNK Signalweg kontrolliert hierbei die Übernahme (Chen et al. 1998), Transkription und die Synthese der IL-2 mRNA (Su et al. 1994; Jacinto et al. 1998). Daneben tragen sie auch zur Stabilität der IL-2 (Chen et al. 2000) und IL-3 (Ming et al. 1998) mRNA bei. IL-2 wiederum induziert die Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von C-Raf in der T-Zelllinie CTLL-2 (Turner et al. 1991; Turner et al. 1993). Da eine physikalische Interaktion zwischen C-Raf und der p75 β Kette des IL-2 Rezeptors bereits beschrieben wurde (Maslinski et al. 1992), darf vermutet werden, dass es sich bei C-Raf um ein proximales Mitglied einer durch IL-2 regulierten Signaltransduktionskaskade handelt. IL-3 ist ebenfalls in der Lage, die Tyrosinphosphorylierung von C-Raf zu stimulieren (Carroll et al. 1990; Kanakura et al. 1991). Die Verwendung eines phospho-Tyrosin Antikörpers bzw. eines Antikörpers, der spezifisch gegen die phosphorylierte Form von Tyrosin an Position 341 der C-Raf Kinase gerichtet ist, könnte weitere Aufschlüsse vermitteln, ob C-Raf in aktivierter Form in der Tumorzelllinie vorliegt und dieser Effekt somit vermutlich indirekt auch durch die

SAPK/JNK Signalkaskade gesteuert wird. Tyr-341 stellt einen essentiellen Aminosäurerest dar, der für die Aktivierung von C-Raf benötigt und durch Src-Kinasen phosphoryliert wird (Fabian et al. 1993; Mason et al. 1999).

Bei hnRNP-K (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein K*), auch K-Protein genannt, handelt es sich um ein erst kürzlich identifiziertes SAPK/JNK Substrat, welches allerdings auch durch ERKs phosphoryliert werden kann (Habelhah et al. 2001). Es ist Mitglied einer Familie von RNA-bindenden Proteinen, die Komplexe mit RNA PolymeraseII Transkripten bilden können (Krecic and Swanson 1999; Nakielny and Dreyfuss 1999). Sie wirken an der RNA Transkription und Translation mit, und regulieren daneben das nukleäre-zytoplasmatische Translokieren (*shuttling*) von Proteinen und RNA (Bomsztyk et al. 1997). Der positive Effekt des K-Proteins auf die Transkription äußert sich auf vielfältige Weise (Habelhah et al. 2001): hnRNP-K beeinflusst beispielsweise die Transkription von *c-myc* und *SP1/3* (Du et al. 1998). Direkte Einflüsse des K-Proteins auf die Transkription von *c-raf* sind bislang nicht bekannt. Die Analyse der humanen *c-raf* Promoterregion führte jedoch zur Identifikation von heterogenen RNA Startsequenzen sowie vier potentiellen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1 und einem Bindungsmotiv für Transkriptionsfaktoren der Octamerfamilie (Beck et al. 1990), wodurch evtl. der Bogen zu hnRNP-K und SAPK/JNKs gespannt wäre.

Die Suche nach weiteren Proteinen, die in der SAPK β -MKK7-induzierten Tumorzelllinie, im Vergleich zu Kontrollzelllinien ein verändertes Expressionmuster aufwiesen, führt vor allem zur Identifizierung von Zellzyklus-relevanten Proteinen (Daten sind hier nicht dargestellt). Inwiefern diese Ergebnisse durch die Überexpression von C-Raf vermittelt werden, wurde noch nicht verifiziert. Zusätzliche Experimente sind dringend erforderlich, um mehr Details zu erhalten, die den Mechanismus erklären, wie ein komplexes Netzwerk aus Mitogen- (ERK) und Stressinduzierter (SAPK/JNK) Signalkaskade mit der Zellzyklusmaschinerie verknüpft ist und wie Mechanismen, die zur Deregulation dieser Prozesse führen, bei der neoplastischen Transformation kooperieren. Des Weiteren fehlen Studien, die analysieren, ob das Überleben SAPK β -MKK7 exprimierender Tumorzellen durch die Kooperation mit C-Raf gefördert werden kann. Insgesamt gesehen dürfen die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse nicht überbewertet werden, da sie momentan auf den Resultaten einer einzigen Nacktmaus basieren. Eine Studie mit einer größeren Anzahl an mit SAPK β -MKK7-exprimierenden NIH 3T3 Zellen injizierten Nacktmäusen wurde vor kurzem gestartet. Zusätzlich soll auch analysiert werden, ob aktiviertes SAPK β zur Metastasierung beitragen kann. Daneben sind

Nacktmausexperimente mit der inaktiven Form des Fusionsproteins (SAPK β -MKK7 KD) in Vorbereitung.

6.6 Konstitutiv-aktives SAPK β induziert die morphologische Transformation in NIH 3T3 Fibroblasten gekoppelt mit der Zerstörung des Zytoskeletts

Onkogene Transformation ist oftmals mit morphologischen Veränderungen des Zellphänotyps verknüpft, die durch Umbauten des Aktin-Zytoskeletts induziert werden (Zohn et al. 1998). Kleine GTPasen spielen hierbei eine bedeutende Rolle und aktivieren u. a. auch SAPK/JNKs: Mitglieder der Ras-Subfamilie regulieren vor allem die Proliferation und Differenzierung von Zellen, während Angehörige der Rho-Subfamilie (RhoA, -B, -C; Rac1 und 2; Cdc42) zunächst als Regulator des Aktin-Zytoskeletts identifiziert wurden, die allerdings ebenso die Genexpression und Proliferation beeinflussen können (Sahai et al. 2001). In eukaryontischen Zellen erfolgen durch sie definierte morphologische Veränderungen, die mit Umbauprozessen des Aktinzytoskeletts assoziiert sind: RhoA kontrolliert den Zusammenbau von Aktinstressfasern und fokale Adhäsionskomplexe (*focal adhesion complexes*) (Amano et al. 1997; Watanabe et al. 1999). Aktiviertes Rac reguliert die Akkumulation von Aktinfilamenten an der Plasmamembran sowie die Entwicklung von Lamellipodien und zellmembrannahen Aktinhäufungen (*membrane ruffles*), während Cdc42 die Formation von Filopodien (Mikroausstülpungen der Zellmembran) stimuliert (Ridley et al. 1992; Nobes and Hall 1995; Nobes and Hall 1999). Daten belegen, dass die transiente Expression von aktiviertem Ras, Rac oder RhoA zur Bildung von Stressfasern in Zellen führt (Joneson et al. 1996; Hall 1998; Sander and Collard 1999), während die anhaltende Aktivierung, z.B. in Ras-transformierenden Zellen, eine Inhibierung der Formation von Stressfasern induziert (Boettner and Van Aelst 1999). Ein möglicher Mechanismus, dem die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts zugrunde liegt, besteht in der anhaltenden ERK Aktivierung ausgelöst durch Raf- oder Ras-Signale. ERK fungiert als negativer Regulator der Aktivitäten der ROCK und LIM Kinase. Bei beiden handelt es sich um Rho Effektoren, die für die Aktin Stressfaserbildung nötig sind (Sahai et al. 2001). Parallel dazu werden durch onkogenes Raf Rac Aktivatoren inhibiert und somit die Rac vermittelte Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix verhindert (Kerkhoff et. al., in Druck). Interferenz mit der Rac Aktivierung kann die transkriptionelle Herabregulierung von Tiam1 beinhalten, bei dem es sich um einen Aktivator von Rac handelt (Zondag et al. 2000). Eine direkte Verbindung zwischen der

Aktinorganisation und SAPK/JNK Kinasen konnte in Säugerzellen bis zum heutigen Zeitpunkt nicht identifiziert werden.

Genetische Studien in *Drosophila melanogaster* belegten jedoch die Notwendigkeit von Komponenten des JNK-Signalweges, wie DRac, DMKK7 und DJNK (basket), bei der Regulation der Zellgestalt und Zellbewegung während des Prozesses des dorsalen Schließens (*dorsal closure*) von *Drosophila* Embryonen (Sluss et al. 1996; Keyse 2000). Mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens wurde kürzlich p150-Spir als neues zytoplasmatisches Substrat von DJNK ermittelt (Otto et al. 2000). p150-Spir gehört zur Familie der Wiscott-Aldrich Syndrom Proteine (WASP), die eine WH2 Domäne besitzen (*Wiscott-Aldrich Homology Domain2*) und an der Aktinreorganisation involviert sind (Bi and Zigmond 1999; Ramesh et al. 1999). Daten, die belegen, dass Spir über seinen modifizierten FYVE Zinkfinger (Stenmark et al. 1996) an intrazelluläre Membranstrukturen binden kann und an Vesikeltransportprozesse partizipiert, verknüpfen erstmals die Aktinorganisation mit intrazellulären Transportprozessen (Kerkhoff et al. 2001). N-terminale Sequenzen von Spire können mit GTPasen der Rho Familie interagieren (Wellington et al. 1999; Anmerkung der Autorin: in dieser Publikation wird Spir zusätzlich mit "e" geschrieben!). p150-Spir kolokalisiert mit dem F-Aktin von NIH 3T3 Fibroblasten und dient als Initiator der Aktinpolymerisation (Otto et al. 2000). Bislang konnte jedoch nicht analysiert werden, ob JNK als positiver bzw. negativer Regulator von p150-Spir fungiert. Bei Koexpression von aktiviertem SAPK β -MKK7 zusammen mit p150-Spir kolokalisieren beide Proteine in einem p150-Spir typischen Muster innerhalb des Zytoplasmas (Otto, unveröffentlicht), während in Abwesenheit von p150-Spir aktiviertes SAPK/JNK im Zellkern lokalisiert ist (Kapitel 5.6). Die Funktion des humanen oder murinen Spir-1 und Spir-2 (Homologe zu p150-Spir aus *Drosophila*) sind noch nicht identifiziert worden. Von DJNK ist bekannt, dass es noch weitere Komponenten des Zytoskeletts, die an dem Prozess des dorsalen Schließens von embryonalen *Drosophila* Fliegen beteiligt sind, direkt phosphoryliert und modifiziert: Zipper (nichtmuskuläres Myosin), Coracle (*Drosophila* Homolog des Vertebraten Band 4.1 Zytoskelettproteins), Inflated oder Myospheroid (beides Integrine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind). Daneben besteht für DJNK (sowie für SAPK/JNKs aus Säugerzellen) die Möglichkeit, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu regulieren, die am Vorgang des dorsalen Schließens beteiligt sind (Malliri et al. 1998).

Die Mikroinjektion von aktiviertem Rac und Cdc42 in Zellen induziert Veränderungen der Aktinstrukturen innerhalb weniger Minuten bevor eine *de novo* Proteinsynthese einsetzen kann (Davis 1993; Xia et al. 1995). Im Vergleich hierzu bewirkt Rho nur die Reorganisation bereits vorhandener Aktinfilamente (Ridley and Hall 1992; Mullins 2000). Die in dieser

Arbeit gewonnen Ergebnisse lassen für aktiviertes SAPK β eher das Gegenteil vermuten. Wird durch die Überexpression von JIP-1 aktiviertes SAPK β im Zytoplasma zurückgehalten, so könnte dieses die Zerstörung der Aktin Stressfasern verhindern. Folglich scheint die nukleäre Translokation von SAPK β -MKK7 für die Effekte auf das Zytoskelett unbedingt erforderlich zu sein. Allerdings konnte ein Einfluß auf die Aktivität von SAPK β -MKK7 durch JIP-1 nicht ausgeschlossen werden. Eigene Daten (Kapitel 5.13) sowie eine erst kürzlich erschienene Studie, in der ein künstlich hergestelltes Peptid, bestehend aus einer 21 Aminosäuren langen Sequenz der JNK-bindenden Domäne von JIP-1, verwendet wurde, zeigten die *in vivo* Inaktivierung von SAPK β -MKK7 (Kapitel 5.13) bzw. die *in vitro* Inaktivierung von SAPK/JNK Kinasen (Barr et al. 2002). Letzte Gewissheit kann folglich erst durch die Verwendung von Inhibitoren der Proteinsynthese, wie beispielsweise Cyclohexamid oder Actinomycin D, gewonnen werden.

6.7 Ausblick

Zusammenfassend belegen die hier präsentierten Daten die morphologische Transformation von NIH 3T3 Zellen als Folge der Expression von konstitutiv-aktivem SAPK β . Sein transformierendes Potential ist jedoch im Vergleich zu klassischen Onkogenen wie *ras* oder *raf* wesentlich geringer. Das liegt vermutlich daran, dass SAPK β -MKK7 nur einige Aspekte, die für die onkogene Transformation erforderlich wären, zu rekapitulieren vermag. Zwar wurde der Phänotyp des Zytoskelett der Zellen verändert und auch die Zellproliferation beschleunigt, positive Einflüsse, die das Überleben der transformierten Zellen unterstützen, konnten jedoch nicht registriert werden. Trotz der eingeschränkten *in vitro* SAPK β -MKK7-vermittelten Effekte, weisen auch erste Analysen *in vivo* auf ein Potential von SAPK/JNK Kinasen hin, die Tumorfornation zu steuern.

Um das vollständige Aktionsspektrum von SAPK/JNK Kinasen ermitteln zu können, ist es jedoch erforderlich, noch weitere aktivierte Fusionsproteine zu etablieren, die in ihrer Zusammensetzung in den verschiedenen SAPK/JNK Isoformen und MKK7 bzw. MKK4 Isoformen variieren. Nur so kann der Substratspezifität der einzelnen Kinasen berücksichtigt werden. Viele SAPK/JNK Isoformen benötigen für ihre vollständige Aktivierung die Phosphorylierung von MKK4 und MKK7 (Kyriakis and Avruch 2001). Es wäre daher zu überlegen, ob zusätzlich nicht auch Fusionsproteine generiert werden müssten, die am N- bzw. C-Terminus von SAPK/JNK jeweils MKK4 und MKK7 tragen. Die Etablierung einer

SAPK β -MKK7-exprimierenden NIH 3T3 Tet-off Zelllinie bietet sich nahezu für den Einsatz bei Microarray-Experimenten an. Hierdurch könnten Daten gewonnen werden, die die Funktion von SAPK/JNKs im komplexen genetischen Netzwerk noch eingehender beschreiben. Daneben besteht die Möglichkeit, relevante pathophysiologische Gene zu identifizieren, um in weiteren Schritten geeignete Therapien zu entwickeln, die helfen, die Aktivität dieser Proteinkinase gegebenenfalls zu modulieren. Neue Interaktionspartner von SAPK/JNKs könnten zwar auch mit Hilfe von Two-Hybrid Assays verifiziert werden, allerdings ist zu befürchten, dass SAPK/JNKs, ebenso wie weitere MAP Kinasen (p38 und ERK5; eigene Daten: nicht dargestellt), die Fähigkeit besitzen, die Aktivität des Reportergens zu stimulieren ohne hierfür ein Interaktionspartner gebunden zu haben. Zusätzlich könnte die SAPK/JNK-verursachte Ubiquitinierung von Bindungspartner ein Problem darstellen (siehe Einleitung Kapitel 2.3.3.2).

Die SAPK/JNK Signaltransduktionskaskade in *D. melanogaster* besitzt einen hohen Grad an Homologie zu den Vertebraten. Dies gilt sowohl für den hierarchischen Aufbau des Signalweges als auch für die DNA- und Proteinsequenzen der einzelnen Kaskadenkomponenten. Der hohe Grad an evolutionärer Konservierung läßt ähnliches für die Funktion vermuten und bietet an, *D. melanogaster* als Modell für genetische und molekularbiologische Studien der SAPK/JNK Kaskade heranzuziehen, um die zahlreichen, oft widersprüchlich erscheinenden, Effekte der Signalaktivierung zu analysieren, und um diese Ergebnisse anschließend auf die Situation in Vertebraten zu übertragen (Ip and Davis 1998). Die Fruchtfliege offeriert dabei den Vorteil eines gut charakterisierten Modellorganismus, in dem über zahlreiche etablierte Verfahren wie z.B. die Herstellung transgener Fliegen, Mutantanalysen oder genetische Screens die Beteiligung der Signalkaskade in bestimmten zellulären Entwicklungsprozessen untersucht werden kann. In Zusammenarbeit mit Prof. Raabe (MSZ) wurde daher versucht, eine transgene Fliege, die SAPK β -MKK7 exprimiert, zu etablieren. Ein erster Ansatz, in dem die injizierte DNA allein durch den Zufall bestimmt, im Genom integrieren konnte, verursachte den embryonalen Tod der Tiere (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Anlaß wurde SAPK β -MKK7 in einem zweiten Versuch gezielt in Zellen exprimiert, die für die Facettenaugenentwicklung benötigt werden und bei dem es sich um kein überlebenswichtiges Organ handelt. Hierbei besaßen adulte Fliegen, die SAPK β -MKK7 exprimierten, völlig deformierte Augen. Einige Tiere bildeten in den Augen Antennen aus oder trugen statt Augen normale Cuticula mit Borsten an diesem Bereich des Kopfes (Daten nicht dargestellt). Zusätzlich zu den transgenen Fliegen ist momentan auch die Etablierung einer Tetrazyklin-regulierbaren transgenen Maus in Arbeit.

7. LITERATUR

1997. *Cancer biology. Curr Opin Oncol* **9**: B23-39.
- 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.
- Adler, V., Z. Yin, S.Y. Fuchs, M. Benezra, L. Rosario, K.D. Tew, M.R. Pincus, M. Sardana, C.J. Henderson, C.R. Wolf, R.J. Davis, and Z. Ronai. 1999. *Regulation of JNK signaling by GSTp. Embo J* **18**: 1321-34.
- 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.
- Amano, M., K. Chihara, K. Kimura, Y. Fukata, N. Nakamura, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1997. *Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. Science* **275**: 1308-11.
- 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.
- Aoki, M., T. Akiyama, J. Miyoshi, and K. Toyoshima. 1991. *Identification and characterization of protein products of the cot oncogene with serine kinase activity. Oncogene* **6**: 1515-9.
- Asada, M., T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro, and S. Mizutani. 1999. *Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. Embo J* **18**: 1223-34.
- Auer, K.L., J. Contessa, S. Brenz-Verca, L. Pirola, S. Rusconi, G. Cooper, A. Abo, M.P. Wymann, R.J. Davis, M. Birrer, and P. Dent. 1998. *The Ras/Rac1/Cdc42/SEK/JNK/c-Jun cascade is a key pathway by which agonists stimulate DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes. Mol Biol Cell* **9**: 561-73.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. A., and Struhl, K. 1997. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Avruch, J. 1998. *Insulin signal transduction through protein kinase cascades. Mol Cell Biochem* **182**: 31-48.
- 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.
- Bakiri, L., D. Lallemand, E. Bossy-Wetzel, and M. Yaniv. 2000. *Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. Embo J* **19**: 2056-68.
- Baldassare, J.J., Y. Bi, and C.J. Bellone. 1999. *The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. J Immunol* **162**: 5367-73.
- Barr, R.K. and M.A. Bogoyevitch. 2001. *The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). Int J Biochem Cell Biol* **33**: 1047-63.
- Barr, R.K., T.S. Kendrick, and M.A. Bogoyevitch. 2002. *Identification of the Critical Features of a Small Peptide Inhibitor of JNK Activity. J Biol Chem* **277**: 10987-97.
- Beck, T.W., U. Brennscheidt, G. Sithanandam, J. Cleveland, and U.R. Rapp. 1990. *Molecular organization of the human Raf-1 promoter region. Mol Cell Biol* **10**: 3325-33.
- 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.

- Behrens, A., M. Sibilica, and E.F. Wagner. 1999. *Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation*. *Nat Genet* **21**: 326-9.
- Behrens, S. and M.R. Franz. 1996. *[In vivo registration of monophasic action potentials--new possible applications in clinical electrophysiology]*. *Z Kardiol* **85**: 326-33.
- Bennett, B.L., D.T. Sasaki, B.W. Murray, E.C. O'Leary, S.T. Sakata, W. Xu, J.C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S.S. Bhagwat, A.M. Manning, and D.W. Anderson. 2001. *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13681-6.
- Bergers, G., P. Graninger, S. Braselmann, C. Wrighton, and M. Busslinger. 1995. *Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron*. *Mol Cell Biol* **15**: 3748-58.
- Bi, E. and S.H. Zigmond. 1999. *Actin polymerization: Where the WASP stings*. *Curr Biol* **9**: R160-3.
- 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.
- Blackwood, E.M., L. Kretzner, and R.N. Eisenman. 1992. *Myc and Max function as a nucleoprotein complex*. *Curr Opin Genet Dev* **2**: 227-35.
- 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.
- Blenis, J. 1993. *Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5889-92.
- Bocco, J.L., A. Bahr, J. Goetz, C. Hauss, T. Kallunki, C. Keding, and B. Chatton. 1996. *In vivo association of ATFa with JNK/SAP kinase activities*. *Oncogene* **12**: 1971-80.
- 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.
- Bokemeyer, D., A. Sorokin, M. Yan, N.G. Ahn, D.J. Templeton, and M.J. Dunn. 1996. *Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts*. *J Biol Chem* **271**: 639-42.
- Bomszyk, K., I. Van Seuning, H. Suzuki, O. Denisenko, and J. Ostrowski. 1997. *Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein*. *FEBS Lett* **403**: 113-5.
- Bonny, C., P. Nicod, and G. Waeber. 1998. *IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells*. *J Biol Chem* **273**: 1843-6.
- Bonny, C., A. Oberson, S. Negri, C. Sauser, and D.F. Schorderet. 2000. *[Diabetes and genetics: significance of intracellular signaling pathways]*. *Rev Med Suisse Romande* **120**: 409-13.
- Bonny, C. 2001. *Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death*. *Diabetes* **50**: 77-82.
- 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.
- Bossy-Wetzell, E., L. Bakiri, and M. Yaniv. 1997. *Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun*. *Embo J* **16**: 1695-709.

- 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.
- Boulton, T.G., S.H. Nye, D.J. Robbins, N.Y. Ip, E. Radziejewska, S.D. Morgenbesser, R.A. DePinho, N. Panayotatos, M.H. Cobb, and G.D. Yancopoulos. 1991. *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. Cell* **65**: 663-75.
- 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.
- Brenner, D.A., M. O'Hara, P. Angel, M. Chojkier, and M. Karin. 1989. *Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. Nature* **337**: 661-3.
- 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.
- Brusselbach, S., U. Mohle-Steinlein, Z.Q. Wang, M. Schreiber, F.C. Lucibello, R. Muller, and E.F. Wagner. 1995. *Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. Oncogene* **10**: 79-86.
- Burbelo, P.D., S. Miyamoto, A. Utani, S. Brill, K.M. Yamada, A. Hall, and Y. Yamada. 1995. *p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. J Biol Chem* **270**: 30919-26.
- Bursch, W., H.S. Taper, B. Lauer, and R. Schulte-Hermann. 1985. *Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **50**: 153-66.
- 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. Arkinstall. 2000. *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. Faseb J* **14**: 6-16.
- Cano, E. and L.C. Mahadevan. 1995. *Parallel signal processing among mammalian MAPKs. Trends Biochem Sci* **20**: 117-22.
- Carroll, M.P., I. Clark-Lewis, U.R. Rapp, and W.S. May. 1990. *Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate rapid phosphorylation and activation of cytosolic c-raf. J Biol Chem* **265**: 19812-7.
- Chadee, D.N., T. Yuasa, and J.M. Kyriakis. 2002. *Direct activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase MEKK1 by the Ste20p homologue GCK and the adapter protein TRAF2. Mol Cell Biol* **22**: 737-49.
- Chang, L. and M. Karin. 2001. *Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature* **410**: 37-40.
- Chao, T.H., M. Hayashi, R.I. Tapping, Y. Kato, and J.D. Lee. 1999. *MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen- activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. J Biol Chem* **274**: 36035-8.
- Chen, C.Y., F. Del Gatto-Konczak, Z. Wu, and M. Karin. 1998. *Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. Science* **280**: 1945-9.
- Chen, C.Y., R. Gherzi, J.S. Andersen, G. Gaietta, K. Jurchott, H.D. Royer, M. Mann, and M. Karin. 2000. *Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. Genes Dev* **14**: 1236-48.

- Chen, N., M. Nomura, Q.B. She, W.Y. Ma, A.M. Bode, L. Wang, R.A. Flavell, and Z. Dong. 2001. *Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2- deficient mice. Cancer Res* **61**: 3908-12.
- 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.
- Cheng, J., J. Yang, Y. Xia, M. Karin, and B. Su. 2000. *Synergistic interaction of MEK kinase 2, c-Jun N-terminal kinase (JNK) kinase 2, and JNK1 results in efficient and specific JNK1 activation. Mol Cell Biol* **20**: 2334-42.
- Chong, H., J. Lee, and K.L. Guan. 2001. *Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. Embo J* **20**: 3716-27.
- Chow, C.W., M. Rincon, J. Cavanagh, M. Dickens, and R.J. Davis. 1997. *Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. Science* **278**: 1638-41.
- Christerson, L.B., C.A. Vanderbilt, and M.H. Cobb. 1999. *MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. Cell Motil Cytoskeleton* **43**: 186-98.
- Chu, Y., P.A. Solski, R. Khosravi-Far, C.J. Der, and K. Kelly. 1996. *The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP- 2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. J Biol Chem* **271**: 6497-501.
- Clark-Lewis, I., W.R. Thomas, and J.W. Schrader. 1985. *Characterization of hemopoietic growth factors from T cells and the myelomonocytic leukemia WEHI-3B. Exp Hematol* **13**: 304-11.
- Cleveland, J.L., J. Troppmair, G. Packham, D.S. Askew, P. Lloyd, M. Gonzalez-Garcia, G. Nunez, J.N. Ihle, and U.R. Rapp. 1994. *v-raf suppresses apoptosis and promotes growth of interleukin-3- dependent myeloid cells. Oncogene* **9**: 2217-26.
- Constant, S.L., C. Dong, D.D. Yang, M. Wysk, R.J. Davis, and R.A. Flavell. 2000. *JNK1 is required for T cell-mediated immunity against Leishmania major infection. J Immunol* **165**: 2671-6.
- 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.
- Cuenda, A., P. Cohen, V. Buee-Scherrer, and M. Goedert. 1997. *Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). Embo J* **16**: 295-305.
- 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.
- Davis, R.J. 1993. *The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem* **268**: 14553-6.
- Davis, R.J. 2000. *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell* **103**: 239-52.
- Dent, P., D.B. Reardon, D.K. Morrison, and T.W. Sturgill. 1995. *Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras- independent mechanisms in vitro. Mol Cell Biol* **15**: 4125-35.
- 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.
- Desdouets, C., G. Matesic, C.A. Molina, N.S. Foulkes, P. Sassone-Corsi, C. Brechot, and J. Sobczak-Thepot. 1995. *Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP- responsive transcription factors CREB and CREM. Mol Cell Biol* **15**: 3301-9.

- Devary, Y., R.A. Gottlieb, L.F. Lau, and M. Karin. 1991. *Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. Mol Cell Biol* **11**: 2804-11.
- Dhanasekaran, N. 1998. *Cell signaling: an overview. Oncogene* **17**: 1329-30.
- Diaz, B., D. Barnard, A. Filson, S. MacDonald, A. King, and M. Marshall. 1997. *Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. Mol Cell Biol* **17**: 4509-16.
- 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.
- Dinev, D., B.W. Jordan, B. Neufeld, J.D. Lee, D. Lindemann, U.R. Rapp, and S. Ludwig. 2001. *Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. EMBO Rep* **2**: 829-34.
- 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.
- Dong, C., D.D. Yang, M. Wusk, A.J. Whitmarsh, R.J. Davis, and R.A. Flavell. 1998. *Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. Science* **282**: 2092-5.
- Dorfman, K., D. Carrasco, M. Gruda, C. Ryan, S.A. Lira, and R. Bravo. 1996. *Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. Oncogene* **13**: 925-31.
- 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. 1996. *Control of ras activation. Cancer Surv* **27**: 87-100.
- Du, Q., I.N. Melnikova, and P.D. Gardner. 1998. *Differential effects of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K on Sp1- and Sp3-mediated transcriptional activation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor promoter. J Biol Chem* **273**: 19877-83.
- 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., B.W. Giddings, M.W. Brooks, L. Buday, A.M. Sizeland, and R.A. Weinberg. 1993. *Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. Nature* **363**: 45-51.
- Elion, E.A. 2001. *The Ste5p scaffold. J Cell Sci* **114**: 3967-78.
- English, J.M., G. Pearson, R. Baer, and M.H. Cobb. 1998. *Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. J Biol Chem* **273**: 3854-60.
- English, J.M., G. Pearson, T. Hockenberry, L. Shivakumar, M.A. White, and M.H. Cobb. 1999. *Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. J Biol Chem* **274**: 31588-92.
- Enslin, H., J. Raingeaud, and R.J. Davis. 1998. *Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. J Biol Chem* **273**: 1741-8.
- Erhardt, P., E.J. Schremser, and G.M. Cooper. 1999. *B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. Mol Cell Biol* **19**: 5308-15.
- Fabian, J.R., I.O. Daar, and D.K. Morrison. 1993. *Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. Mol Cell Biol* **13**: 7170-9.

- Facchini, L.M. and L.Z. Penn. 1998. *The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. Faseb J* **12**: 633-51.
- Fan, G., S.E. Merritt, M. Kortjenann, P.E. Shaw, and L.B. Holzman. 1996. *Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. J Biol Chem* **271**: 24788-93.
- Fanger, G.R., P. Gerwins, C. Widmann, M.B. Jarpe, and G.L. Johnson. 1997a. *MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c- Jun amino-terminal kinases? Curr Opin Genet Dev* **7**: 67-74.
- Fanger, G.R., N.L. Johnson, and G.L. Johnson. 1997b. *MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. Embo J* **16**: 4961-72.
- Farber, E. 1984. *The multistep nature of cancer development. Cancer Res* **44**: 4217-23.
- 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.
- Feig, L.A. 1994. *Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. Curr Opin Cell Biol* **6**: 204-11.
- Ferrell, J.E., Jr. 1996. *Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. Trends Biochem Sci* **21**: 460-6.
- Fleming, Y., C.G. Armstrong, N. Morrice, A. Paterson, M. Goedert, and P. Cohen. 2000. *Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. Biochem J* **352 Pt 1**: 145-54.
- Foltz, I.N., R.E. Gerl, J.S. Wieler, M. Luckach, R.A. Salmon, and J.W. Schrader. 1998. *Human mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli. J Biol Chem* **273**: 9344-51.
- Force, T., C.M. Pombo, J.A. Avruch, J.V. Bonventre, and J.M. Kyriakis. 1996. *Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. Circ Res* **78**: 947-53.
- Fuchs, S.Y., V. Adler, T. Buschmann, Z. Yin, X. Wu, S.N. Jones, and Z. Ronai. 1998a. *JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. Genes Dev* **12**: 2658-63.
- Fuchs, S.Y., V. Adler, M.R. Pincus, and Z. Ronai. 1998b. *MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10541-6.
- 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.
- Garrington, T.P. and G.L. Johnson. 1999. *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Curr Opin Cell Biol* **11**: 211-8.
- 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.
- Girardin, S.E. and M. Yaniv. 2001. *A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1- induced JNK activation. Embo J* **20**: 3437-46.
- Giroux, S., M. Tremblay, D. Bernard, J.F. Cardin-Girard, S. Aubry, L. Larouche, S. Rousseau, J. Huot, J. Landry, L. Jeannotte, and J. Charron. 1999. *Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. Curr Biol* **9**: 369-72.

- Glise, B. and S. Noselli. 1997. *Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in Drosophila morphogenesis. Genes Dev* **11**: 1738-47.
- 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.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Grignani, F., T. Kinsella, A. Mencarelli, M. Valtieri, D. Riganelli, L. Lanfrancone, C. Peschle, G.P. Nolan, and P.G. Pelicci. 1998. *High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. Cancer Res* **58**: 14-9.
- Gruda, M.C., K. Kovary, R. Metz, and R. Bravo. 1994. *Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. Oncogene* **9**: 2537-47.
- Guay, J., H. Lambert, G. Gingras-Breton, J.N. Lavoie, J. Huot, and J. Landry. 1997. *Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. J Cell Sci* **110**: 357-68.
- 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.
- Habelhah, H., K. Shah, L. Huang, A.L. Burlingame, K.M. Shokat, and Z. Ronai. 2001. *Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. J Biol Chem* **276**: 18090-5.
- Hagemann, C. and J.L. Blank. 2001. *The ups and downs of MEK kinase interactions. Cell Signal* **13**: 863-75.
- Hagemann, D., J. Troppmair, and U.R. Rapp. 1999. *Cot protooncogene activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells. Oncogene* **18**: 1391-400.
- 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.
- Hampton, L.L., P.J. Worland, B. Yu, S.S. Thorgeirsson, and A.C. Huggett. 1990. *Expression of growth-related genes during tumor progression in v-raf- transformed rat liver epithelial cells. Cancer Res* **50**: 7460-7.
- 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.
- Hanahan, D. and R.A. Weinberg. 2000. *The hallmarks of cancer. Cell* **100**: 57-70.
- 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.
- Hayashi, M., R.I. Tapping, T.H. Chao, J.F. Lo, C.C. King, Y. Yang, and J.D. Lee. 2001. *BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. J Biol Chem* **276**: 8631-4.
- He, H., H.L. Li, A. Lin, and R.A. Gottlieb. 1999. *Activation of the JNK pathway is important for cardiomyocyte death in response to simulated ischemia. Cell Death Differ* **6**: 987-91.
- He, T., A. Stepulak, T.H. Holmstrom, M.B. Omary, and J.E. Eriksson. 2002. *The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-jun-N-terminal kinase. J Biol Chem* **277**: 7.
- 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.

- Hekman, M., H. Hamm, A.V. Villar, B. Bader, J. Kuhlmann, J. Nickel, and U.R. Rapp. 2002. *Associations of B- and C-Raf with cholesterol, phosphatidylserine and lipid second messengers: Preferential binding of Raf to artificial lipid Rafts. J Biol Chem* **12**: 12.
- Herdegen, T., F.X. Claret, T. Kallunki, A. Martin-Villalba, C. Winter, T. Hunter, and M. Karin. 1998. *Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. J Neurosci* **18**: 5124-35.
- 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. and R. Treisman. 1995. *Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. Cell* **80**: 199-211.
- Hirose, T., D.A. O'Brien, and A.M. Jetten. 1995. *Cloning of the gene encoding the murine orphan receptor TAK1 and cell- type-specific expression in testis. Gene* **163**: 239-42.
- Ho, F.M., S.H. Liu, C.S. Liao, 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.
- Hochedlinger, K., E.F. Wagner, and K. Sabapathy. 2002. *Differential effects of JNK1 and JNK2 on signal specific induction of apoptosis. Oncogene* **21**: 2441-5.
- Holt, J.T., T.V. Gopal, A.D. Moulton, and A.W. Nienhuis. 1986. *Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4794-8.
- Howe, L.R., S.J. Leever, N. Gomez, S. Nakielny, P. Cohen, and C.J. Marshall. 1992. *Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. Cell* **71**: 335-42.
- 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.
- Huguier, S., J. Bagnuet, S. Perez, H. van Dam, and M. Castellazzi. 1998. *Transcription factor ATF2 cooperates with v-Jun to promote growth factor-independent proliferation in vitro and tumor formation in vivo. Mol Cell Biol* **18**: 7020-9.
- Hunter, T. 1994. *1001 protein kinases redux--towards 2000. Semin Cell Biol* **5**: 367-76.
- Hunter, T. 1995. *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell* **80**: 225-36.
- Huser, M., J. Lockett, A. Chiloeches, K. Mercer, M. Iwobi, S. Giblett, X.M. Sun, J. Brown, R. Marais, and C. Pritchard. 2001. *MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. Embo J* **20**: 1940-51.
- 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.
- 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.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene* **96**: 23-8.
- 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.
- Ise, K., K. Nakamura, K. Nakao, S. Shimizu, H. Harada, T. Ichise, J. Miyoshi, Y. Gondo, T. Ishikawa, A. Aiba, and M. Katsuki. 2000. *Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. Oncogene* **19**: 2951-6.

- Ito, M., K. Yoshioka, M. Akechi, S. Yamashita, N. Takamatsu, K. Sugiyama, M. Hibi, Y. Nakabeppu, T. Shiba, and K.I. Yamamoto. 1999. *JSAPI, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. Mol Cell Biol* **19**: 7539-48.
- Jacinto, E., G. Werlen, and M. Karin. 1998. *Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes. Immunity* **8**: 31-41.
- Jainchill, J.L., S.A. Aaronson, and G.J. Todaro. 1969. *Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. J Virol* **4**: 549-53.
- Jang, K.L., B. Pulverer, J.R. Woodgett, and D.S. Latchman. 1991. *Activation of the cellular transcription factor AP-1 in herpes simplex virus infected cells is dependent on the viral immediate-early protein ICPO. Nucleic Acids Res* **19**: 4879-83.
- Jin, D.Y., H. Teramoto, C.Z. Giam, R.F. Chun, J.S. Gutkind, and K.T. Jeang. 1997. *A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha. J Biol Chem* **272**: 25816-23.
- Jochum, W., E. Passegue, and E.F. Wagner. 2001. *AP-1 in mouse development and tumorigenesis. Oncogene* **20**: 2401-12.
- Johnson, L., D. Greenbaum, K. Cichowski, K. Mercer, E. Murphy, E. Schmitt, R.T. Bronson, H. Umanoff, W. Edelmann, R. Kucherlapati, and T. Jacks. 1997. *K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. Genes Dev* **11**: 2468-81.
- 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.
- Johnson, R.S., B. van Lingen, V.E. Papaioannou, and B.M. Spiegelman. 1993. *A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. Genes Dev* **7**: 1309-17.
- Joneson, T., M. McDonough, D. Bar-Sagi, and L. Van Aelst. 1996. *RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. Science* **274**: 1374-6.
- 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.
- Kamakura, S., T. Moriguchi, and E. Nishida. 1999. *Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. J Biol Chem* **274**: 26563-71.
- Kanakura, Y., B. Druker, K.W. Wood, H.J. Mamon, K. Okuda, T.M. Roberts, and J.D. Griffin. 1991. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce rapid phosphorylation and activation of the proto-oncogene Raf-1 in a human factor-dependent myeloid cell line. Blood* **77**: 243-8.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. *AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol* **9**: 240-6.
- Kato, Y., T.H. Chao, M. Hayashi, R.I. Tapping, and J.D. Lee. 2000. *Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. Immunol Res* **21**: 233-7.
- Kato, Y., R.I. Tapping, S. Huang, M.H. Watson, R.J. Ulevitch, and J.D. Lee. 1998. *Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. Nature* **395**: 713-6.
- Katz, M.E. and F. McCormick. 1997. *Signal transduction from multiple Ras effectors. Curr Opin Genet Dev* **7**: 75-9.
- Kelkar, N., S. Gupta, M. Dickens, and R.J. Davis. 2000. *Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. Mol Cell Biol* **20**: 1030-43.
- Kenney, A.M. and J.D. Kocsis. 1998. *Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. J Neurosci* **18**: 1318-28.

- Kerkhoff, E., R. Houben, S. Loffler, J. Troppmair, J.E. Lee, and U.R. Rapp. 1998. *Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. Oncogene* **16**: 211-6.
- 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.
- Kerkhoff, E. 1998. *Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. Oncogene* **17**: 1457-62.
- Kerkhoff, E. 2001. *The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. Adv Enzyme Regul* **41**: 261-7.
- Kerkhoff, E., J.C. Simpson, C.B. Leberfinger, I.M. Otto, T. Doerks, P. Bork, U.R. Rapp, T. Raabe, and R. Pepperkok. 2001. *The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. Curr Biol* **11**: 1963-8.
- Keyse, S.M. 2000. *Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. Curr Opin Cell Biol* **12**: 186-92.
- Kharbanda, S., S. Saxena, K. Yoshida, P. Pandey, M. Kaneki, Q. Wang, K. Cheng, Y.N. Chen, A. Campbell, T. Sudha, Z.M. Yuan, J. Narula, R. Weichselbaum, C. Nalin, and D. Kufe. 2000. *Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. J Biol Chem* **275**: 322-7.
- Khosravi-Far, R., M. Chrzanowska-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.
- 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.
- Kinoshita, T., T. Yokota, K. Arai, and A. Miyajima. 1995. *Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. Embo J* **14**: 266-75.
- 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. 1990. *Probing structure and function of the raf protein kinase domain with monoclonal antibodies. Oncogene* **5**: 713-720
- Kolch, W. 2000. *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J* **351 Pt 2**: 289-305.
- Kornfeld, K., D.B. Hom, and H.R. Horvitz. 1995. *The ksr-1 gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in C. elegans. Cell* **83**: 903-13.
- Krecic, A.M. and M.S. Swanson. 1999. *hnRNP complexes: composition, structure, and function. Curr Opin Cell Biol* **11**: 363-71.
- 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.
- Kubicek, M., M. Pacher, D. Abraham, K. Podar, M. Eulitz, and M. Baccarini. 2002. *Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. J Biol Chem* **277**: 7913-9.
- Kurokawa, M., K. Mitani, T. Yamagata, T. Takahashi, K. Izutsu, S. Ogawa, T. Moriguchi, E. Nishida, Y. Yazaki, and H. Hirai. 2000. *The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. Embo J* **19**: 2958-68.
- Kustikova, O., D. Kramerov, M. Grigorian, V. Berezin, E. Bock, E. Lukanidin, and E. Tulchinsky. 1998. *Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. Mol Cell Biol* **18**: 7095-105.

- 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. *Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines*. *Bioessays* **18**: 567-77.
- 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.
- Lallemant, D., J. Ham, S. Garbay, L. Bakiri, F. Traincard, O. Jeannequin, C.M. Pfarr, and M. Yaniv. 1998. *Stress-activated protein kinases are negatively regulated by cell density*. *Embo J* **17**: 5615-26.
- 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.
- Lee, J.C., J.T. Laydon, P.C. McDonnell, T.F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M.J. Blumenthal, J.R. Heys, S.W. Landvatter, and et al. 1994. *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. *Nature* **372**: 739-46.
- Lee, J.D., R.J. Ulevitch, and J. Han. 1995. *Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase*. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 715-24.
- 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.
- Leonardi, A., H. Ellinger-Ziegelbauer, G. Franzoso, K. Brown, and U. Siebenlist. 2000. *Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*. *J Biol Chem* **275**: 271-8.
- Levchenko, A., J. Bruck, and P.W. Sternberg. 2000. *Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5818-23.
- Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn. 1998. *Signal transduction through MAP kinase cascades*. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Li, Z., Y. Jiang, R.J. Ulevitch, and J. Han. 1996. *The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases*. *Biochem Biophys Res Commun* **228**: 334-40.
- 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.
- Lu, X., S. Nemoto, and A. Lin. 1997. *Identification of c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK)-activating kinase 2 as an activator of JNK but not p38*. *J Biol Chem* **272**: 24751-4.
- Luckett, J.C., M.B. Huser, N. Giagtzoglou, J.E. Brown, and C.A. Pritchard. 2000. *Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse*. *Cell Growth Differ* **11**: 163-71.
- Ludwig, S., K. Engel, A. Hoffmeyer, G. Sithanandam, B. Neufeld, D. Palm, M. Gaestel, and U.R. Rapp. 1996. *3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways*. *Mol Cell Biol* **16**: 6687-97.

- Madhani, H.D. and G.R. Fink. 1997. *Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. Science* **275**: 1314-7.
- 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.
- Maki, Y., T.J. Bos, C. Davis, M. Starbuck, and P.K. Vogt. 1987. *Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2848-52.
- Malliri, A., M. Symons, R.F. Hennigan, A.F. Hurlstone, R.F. Lamb, T. Wheeler, and B.W. Ozanne. 1998. *The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, motility, and in vitro invasion of A431 cells. J Cell Biol* **143**: 1087-99.
- Manome, Y., R. Datta, N. Taneja, T. Shafman, E. Bump, R. Hass, R. Weichselbaum, and D. Kufe. 1993. *Coinduction of c-jun gene expression and internucleosomal DNA fragmentation by ionizing radiation. Biochemistry* **32**: 10607-13.
- 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., Y. Light, H.F. Paterson, and C.J. Marshall. 1995. *Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. Embo J* **14**: 3136-45.
- Marais, R. and C.J. Marshall. 1996. *Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. Cancer Surv* **27**: 101-25.
- Marinissen, M.J., M. Chiariello, M. Pallante, and J.S. Gutkind. 1999. *A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. Mol Cell Biol* **19**: 4289-301.
- Marti, A., Z. Luo, C. Cunningham, Y. Ohta, J. Hartwig, T.P. Stossel, J.M. Kyriakis, and J. Avruch. 1997. *Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. J Biol Chem* **272**: 2620-8.
- Martin, J.H., A.A. Mohit, and C.A. Miller. 1996. *Developmental expression in the mouse nervous system of the p493F12 SAP kinase. Brain Res Mol Brain Res* **35**: 47-57.
- Maslinski, W., B. Remillard, M. Tsudo, and T.B. Strom. 1992. *Interleukin-2 (IL-2) induces tyrosine kinase-dependent translocation of active raf-1 from the IL-2 receptor into the cytosol. J Biol Chem* **267**: 15281-4.
- Mason, C.S., C.J. Springer, R.G. Cooper, G. Superti-Furga, C.J. Marshall, and R. Marais. 1999. *Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. Embo J* **18**: 2137-48.
- McCarthy, S.A., M.L. Samuels, C.A. Pritchard, J.A. Abraham, and M. McMahon. 1995. *Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes. Genes Dev* **9**: 1953-64.
- McDonald, P.H., C.W. Chow, W.E. Miller, S.A. Laporte, M.E. Field, F.T. Lin, R.J. Davis, and R.J. Lefkowitz. 2000. *Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. Science* **290**: 1574-7.
- McLaughlin, M.M., S. Kumar, P.C. McDonnell, S. Van Horn, J.C. Lee, G.P. Livi, and P.R. Young. 1996. *Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. J Biol Chem* **271**: 8488-92.
- 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. 1999a. *Multiple signals converging on NF-kappaB. Curr Opin Cell Biol* **11**: 226-32.

- Mercurio, F. and A.M. Manning. 1999b. *NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. Oncogene* **18**: 6163-71.
- Mercurio, F., B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, D.B. Young, J.W. Li, G. Pascual, A. Motiwala, H. Zhu, M. Mann, and A.M. Manning. 1999. *IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. Mol Cell Biol* **19**: 1526-38.
- Meyer, D., A. Liu, and B. Margolis. 1999. *Interaction of c-Jun amino-terminal kinase interacting protein-1 with p190 rhoGEF and its localization in differentiated neurons. J Biol Chem* **274**: 35113-8.
- Milne, D.M., L.E. Campbell, D.G. Campbell, and D.W. Meek. 1995. *p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation- induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1. J Biol Chem* **270**: 5511-8.
- 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, M. McMahon, C. Lange-Carter, B. Derijard, R.J. Davis, G.L. Johnson, and M. Karin. 1994. *Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. Science* **266**: 1719-23.
- Ming, X.F., M. Kaiser, and C. Moroni. 1998. *c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. Embo J* **17**: 6039-48.
- Moodie, S.A. and A. Wolfman. 1994. *The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. Trends Genet* **10**: 44-8.
- 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.
- Morooka, H., J.V. Bonventre, C.M. Pombo, J.M. Kyriakis, and T. Force. 1995. *Ischemia and reperfusion enhance ATF-2 and c-Jun binding to cAMP response elements and to an AP-1 binding site from the c-jun promoter. J Biol Chem* **270**: 30084-92.
- Morrison, D.K. 2001. *KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? J Cell Sci* **114**: 1609-12.
- Mullins, R.D. 2000. *How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. Curr Opin Cell Biol* **12**: 91-6.
- Musti, A.M., M. Treier, and D. Bohmann. 1997. *Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. Science* **275**: 400-2.
- Nakielnny, S. and G. Dreyfuss. 1999. *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. Cell* **99**: 677-90.
- Namgung, U. and Z. Xia. 2000. *Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. J Neurosci* **20**: 6442-51.
- Natoli, G., A. Costanzo, A. Ianni, D.J. Templeton, J.R. Woodgett, C. Balsano, and M. Levvero. 1997. *Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2- dependent pathway. Science* **275**: 200-3.
- Neel, B.G. and N.K. Tonks. 1997. *Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. Curr Opin Cell Biol* **9**: 193-204.
- Negri, S., A. Oberson, M. Steinmann, C. Sauser, P. Nicod, G. Waeber, D.F. Schorderet, and C. Bonny. 2000. *cDNA cloning and mapping of a novel islet-brain/JNK-interacting protein. Genomics* **64**: 324-30.
- Neri, A., D.M. Knowles, A. Greco, F. McCormick, and R. Dalla-Favera. 1988. *Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9268-72.

- Nihalani, D., D. Meyer, S. Pajni, and L.B. Holzman. 2001. *Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components. Embo J* **20**: 3447-58.
- 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.
- Nobes, C.D. and A. Hall. 1999. *Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J Cell Biol* **144**: 1235-44.
- Noguchi, K., C. Kitanaka, H. Yamana, A. Kokubu, T. Mochizuki, and Y. Kuchino. 1999. *Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem* **274**: 32580-7.
- Otto, I.M., T. Raabe, U.E. Rennefahrt, P. Bork, U.R. Rapp, and E. Kerkhoff. 2000. *The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. Curr Biol* **10**: 345-8.
- Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur. 1999. *Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. Science* **286**: 1374-7.
- Palaszynski, E.W. and J.N. Ihle. 1984. *Evidence for specific receptors for interleukin 3 on lymphokine-dependent cell lines established from long-term bone marrow cultures. J Immunol* **132**: 1872-8.
- Park, H.S., J.S. Lee, S.H. Huh, J.S. Seo, and E.J. Choi. 2001. *Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. Embo J* **20**: 446-56.
- Pawson, T. and J.D. Scott. 1997. *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science* **278**: 2075-80.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. 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.
- Pellet, J.B., J.A. Haefliger, J.K. Staple, C. Widmann, E. Welker, H. Hirling, C. Bonny, P. Nicod, S. Catsicas, G. Waeber, and B.M. Riederer. 2000. *Spatial, temporal and subcellular localization of islet-brain 1 (IB1), a homologue of JIP-1, in mouse brain. Eur J Neurosci* **12**: 621-32.
- Perkins, G.R., C.J. Marshall, and M.K. Collins. 1996. *The role of MAP kinase kinase in interleukin-3 stimulation of proliferation. Blood* **87**: 3669-75.
- Pfarr, C.M., F. Mechta, G. Spyrou, D. Lallemand, S. Carillo, and M. Yaniv. 1994. *Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. Cell* **76**: 747-60.
- Phelan, D.R., G. Price, Y.F. Liu, and D.S. Dorow. 2001. *Activated JNK phosphorylates the c-terminal domain of MLK2 that is required for MLK2-induced apoptosis. J Biol Chem* **276**: 10801-10.
- 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.
- Potapova, O., M. Gorospe, F. Bost, N.M. Dean, W.A. Gaarde, D. Mercola, and N.J. Holbrook. 2000a. *c-Jun N-terminal kinase is essential for growth of human T98G glioblastoma cells. J Biol Chem* **275**: 24767-75.
- Potapova, O., M. Gorospe, R.H. Dougherty, N.M. Dean, W.A. Gaarde, and N.J. Holbrook. 2000b. *Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and*

- induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. Mol Cell Biol* **20**: 1713-22.
- Pritchard, C.A., L. Bolin, R. Slattery, R. Murray, and M. McMahon. 1996. *Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. Curr Biol* **6**: 614-7.
- Pulverer, B.J., J.M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J.R. Woodgett. 1991. *Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. Nature* **353**: 670-4.
- Quilliam, L.A., R. Khosravi-Far, S.Y. Huff, and C.J. Der. 1995. *Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. Bioessays* **17**: 395-404.
- Raingeaud, J., S. Gupta, J.S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R.J. Ulevitch, and R.J. Davis. 1995. *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. J Biol Chem* **270**: 7420-6.
- Raitano, A.B., J.R. Halpern, T.M. Hambuch, and C.L. Sawyers. 1995. *The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11746-50.
- Ramesh, N., I.M. Anton, N. Martinez-Quiles, and R.S. Geha. 1999. *Waltzing with WASP. Trends Cell Biol* **9**: 15-9.
- Rao, K.M. and H.J. Cohen. 1991. *Actin cytoskeletal network in aging and cancer. Mutat Res* **256**: 139-48.
- Rapp, F. and H. Wrzos. 1985. *Synergistic effect of human leukocyte interferon and nonoxynol 9 against herpes simplex virus type 2. Antimicrob Agents Chemother* **28**: 449-51.
- Rapp, U.R. and C. Todaro. 1978. *Generation of new mouse sarcoma viruses in cell culture. Science* **201**: 821-4.
- 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.
- Reinhard, C., B. Shamon, 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.
- Ridley, A.J. and A. Hall. 1992. *Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**: 661-71.
- 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.
- Riesgo-Escovar, J.R. and E. Hafen. 1997. *Common and distinct roles of DFos and DJun during Drosophila development. Science* **278**: 669-72.
- Robinson, M.J., S.A. Stippec, E. Goldsmith, M.A. White, and M.H. Cobb. 1998. *A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. Curr Biol* **8**: 1141-50.
- Rodrigues, G.A., M. Park, and J. Schlessinger. 1997. *Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. Embo J* **16**: 2634-45.
- Sabapathy, K., Y. Hu, T. Kallunki, M. Schreiber, J.P. David, W. Jochum, E.F. Wagner, and M. Karin. 1999a. *JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. Curr Biol* **9**: 116-25.
- Sabapathy, K., W. Jochum, K. Hochedlinger, L. Chang, M. Karin, and E.F. Wagner. 1999b. *Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. Mech Dev* **89**: 115-24.
- Sahai, E., M.F. Olson, and C.J. Marshall. 2001. *Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. Embo J* **20**: 755-66.

- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*; 2. Edition. New York, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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.
- Sander, E.E. and J.G. Collard. 1999. *Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. Eur J Cancer* **35**: 1905-11.
- 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.
- Sasaki, T., T. Wada, H. Kishimoto, J. Irie-Sasaki, G. Matsumoto, T. Goto, Z. Yao, A. Wakeham, T.W. Mak, A. Suzuki, S.K. Cho, J.C. Zuniga-Pflucker, A.J. Oliveira-dos-Santos, T. Katada, H. Nishina, and J.M. Penninger. 2001. *The stress kinase mitogen-activated protein kinase kinase (MKK)7 is a negative regulator of antigen receptor and growth factor receptor- induced proliferation in hematopoietic cells. J Exp Med* **194**: 757-68.
- Satoh, T., Y. Minami, T. Kono, K. Yamada, A. Kawahara, T. Taniguchi, and Y. Kaziro. 1992. *Interleukin 2-induced activation of Ras requires two domains of interleukin 2 receptor beta subunit, the essential region for growth stimulation and Lck-binding domain. J Biol Chem* **267**: 25423-7.
- Schaeffer, H.J., A.D. Catling, S.T. Eblen, L.S. Collier, A. Krauss, and M.J. Weber. 1998. *MPI: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. Science* **281**: 1668-71.
- 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.
- Schorpp-Kistner, M., Z.Q. Wang, P. Angel, and E.F. Wagner. 1999. *JunB is essential for mammalian placentation. Embo J* **18**: 934-48.
- 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.
- Schreiber, M., Z.Q. Wang, W. Jochum, I. Fetka, C. Elliott, and E.F. Wagner. 2000. *Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. Development* **127**: 4937-48.
- 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.
- Shaulian, E. and M. Karin. 2001. *AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene* **20**: 2390-400.
- Shaulian, E. and M. Karin. 2002. *AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol* **4**: E131-6.
- Shaulian, E., M. Schreiber, F. Piu, M. Beeche, E.F. Wagner, and M. Karin. 2000. *The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. Cell* **103**: 897-907.

- She, Q.B., N. Chen, A.M. Bode, R.A. Flavell, and Z. Dong. 2002. *Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. *Cancer Res* **62**: 1343-8.
- Sherr, C.J. 1993. *Mammalian G1 cyclins*. *Cell* **73**: 1059-65.
- Shim, J., H. Lee, J. Park, H. Kim, and E.J. Choi. 1996. *A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases*. *Nature* **381**: 804-6.
- Shirakabe, K., K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, S. Matsuda, T. Moriguchi, Y. Gotoh, K. Matsumoto, and E. Nishida. 1997. *TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*. *J Biol Chem* **272**: 8141-4.
- Sithanandam, G., F. Latif, F.M. Duh, R. Bernal, U. Smola, H. Li, I. Kuzmin, V. Wixler, L. Geil, and S. Shrestha. 1996. *3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region*. *Mol Cell Biol* **16**: 868-76.
- Sluss, H.K., Z. Han, T. Barrett, R.J. Davis, and Y.T. Ip. 1996. *A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in Drosophila*. *Genes Dev* **10**: 2745-58.
- Smeal, T., B. Binetruy, D. Mercola, A. Grover-Bardwick, G. Heidecker, U.R. Rapp, and M. Karin. 1992. *Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73*. *Mol Cell Biol* **12**: 3507-13.
- 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.
- Smith, A., F. Ramos-Morales, A. Ashworth, and M. Collins. 1997. *A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3- dependent cells*. *Curr Biol* **7**: 893-6.
- Smith, M.J. and E.V. Prochownik. 1992. *Inhibition of c-jun causes reversible proliferative arrest and withdrawal from the cell cycle*. *Blood* **79**: 2107-15.
- Stenmark, H., R. Aasland, B.H. Toh, and A. D'Arrigo. 1996. *Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger*. *J Biol Chem* **271**: 24048-54.
- Stronach, B.E. and N. Perrimon. 1999. *Stress signaling in Drosophila*. *Oncogene* **18**: 6172-82.
- 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, G.H., W. Hilgers, M.C. Shekher, D.J. Tang, C.J. Yeo, R.H. Hruban, and S.E. Kern. 1998. *Alterations in pancreatic, biliary, and breast carcinomas support MKK4 as a genetically targeted tumor suppressor gene*. *Cancer Res* **58**: 2339-42.
- Tabin, C.J., J.W. Hoffmann, S.P. Goff, and R.A. Weinberg. 1982. *Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene*. *Mol Cell Biol* **2**: 426-36.
- 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.
- Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariati, P. Cohen, and M.J. Comb. 1996. *FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2*. *Embo J* **15**: 4629-42.
- Tanaka, S., T. Ouchi, and H. Hanafusa. 1997. *Downstream of Crk adaptor signaling pathway: activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2356-61.
- Teng, D.H., W.L. Perry, 3rd, J.K. Hogan, M. Baumgard, R. Bell, S. Berry, T. Davis, D. Frank, C. Frye, T. Hattier, R. Hu, S. Jammulapati, T. Janecki, A. Leavitt, J.T. Mitchell, R. Pero, D. Sexton, M. Schroeder, P.H. Su, B. Swedlund, J.M. Kyriakis, J. Avruch, P.

- Bartel, A.K. Wong, S.V. Tavtigian, and et al. 1997. *Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor. Cancer Res* **57**: 4177-82.
- Terada, K., Y. Kaziro, and T. Satoh. 1997. *Ras-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in response to interleukin-3 stimulation in hematopoietic BaF3 cells. J Biol Chem* **272**: 4544-8.
- Teramoto, H., O.A. Coso, H. Miyata, T. Igishi, T. Miki, and J.S. Gutkind. 1996a. *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.
- Teramoto, H., P. Crespo, O.A. Coso, T. Igishi, N. Xu, and J.S. Gutkind. 1996b. *The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. J Biol Chem* **271**: 25731-4.
- Thompson, N.A., J.A. Haefliger, A. Senn, T. Tawadros, F. Magara, B. Ledermann, P. Nicod, and G. Waeber. 2001. *Islet-brain1/JNK-interacting protein-1 is required for early embryogenesis in mice. J Biol Chem* **276**: 27745-8.
- Tibbles, L.A. and J.R. Woodgett. 1999. *The stress-activated protein kinase pathways. Cell Mol Life Sci* **55**: 1230-54.
- Tobiume, K., T. Inage, K. Takeda, S. Enomoto, K. Miyazono, and H. Ichijo. 1997. *Molecular cloning and characterization of the mouse apoptosis signal-regulating kinase 1. Biochem Biophys Res Commun* **239**: 905-10.
- Toft, D.J., S.B. Rosenberg, G. Bergers, O. Volpert, and D.I. Linzer. 2001. *Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13055-9.
- 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. 1999. *The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. Mol Cell Biol* **19**: 1569-81.
- 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.
- Trosko, J.E. and R.J. Ruch. 1998. *Cell-cell communication in carcinogenesis. Front Biosci* **3**: D208-36.
- Turner, B., U. Rapp, H. App, M. Greene, K. Dobashi, and J. Reed. 1991. *Interleukin 2 induces tyrosine phosphorylation and activation of p72-74 Raf-1 kinase in a T-cell line. Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1227-31.
- Turner, B.C., N.K. Tonks, U.R. Rapp, and J.C. Reed. 1993. *Interleukin 2 regulates Raf-1 kinase activity through a tyrosine phosphorylation-dependent mechanism in a T-cell line. Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5544-8.
- Umanoff, H., W. Edelmann, A. Pellicer, and R. Kucherlapati. 1995. *The murine N-ras gene is not essential for growth and development. Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1709-13.
- van Dam, H. and M. Castellazzi. 2001. *Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. Oncogene* **20**: 2453-64.

- van Dam, H., D. Wilhelm, I. Herr, A. Steffen, P. Herrlich, and P. Angel. 1995. *ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. Embo J* **14**: 1798-811.
- van Straaten, F., R. Muller, T. Curran, C. Van Beveren, and I.M. Verma. 1983. *Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 3183-7.
- Venter, J.C. et al. 2001. *The sequence of the human genome. Science* **291**: 1304-51.
- Verhey, K.J., D. Meyer, R. Deehan, J. Blenis, B.J. Schnapp, T.A. Rapoport, and B. Margolis. 2001. *Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. J Cell Biol* **152**: 959-70.
- 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, H.G., T. Miyashita, S. Takayama, T. Sato, T. Torigoe, S. Krajewski, S. Tanaka, L. Hovey, 3rd, J. Troppmair, U.R. Rapp, and et al. 1994. *Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. Oncogene* **9**: 2751-6.
- Wang, X., J.L. Martindale, Y. Liu, and N.J. Holbrook. 1998a. *The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen- activated protein kinase signalling pathways on cell survival. Biochem J* **333**: 291-300.
- Wang, X.S., K. Diener, T.H. Tan, and Z. Yao. 1998b. *MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. Biochem Biophys Res Commun* **253**: 33-7.
- Wartmann, M., P. Hofer, P. Turowski, A.R. Saltiel, and N.E. Hynes. 1997. *Negative modulation of membrane localization of the Raf-1 protein kinase by hyperphosphorylation. J Biol Chem* **272**: 3915-23.
- 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.
- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 1999. *Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. Nat Cell Biol* **1**: 136-43.
- Wellington, A., S. Emmons, B. James, J. Calley, M. Grover, P. Tolia, and L. Manseau. 1999. *Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. Development* **126**: 5267-74.
- 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. and R.J. Davis. 1996. *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med* **74**: 589-607.
- Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis. 1998. *Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. Trends Biochem Sci* **23**: 481-5.
- Whitmarsh, A.J., C.Y. Kuan, N.J. Kennedy, N. Kelkar, T.F. Haydar, J.P. Mordes, M. Appel, A.A. Rossini, S.N. Jones, R.A. Flavell, P. Rakic, and R.J. Davis. 2001. *Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. Genes Dev* **15**: 2421-32.
- 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.
- Widmann, C., S. Gibson, M.B. Jarpe, and G.L. Johnson. 1999. *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev* **79**: 143-80.

- Wisdom, R., R.S. Johnson, and C. Moore. 1999. *c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. Embo J* **18**: 188-97.
- Wisdon, R. and I.M. Verma. 1993. *Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. Mol Cell Biol* **13**: 7429-38.
- Wojnowski, L., L.F. Stancato, A.C. Lerner, U.R. Rapp, and A. Zimmer. 2000. *Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. Mech Dev* **91**: 97-104.
- Wojnowski, L., A.M. Zimmer, T.W. Beck, H. Hahn, R. Bernal, U.R. Rapp, and A. Zimmer. 1997. *Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. Nat Genet* **16**: 293-7.
- Wolter, S., J.F. Mushinski, A.M. Saboori, K. Resch, and M. Kracht. 2002. *Inducible expression of a constitutively active mutant of mitogen- activated protein kinase kinase 7 specifically activates c-JUN NH2- terminal protein kinase, alters expression of at least nine genes, and inhibits cell proliferation. J Biol Chem* **277**: 3576-84.
- Wu, Z., J. Wu, E. Jacinto, and M. Karin. 1997. *Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2- terminal kinase-specific kinase. Mol Cell Biol* **17**: 7407-16.
- 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.
- Xiao, L. and W. Lang. 2000. *A dominant role for the c-Jun NH2-terminal kinase in oncogenic ras- induced morphologic transformation of human lung carcinoma cells. Cancer Res* **60**: 400-8.
- Xing, J., J.M. Kornhauser, Z. Xia, E.A. Thiele, and M.E. Greenberg. 1998. *Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. Mol Cell Biol* **18**: 1946-55.
- Xu, S. and M.H. Cobb. 1997. *MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. J Biol Chem* **272**: 32056-60.
- Xu, X., O. Heidenreich, I. Kitajima, K. McGuire, Q. Li, B. Su, and M. Nerenberg. 1996. *Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. Oncogene* **13**: 135-42.
- Xu, X., J. Raber, D. Yang, B. Su, and L. Mucke. 1997. *Dynamic regulation of c-Jun N-terminal kinase activity in mouse brain by environmental stimuli. Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12655-60.
- 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.
- Yang, J., M. Boerm, M. McCarty, C. Bucana, I.J. Fidler, Y. Zhuang, and B. Su. 2000. *Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. Nat Genet* **24**: 309-13.
- 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.
- 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.
- Yiagnisis, M. and D.A. Spandidos. 1987. *Interleukin 3 like activity secreted from human ras or myc transfected rodent cells. Anticancer Res* **7**: 1293-7.

- Zervos, A.S., L. Faccio, J.P. Gatto, J.M. Kyriakis, and R. Brent. 1995. *Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10531-4.
- Zhang, J., F. Zhang, D. Ebert, M.H. Cobb, and E.J. Goldsmith. 1995a. *Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. Structure* **3**: 299-307.
- Zhang, S., J. Han, M.A. Sells, J. Chernoff, U.G. Knaus, R.J. Ulevitch, and G.M. Bokoch. 1995b. *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.
- Zheng, C., J. Xiang, T. Hunter, and A. Lin. 1999. *The JNKK2-JNK1 fusion protein acts as a constitutively active c-Jun kinase that stimulates c-Jun transcription activity. J Biol Chem* **274**: 28966-71.
- 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.
- Zhou, G., Z.Q. Bao, and J.E. Dixon. 1995. *Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem* **270**: 12665-9.
- Zinck, R., M.A. Cahill, M. Kracht, C. Sachsenmaier, R.A. Hipskind, and A. Nordheim. 1995. *Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. Mol Cell Biol* **15**: 4930-8.
- 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.
- Zondag, G.C., E.E. Evers, J.P. ten Klooster, L. Janssen, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard. 2000. *Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. J Cell Biol* **149**: 775-82.

ANHANG

Abkürzungen

Nicht aufgeführt werden Einheiten des international gebräuchlichen SI-Systems.

| | |
|--------------------|--|
| A | Adenin/ Adenosin |
| Abb. | Abbildung |
| abs. | absolut |
| Amp. | Ampicillin |
| AP-1 | Aktivator Protein 1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua bidest. | Aqua bidestillata |
| AS | Aminosäure |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BES | N,N-bis-2-Hydroxyethyl-2-aminoethansulfonsäure |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin/ Cytidin |
| c | Konzentration |
| ca. | circa |
| cDNA | copy DNA |
| cfu | colony forming units |
| Ci | Curie |
| CIP | Calf Intestinal Phosphatase |
| Cot | cancer osaka thyroid |
| CRIB | Cdc/Rac-interactive binding motif |
| C-terminal | carboxyterminal |
| ddH ₂ O | destilliertes Wasser |
| d.h. | dass heißt |
| DMEM | Dulbecco´s Modified Eagle Medium |
| DMF | N,N-Dimethyl-Formamide |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |

| | |
|----------------|--|
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNTP | Desoxynucleotidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Enhanced Chemoluminescence |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| e.g. | for example; Lat.: <i>exempli gratia</i> |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| EGTA | Ethylen-glycol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraacetat |
| ERK | Extracellular Regulated Kinase |
| FCS | fetal calf serum |
| GAP | GTPase aktivierendes Protein |
| GCK | Germinal center kinase |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GDI | GDP Dissoziationsinhibitor |
| GEF | Guaninnukleotide-exchange factor |
| GPCR | G-Protein gekoppelte Rezeptoren |
| G-Protein | GTP/GDP-bindendes Protein |
| Grb2 | growth factor receptor-bound protein 2 |
| GST | Glutathion S-Transferase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HA | Hämagglutinin (-Epitop) |
| HEPES | N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| Hsp | heat shock protein |
| IB | Immunoblot |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunopräzipitation |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalaktosid |
| JIP | JNK interagierendes Protein |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| JSAP1 | JNK/SAPK-associated protein 1 |
| Kb | Kilobasenpaare |

| | |
|----------------|---|
| KDa | Kilo-Dalton |
| LacZ | β -Galactosidase |
| Luc | Luciferasegen |
| MAPK | Mitogen aktivierte Proteinkinase |
| MAPKAP | MAPK aktivierte Proteinkinase Kinase |
| MBP | myolin basic protein |
| MES | 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure |
| MKK | MAPK Kinase |
| MKKK | MAPK Kinase Kinase |
| MKKKK | MAPK Kinase Kinase Kinase |
| MEK | MAPK/ERK aktivierende Kinase |
| MEKK | MAPK/ERK aktivierende Kinase Kinase |
| MKP | MAP-Kinasen Phosphatasen |
| MLK | Mixed lineage kinase |
| MP1 | MEK Partner 1 |
| MRNA | messenger RNA |
| MSZ | Institut für Medizinische Strahlkunde und Zellforschung |
| Na-O-V | Natrium Orthovanadat |
| NES | Nukleäres Exportsignal |
| NF- κ B | nuclear factor- κ B |
| NGF | Nerve growth factor |
| NLS | Nukleäre Lokalisationssignal |
| NP40 | Nonidet 40 |
| N-terminal | aminoterminal |
| OD | Optische Dichte |
| ORE | oncogene responsive element |
| PAK | p21-activated kinase |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaktion |
| PC12 | Phaeochromocytoma 12 |

| | |
|--------|--|
| PEG | Polyethylenglykol |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PKC | Proteinkinase C |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| PTB | Phosphotyrosine binding domain |
| Raf | rapidly accelerated fibrosarcoma |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptor Tyrosin Kinase |
| SAPK | Stress-aktivierte Proteinkinase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Ser | Serin |
| SH | Src Homologie |
| Sos | Son of Sevenless |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TPA | Tetradecanoylphorbol Acetat |
| Tpl-2 | Tumor progression locus 2 |
| Thr | Threonin |
| Tyr | Tyrosin |
| u.a. | unter anderem |
| usw. | und so weiter |
| UV | Ultraviolett |
| u.v.a. | und viele andere |
| v | Volumen |
| vgl. | vergleiche |
| w | weight, Gewicht |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -DGalactopyranosid |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre unvollständig, ohne all den Menschen Dank zu sagen, die, jeder auf seine Weise, zum Gelingen beigetragen haben.

Herrn **Prof. Dr. Ulf R. Rapp** danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die ausgezeichnete Betreuung dieser Dissertation sowie für die Etablierung einer innovativen und kompetenten Forschungsatmosphäre am MSZ. Das Umfeld eines international orientierten Institutes habe ich sehr geschätzt.

Herrn **Prof. Dr. Roland Benz** danke ich für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen und die Arbeit vor der Biologischen Fakultät zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt vor allem auch Herrn **PD Dr. Jakob Troppmair**, der mir nicht nur in seiner Arbeitsgruppe „Asyl“ gewährte, sondern durch sein reges Interesse am Verlauf der einzelnen Experimente, durch seinen motivierenden Zuspruch in Krisenzeiten und seine stetige Diskussionsbereitschaft maßgeblich zum Erfolg beigetragen hat. Durch seinen unergründlichen Optimismus und Enthusiasmus habe ich meine Freude und die Begeisterung für die Wissenschaft wiedergewonnen. Ich schätze ihn sehr als Mensch, der sich aufopferungsvoll für andere einsetzt. Daneben hat er großen Mut bewiesen, indem er mir, als absoluten Computerlaien, regelmäßig sein Notebook anvertraute.

Für die phantastische Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei meinen verbliebenen **Laborkollegen** Wolfgang Tränkenschuh und Mannikam Janikaram, den „Kellerkindern“ Tamara Potapenko und Andreas Schmidt sowie der „Altherrenriege“ Dr. Wolf-Hans Thomas und Dr. Mirko Hekman.

Erst eine Kooperation mit Herrn **Dr. Bertram Illert** aus der Chirurgie der Poliklinik in Würzburg hat uns die Etablierung der *in vivo* Tumordaten ermöglicht. Tamara Potapenko und Alla Gancher waren verlässliche Partner bei der Herstellung der histologischen Präparate, die freundlicherweise von Herrn **Dr. Axel Greiner** aus der Pathologie (Würzburg) begutachtet wurden.

Bedanken möchte ich mich auch, bei all den **fleißigen Helfern des MSZ** (Frau Röder; Frau Blättler, Frau Wagenbrenner, Frau Krämer und Herrn Lipp), die im Hintergrund agieren und täglich dafür sorgen, dass wir uns auf das wissenschaftliche Arbeiten konzentrieren können. Den Damen aus der **Proteintruppe**, allen voran Ludmilla Wixler und Renate Metz, danke ich für Vermittlung vieler praxisnaher Tipps sowie die Bereitstellung von Antikörper aus ihrem unermeßlichen Fundus. **Frau Pfränger** gilt mein Dank für die Produktion von unzähligen Fotos bzw. Dias, die selbst in letzter Minute angefordert, immer rechtzeitig fertig wurden. **Reinhold Krug und Gunnar Kristjansson** führten mit Akribie alle Sequenzierungen durch. Ein großes Lob gebührt auch „Werkstattmeister“ **Gunther Tietsch** für die Herstellung der weltbesten Klonierungsringe, für die Reparatur der Zellbrutschränke (auch außerhalb der Dienstzeiten), die fachgerechte Ausführung kompliziertester Spezialaufträge in Rekordzeit, vor allem aber auch für sein immer fröhliches Wesen mit dem er uns selbst an grauen Tagen aufzuheitern weiß. Ich danke den **Computerexperten** Dr. Joachim Fensterle, Dr. Twardzik und Matthias Seger für so manche Rettung in letzter Not. Den beiden **Korrekturleserinnen**, Frau Gabriele Strohm und meiner Mutter, möchte ich für ihre Ausdauer danken, sich durch dieses, für sie unverständliche, Kauderwelsch zu kämpfen.

Allen **Doktoranden und Diplomanden** des MSZ sei gedankt für ihre Hilfsbereitschaft und die geselligen Aktivitäten außerhalb des Labors. Stellvertretend hervorheben möchte ich hierbei den „Social Event Manager“ des MSZ: Dr. Bruce Jordan.

Mein Dank gilt auch den vielen **ehemaligen Mitarbeitern** des Institutes: In der **AG Hefegenetik**, bestehend aus PD Dr. Tillman Schuster, Branislav Kovachev, Wilfried Rossoll und Nina Wegerer, habe ich meine „ersten Schritte“ unternommen und viele grundlegende Arbeitsmethoden gelernt, von denen ich heute noch profitiere. Unvergesslich bleiben die Spiele- und Cocktailabende mit den beiden „Hagemännern“ Dorthé und Carsten, Maike Gottermeier und Petra Lorenz. Veronique Le Mellay, Jannic Böhm und „Jungforscher“ Jörg Hartkamp standen mir bei vielen Experimenten mit Rat und Tat zur Seite bzw. wussten mit ihrem phänomenalen Literaturgedächtnis zu glänzen.

Sie alle haben dazu beigetragen, dass ich meine Zeit im MSZ in guter Erinnerung behalten werde!

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie Dank sagen, die mir in all den Jahren ein großer Rückhalt war.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Rennefahrt
Vornamen: Ulrike Erna Erika
Geburtsdatum: 18.12.1972
Geburtsort: Bad Neustadt an der Saale
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Anschrift: Rottendorfer Str. 29a
D-97074 Würzburg
E-mail: imsd092@mail.uni-wuerzburg.de

Schul Ausbildung

1979-1982 Grunds chule in Untersiemau
1982-1983 Grunds chule in Höchberg
1983-1985 Friedrich-Koenig Gymnasium in Würzburg
1985-1992 Leininger-Gymnasium in Grünstadt
Juni 1992 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Hochschulausbildung und Dissertation

10/1992-06/1998 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
Studienfächer im Hauptstudium:
Mikrobiologie (Hauptfach), Biotechnologie und Zoologie (mit dem Schwerpunkt Tierphysiologie)

06/1997-06/1998 Diplomarbeit an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg innerhalb der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Tillman Schuster am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Kin3p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Betreuer: Prof. Dr. J. Kreft).

seit 8/1998 Promotionsstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg im Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ):

Versbacher Str. 5
D-97078 Würzburg
Tel.: 0931/ 201 45141

Betreuer: Prof. Dr. Ulf R. Rapp

VERZEICHNIS EIGENER PUBLIKATIONEN

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Artikel in Fachzeitschriften

Otto, I.M., T. Raabe, U.E.E. Rennefahrt, P. Bork, U.R. Rapp, and E. Kerkhoff. 2000.
The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. Curr Biol **10**: 345-8.

Rennefahrt, U.E.E., Illert, B., Kerkhoff, E., Troppmair, J., and Rapp, U.R.. 2002.
Constitutive JNK activation in NIH 3T3 fibroblasts induces a partially transformed phenotype. J. Biol. Chem: in press

Rennefahrt, U.E.E., Illert, B., Troppmair, J., and Rapp, U.R.. *Expression of constitutively active JNK confers tumorigenic potential to NIH 3T3 fibroblasts.* in Vorbereitung

Abstracts für Kongreßpräsentationen

Rennefahrt, U.E.E., Kerkhoff, E., Rapp, U.R., and Troppmair, J.
Constitutive JNK activation in NIH 3T3 fibroblasts induces a partially transformed phenotype. 5th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Nov. 8-10, 2001, Weimar

Ulrike E.E. Rennefahrt, Eugen Kerkhoff, Jakob Troppmair and Ulf R. Rapp
Partial transformation of NIH 3T3 fibroblasts by activated SAPK/JNK MAP kinase.
European Life Scientist Organization (ELSO), 29.06.-03.07.2002, Nizza

Erklärung

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

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

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

Würzburg, den

(Ulrike Rennefahrt)